

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

Salete Meiry Fernandes Bersan

**Avaliação da atividade antimicrobiana de óleos
essenciais frente a patógenos orais**

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

Orientadora: Profa. Dra. Marta Cristina Teixeira Duarte

Co-orientador: Prof. Dr. Pedro Luiz Rosalen

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação defendida pelo aluno, e orientada pela Profa. Dra. Marta Cristina Teixeira Duarte.

Assinatura do Orientador

Piracicaba, 2012

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

B46a Bersan, Salete Meiry Fernandes, 1974-
Avaliação da atividade antimicrobiana de óleos
essenciais frente à patógenos orais / Salete Meiry
Fernandes Bersan. -- Piracicaba, SP : [s.n.], 2012.

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

1. Biofilmes. 2. Testes de sensibilidade bacteriana. I. Duarte,
Marta Cristina Teixeira. II. Rosalen, Pedro Luiz, 1960- III.
Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia
de Piracicaba. IV. Título.

Informações para a Biblioteca Digital

Título em Inglês: Evaluation of antimicrobial activity of essential oils against
oral pathogens

Palavras-chave em Inglês:

Biofilms

Microbial sensitivity tests

Área de concentração: Farmacologia, Anestesiologia e Terapêutica

Titulação: Mestre em Odontologia

Banca examinadora:

Marta Cristina Teixeira Duarte [Orientador]

Regiane Yatsuda

Ana Lúcia Maria Ruiz

Data da defesa: 29-02-2012

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 29 de Fevereiro de 2012, considerou a candidata SALETE MEIRY FERNANDES aprovada.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Marta Cristina Teixeira Duarte", written over a horizontal line.

Profa. Dra. MARTA CRISTINA TEIXEIRA DUARTE

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Regiane Yatsuda", written over a horizontal line.

Profa. Dra. REGIANE YATSUDA

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Ana Lúcia Tasca Gois Ruiz", written over a horizontal line.

Profa. Dra. ANA LÚCIA TASCA GOIS RUIZ

Dedicatória e agradecimentos sinceros,

A ***Deus e Nossa Senhora*** pela presença constante na minha vida abençoando meus caminhos.

Ao ***meu esposo Rafael Morais Bersan***, companheiro e amigo, pela atenção dispensada, compreensão e apoio que permitiu a conquista do sonho do aprimoramento profissional. Obrigada por existir na minha vida!!!

A minha amada filha ***Manuela Fernandes Bersan***, filha querida, luz que brilha na minha vida, meu grande amor, agradeço pela compreensão aos meus momentos de ausência, e seu sorriso tão doce nos momentos de dificuldade.

Aos ***meus pais queridos, Maria Salete Guedes Fernandes e João Fernandes Filho***, pelo exemplo de força, superação e respeito. Pelo incentivo as conquistas, pela dedicação sem limites. Minha humilde admiração diante das atitudes mais belas que pude presenciar.

Em especial a ***minha irmã Adriana Fernandes*** por ser o Anjo que me fez seguir em frente, ser companheira nos momentos difíceis e pela sua grande capacidade de doação, que foi esta que me tornou a profissional que sou. Amo você!!!

Agradecimentos especiais,

A ***minha orientadora Profª. Dra. Marta Cristina Teixeira Duarte***, pela oportunidade concedida, pela confiança, pelos ensinamentos e paciência e principalmente pelo carinho e respeito que me recebeu em sua equipe de trabalho, proporcionando crescimento pessoal e profissional. Minha admiração e meu sincero agradecimento.

Ao ***meu co-orientador Prof. Dr. Pedro Luiz Rosalen***, a quem devo gratidão e respeito, amizade e carinho; pelos ensinamentos de grande generosidade.

Aos Professores colaboradores de meu projeto de pesquisa ***Prof. Dr. Adilson Sartoratto, Profª. Dra. Vera Lúcia Garcia Rehder, Profª. Dra Glyn Mara Figueira*** pelos ensinamentos, pela contribuição efetiva e disponibilidade plena. Exemplo a ser seguido.

Em especial a ***Profª. Dra. Vivian Fernandez Furletti*** pelas orientações nos ensaios microbiológicos, pela ajuda nos momentos difíceis, por ter se tornado amiga e companheira. Obrigada por tudo.

Ao ***CNPq*** (Processo N°130648/2010-8) pela bolsa de estudo concedida.

Aos meus amigos e amigas, companheiros de laboratório no CPQBA-UNICAMP, ***Renata Maria Teixeira Duarte, Camila Delarmelina, Márcio de Oliveira e Mariana Ferreira Binatti***, pela amizade e carinho com que fui recebida.

Aos colegas do curso de pós-graduação ***Ana Paula, Camila, Livia, Luiz, Cleiton, Luciano, Marcelo, Cristina, Fabiana, Marcos, Inês, Luciana, Fabiano, Leila, Patrícia, Wanessa, Fabrício e demais*** pelo companheirismo e ajuda.

A ***Maria Elisa dos Santos***, secretária do departamento de Farmacologia, Anestesiologia e Terapêutica, pelo carinho, atenção e incentivo.

Agradecimentos,

A 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 Junior***.

A ***Prof. Renata C. M. Rodrigues Garcia*** responsável pela coordenação do curso de Pós-Graduação da FOP/UNICAMP e a ***Profa. Dra Cinthia Pereira Machado Tabchoury*** coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da FOP/UNICAMP.

Aos professores da Área de Farmacologia, Anestesiologia e Terapêutica, ***Prof. Dr. Pedro Luiz Rosalen, Prof. Dr. Francisco Carlos Groppo, Profa. Dra. Maria Cristina Volpato, Prof. Dr. Eduardo Dias Andrade e Prof. Dr. José Ranali***.

Ao Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA/UNICAMP).

Ao ***Prof. Dr. Francisco Carlos Groppo, Profa. Dra. Vivian Fernandez Furletti Goes e Profa. Dra. Marta Cristina Teixeira Duarte***, membros de minha banca de qualificação de primeira fase pela disponibilidade e pelas sugestões que contribuíram muito para estruturação deste trabalho.

A ***Profa. Dra. Vivian Fernandez Furletti Góes, Profa. Dra. Carina Denny e Profa. Dra. Vera Lúcia Garcia Rehder*** membros de minha banca de qualificação de segunda fase pela disponibilidade e pelas sugestões que contribuíram muito para finalização deste trabalho.

A ***Profa. Dra. Regiane Yatsuda, Profa. Dra. Ana Lúcia Maria Ruiz e Profa. Dra. Marta Cristina Teixeira Duarte*** membros titulares da Comissão Julgadora da Dissertação e ao ***Prof. Dr. Cláudio Lima de Aguiar, Profa. Dra. Fabiana Fantinatti Garboggini e Prof. Dr. Pedro Luiz Rosalen*** membros suplentes da Comissão pela disponibilidade e presença, antecipo-lhes os agradecimentos sinceros.

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

*Embora ninguém possa voltar atrás e fazer
um novo começo, qualquer um pode
começar agora a fazer um novo fim.*

Chico Xavier

RESUMO

A cavidade oral é habitada por uma microbiota mista que, sob determinadas circunstâncias, pode superar as defesas do hospedeiro e agir como oportunista, produzindo diversas manifestações clínicas. Observa-se na literatura um interesse por produtos de origem natural como fonte de novas moléculas bioativas para o controle de afecções orais, entre estes produtos destacam-se os óleos essenciais e seus produtos secundários devido às suas propriedades antimicrobianas. A necessidade de gerar e agregar novas informações acerca da atividade antimicrobiana *in vitro* de óleos essenciais, impulsionou a realização deste trabalho, envolvendo vinte espécies do Banco de Germoplasmas da "Coleção de Plantas Medicinais e Aromáticas - CPMA" do CPQBA/UNICAMP. Nesse contexto, essa pesquisa teve por objetivo identificar a atividade antimicrobiana *in vitro* de óleos essenciais e frações de diferentes espécies de plantas medicinais e aromáticas contra os patógenos orais *Candida albicans*, *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis*, *Streptococcus sanguis* e *Streptococcus mitis*, organizados nas formas livre e em biofilme. A atividade antimicrobiana dos óleos e frações foi avaliada através da determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida e Fungicida Mínima (CBM/CFM), pelo método da microdiluição. Foram identificadas as classes de substâncias químicas presentes nos óleos essenciais e frações de melhor atividade por CG-EM. Além disso, os óleos essenciais e frações selecionadas foram submetidos à avaliação quanto à possível alteração morfológica causada no biofilme, através de análise por microscopias eletrônica de varredura (MEV). A maioria dos óleos essenciais apresentou atividade antimicrobiana moderada a forte sobre os microrganismos orais, com valores de CIM entre 0,007 a 1,00 mg/mL. Melhores atividades sobre células planctônicas foram exibidas pelas espécies *Aloysia gratissima*, *Coriandrum sativum*, *Cyperus articulatus*, *Lippia sidoides* e *Mikania glomerata*, cujos óleos foram fracionados e submetidos a estudos de ação sobre a formação de biofilme pelos microrganismos. *Coriandrum sativum* se destacou por apresentar os mais baixos valores de CIM em relação às células planctônicas de 0,007 a 0,125. As inibições de aderência variaram de 1.00 % para óleo de *Mikania glomerata* sobre *S. mitis* a 63,96 % para o óleo bruto de *C. articulatus* sobre *S. sanguis*. Através da análise das imagens obtidas por MEV não foi possível observar alterações na morfologia celular dos microrganismos orais. Porém, houve

redução e alterações na organização da estrutura dos biofilmes. A análise da composição química do *C. sativum* mostrou a presença de compostos majoritários derivados de álcoois e aldeídos, enquanto *C. articulatus* e *A. gratissima* apresentaram compostos mono e sesquiterpenos. Em conclusão, o óleo essencial de *C. articulatus* mostrou o maior percentual de inibição sobre os microrganismos estudados, enquanto o óleo de *A. gratissima* inibiu a aderência do biofilme de *S. mitis*.

Palavras-chave: óleo essencial, atividade antimicrobiana, biofilme oral.

ABSTRACT

The oral cavity is inhabited by a mixed microbial flora which, under determined circumstances, can overcome the host's defenses producing some of clinical pathological manifestations. Considerable interest has been found in the literature concerning natural products as sources new bioactive molecules for oral diseases control and the essential oils and their secondary products stand out with these products due to their antimicrobial properties. In order to produce and aggregate new information relating to *in vitro* antimicrobial activity of essential oils, this work was designed involving twenty species from the Germplasm Bank of the "Medicinal and Aromatic Plant Collection – CPMA" of CPQBA/UNICAMP, Brazil. Thus the objective of the present research was to identify the *in vitro* antimicrobial activity of essential oils and fractions of the different species of medicinal and aromatic plants against the oral pathogens *Candida albicans*, *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis*, *Streptococcus sanguis* and *Streptococcus mitis*, organized in the free form and in biofilms. The antimicrobial activity of the oils and fractions was evaluated by determining the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and the Minimum Bactericidal and Fungicidal Concentrations (MBC/MFC) using the micro-dilution method. The classes of bioactive chemical substances present in the essential oils and fractions showing the best activity were identified by GC-MS. In addition the selected essential oils and fractions were submitted to an evaluation to detect any possible morphological alterations caused in the biofilm by way of scanning electronic microscopy (SEM). The majority of the essential oils showed moderate to strong antimicrobial activity against the oral microorganisms, with MIC values between 0.007 and 1.00 mg/mL. Better activities against planktonic cells were shown by the species *Aloysia gratissima*, *Coriandrum sativum*, *Cyperus articulatus*, *Lippia sidoides* and *Mikania glomerata*, whose oils were fractionated and submitted to studies of their action against biofilms formation by microorganisms. The essential oil of *C. sativum* stood out, since it inhibited all investigated species with MIC lowest values, varieting from 0.007 to 0.250 mg/mL, and for MBC from 0.015 to 0.500 mg/mL. The inhibition of biofilm formation varied from 1.00% for *Mikania glomerata* oil against *S. mitis* to 63.96% for the crude *C. articulatus* oil against *S. sanguis*. No alterations in cell morphology of the oral microorganisms could be observed from an analysis of the

SEM images, but there were reductions and alterations in the organization of the biofilm structure. An analysis of the chemical composition of *C. sativum* showed the presence of alcohol and aldehyde derivatives as major compounds, whereas *C. articulatus* and *A. gratissima* showed mono and sesquiterpenes. In conclusion, the essential oil of *C. articulatus* showed the best results percentage inhibition on the microorganisms under study, whereas the *A. gratissima* oil inhibited of the *S. mitis* biofilm formation

Keywords: essential oil, antimicrobial activity, oral biofilm.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	1
PROPOSIÇÃO	7
CAPÍTULO 1 - <i>“Evaluation of antimicrobial activity of essential oils against oral pathogens.”</i>	9
CONCLUSÃO	39
REFERÊNCIAS	41
APÊNDICE	45
ANEXO	115

1. INTRODUÇÃO

A cavidade oral abriga diversas espécies de microrganismos que formam uma complexa comunidade estrutural, e podem estar aderidos à superfície dos dentes, da mucosa epitelial ou formando biofilmes (Kolenbrander, 2000). Os biofilmes microbianos são comunidades formadas quando microrganismos unicelulares se tornam firmemente aderidos a uma superfície sólida e envolvidos por uma matriz de polissacarídeos extracelulares, podendo ser formados a partir de uma ou de múltiplas espécies microbianas (Spratt & Pratten, 2003).

Em cada etapa do seu desenvolvimento, o biofilme dental vai adquirindo novas espécies microbianas, dentre estas *Lactobacillus casei*, *Streptococcus mitis*, *S. mutans*, *S. sanguis* e *S. sobrinus* que devido a sua patogenicidade provocam danos ao esmalte e tecido gengival (Kolebrander., 2010). O surgimento de doenças neste microambiente ocorre quando há um desequilíbrio no ecossistema do biofilme bacteriano formado (Marsh, 2003; 2005; Bernimoulin, 2003). A remoção mecânica do biofilme é um fator importante na prevenção da cárie e doença periodontal. Por se tratar de uma associação organizada, capaz de se aderir à superfície dos dentes ocasionando alterações patológicas na cavidade bucal, é indicada sua desorganização tão logo quanto possível (Almeida *et al.*, 2006). Considerando a importância dessa desorganização é necessário associar aos procedimentos mecânicos também métodos químicos para o controle da sua formação (Marinho & Araújo, 2007).

Substâncias antimicrobianas, como por exemplo, o digluconato de clorexidina, tem sido considerado como padrão-ouro em comparação com outros agentes químicos usados em odontologia, devido à sua capacidade de evitar a formação do biofilme dental (Charles *et al.*, 2004; Souza *et al.*, 2006; Semenoff *et al.*, 2008). Uma das principais vantagens de seu uso é o amplo espectro antimicrobiano, atuando tanto em microrganismos Gram-positivos como em Gram-negativos, além da substantividade prolongada e contínua, mesmo na presença de sangue e demais fluidos corporais (Rosenthal *et al.*, 2004; Yatsuda *et al.*, 2006). No entanto, o uso prolongado de clorexidina pode causar descamação da mucosa, manchas dos dentes, alteração do paladar, comprometimento de cicatrização de feridas, redução da adesão dos fibroblastos a superfícies radiculares (Zheng & Wang., 2011). Portanto, uma alternativa

adjuvante com potencial antimicrobiano e menos efeitos colaterais são valiosos para o tratamento de afecções orais.

Dessa forma, observa-se na literatura um interesse crescente por produtos de origem natural como fonte de novas moléculas bioativas. Os óleos essenciais são misturas de metabólitos secundários obtidos da fração volátil de plantas por processo de hidrodestilação. O termo essencial deriva de “essência”, o que significa cheiro ou sabor, e se relaciona com a propriedade destas substâncias de fornecer sabores e odores específicos para muitas plantas. Eles são caracterizados por apresentar uma composição muito diversa, derivada principalmente de dois grupos, os terpenóides (monoterpenos e sesquiterpenos) e fenilpropanóides (Calsamiglia *et al.*, 2007). Estes dois grupos são originários de diferentes precursores do metabolismo primário e são sintetizados através de vias metabólicas distintas apresentando propriedades já reconhecidas na literatura (Sangwan *et al.*, 2001; Khan *et al.*, 2011; Cristani *et al.*, 2007).

Tem sido demonstrado que os principais efeitos exercidos pelos compostos presentes nos óleos essenciais são decorrentes de alterações na membrana celular e suas funções (Khan *et al.*, 2010). Tem sido demonstrado que compostos dos óleos essenciais como o α -pineno e β -pineno foram capazes de destruir a integridade da membrana celular, e assim, inibir a respiração e processos de transporte de íons, levando à morte celular (Carson *et al.*, 2002). Esta hipótese foi fortemente apoiada pelo estudo sobre os efeitos de diferentes componentes do óleo essencial sobre a permeabilidade da membrana externa em bactérias Gram-negativas (Magwa *et al.*, 2006). Os óleos essenciais também podem atravessar a membrana celular de fungos, interagindo com as enzimas e proteínas da membrana, produzindo assim um fluxo de prótons para o exterior das células, que induz alterações nas células e, finalmente, sua morte (Omidbeygi *et al.*, 2007).

Essas propriedades antimicrobianas dos óleos essenciais são conhecidas há muitos anos e têm sido verificadas contra uma grande variedade de bactérias e fungos (Karpanen *et al.*, 2008; Sartoratto *et al.*, 2004; Hajlaoui *et al.*, 2009, Cox & Markham., 2007; Mulyaningsih *et al.*, 2010), incluindo patógenos orais (Cha *et al.*, 2007; Nascimento *et al.*, 2008; Botelho *et al.*, 2007).

A atividade *in vitro* do óleo de *Melaleuca alternifolia* (tea tree) contra 161 isolados clínicos de bactérias orais a partir de 15 gêneros foi determinado pelos estudos de Hammer *et al.*, (2003). A Concentração inibitória mínima (CIM) e concentrações bactericidas mínimas (CBM) variaram 0,003-2,0 % (v/v). Os menores valores de CIM foram encontrados para *Prevotella* spp., isolados clínicos de *Porphyromonas*, *P.intermedia* e *Veillonella* com CIM até 0,1 % (v/v). O óleo diminui a viabilidade formadora bacteriana (*time kill*) de *S. mutans* e *Lactobacillus rhamnosus*. Esses estudos indicam que uma gama de bactérias orais são suscetíveis ao óleo o que sugere que pode ser utilizado em produtos de saúde oral e na manutenção da higiene bucal.

Takarada *et al.* (2004), investigaram os efeitos antibacterianos de óleos essenciais sobre as bactérias orais *P. gingivalis*, *Actinobacillus atinomycetemcomitans*, *Fusobacterium nucleatum*, *S. mutans* e *S. sobrinus*. O óleo de *L. scoparium* demonstrou a mais eficaz atividade (CIM) em relação as cepas analisadas e foi capaz, juntamente com o óleo de *Eucalyptus radiata*, de inibir as bacterias periodontopatogênicas por completo. Os valores de CIM e CBM evidenciaram que *Lavandula officinalis* apresentou efeito bacteriostático e os demais óleos testados apresentaram atividade bactericida. Todos os óleos essenciais testados nesse estudo inibiram a adesão de *S. mutans*.

O efeito da atividade antimicrobiana de óleos essenciais isolados e em combinação com gluconato de clorexidina contra planctônicos e em culturas de biofilme de *S. mutans* e *Lactobacillus plantarum* foram estudados por Filoche *et al.* (2005), o que constataram que o óleo de *C. zeilanicus* exibiu a maior potência antimicrobiana (CIM de 1,25-2,5 mg/ml). O efeito da combinação do óleo essencial com a clorexidina resultou em um efeito maior contra culturas em biofilme de *S. mutans* e *L. plantarum* que contra culturas planctônicas. A quantidade de clorexidina necessária para atingir uma inibição do crescimento equivalente contra as culturas biofilme foi reduzida 4-10 vezes em combinação com *C. zeilanicus*, *Lepstospermum scoparium*, *L. morrisonii*, timol, e Listerine® demonstrando uma promissora utilização de óleos essenciais no desenvolvimento de novos tratamentos anticárie.

Os óleo essencial obtido a partir de *Artemisia lavandulaefolia* DC e alguns de seus principais compostos foram testados para atividade antimicrobiana contra 15 gêneros diferentes de bactérias orais. (Cha *et al.*, 2005). O óleo essencial de *A. lavandulaefolia* exibiu considerável potencial inibitório contra todas as bactérias anaeróbias investigadas incluindo os menores valores de CIM encontrados para os patógenos orais *S. gordonii*, *F. nucleatum*, *P. intermedia* e *P. gingivalis* (CIM de 0,025-0,05 mg/mL; CBM de 0,025-0,1 mg/mL) testados, enquanto seus principais compostos demonstraram diferentes graus de inibição de crescimento.

A composição e a atividade antibacteriana do óleo essencial obtido a partir de *Cryptomeria japonica* D., em bactérias orais, foram estudados por Cha *et al.* (2007). O óleo essencial e alguns de seus principais compostos foram testados para atividade antimicrobiana contra 15 gêneros diferentes de bactérias orais, apresentando considerável efeito inibitório contra todas as bactérias testadas (CIM de 0,025-0,05 mg/mL; CBM de 0,025-0,1 mg/mL), enquanto seus compostos principais exerceram vários graus de inibição de crescimento.

Maggi *et al.* (2010) demonstraram a atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Hypericum hircinum* L, o qual foi ativo contra as bactérias Gram-positivas *Staphylococcus aureus*, *S. mutans* e *Bacillus subtilis*, e Gram-negativas *Escherichia coli* e a levedura *Candida albicans*, este último foi o microrganismo mais sensível em relação as cepas analisadas com o menor valor de CIM (155 µg/mL). O patógeno oral *S. mutans*, responsável pela cárie, também mostrou boa sensibilidade aos óleos segundo o referido autor (CIM de 625-1250 µg/mL).

As atividades antimicrobianas de óleos essenciais de algumas das plantas selecionadas para o presente estudo foram descritas anteriormente contra patógenos orais, como é o caso do óleo da *Mentha piperita* e *Aloysia tryphilla* (Sartoratto *et al.*, 2004), do *Cyperus articulatus* (Zoghbi *et al.*, 2006; Oladusu *et al.*, 2011) dos compostos isolados de *Coriandrum sativum* (Furletti *et al.*, 2011), do *Cymbopogon martinii*, *C. winterianus* e *Mikania glomerata* (Duarte *et al.*, 2006), do óleo de *Aloysia gratissima* (Trovatti *et al.*, 2009) e, finalmente, da *Lippia sidoides* (Botelho *et al.*, 2007).

Pesquisas que envolvem fontes naturais têm culminado na descoberta de muitos fármacos importantes para o tratamento de doenças humanas de alta prevalência (Filoche *et al.*, 2005). A relevância destas fontes naturais se confirma através dos números relacionados às novas drogas em uso neste contexto. Dentre as aprovadas pelo Food and Drug Administration (FDA) ou órgãos compatíveis em outros países de 1981 a 2006, 6 % são essencialmente de origem natural, 57 % são derivados de produtos naturais e 37 % são drogas sintéticas (Newman & Cragg, 2007; Cragg *et al.*, 2009).

Devido à grande biodiversidade presente nos diferentes biomas brasileiros, existe uma crescente demanda por produtos naturais, por indústrias farmacêuticas nacionais e internacionais, que impulsiona a investigação científica e a busca por fitofármacos. (Duarte & Figueira, 2008). Estima-se que o Brasil possua 50.000 espécies de plantas superiores, porém acredita-se que apenas 8 % das espécies vegetais da flora brasileira tenham sido estudadas em busca de compostos bioativos e apenas 1.100 avaliadas em suas propriedades medicinais. (Newman & Cragg, 2007).

Assim, o emprego das plantas como medicina alternativa tem chamado a atenção da comunidade científica, por ser um campo promissor para o tratamento de patologias, incluindo as relacionadas à cavidade oral. Considerando o crescente interesse pelo emprego de produtos naturais como antimicrobianos, o objetivo desse trabalho foi avaliar a atividade de óleos essenciais frente à patógenos orais organizados na forma planctônica e de biofilme.

2. PROPOSIÇÃO

1) Obter os óleos essenciais de vinte espécies de plantas medicinais e aromáticas pertencentes à CPMA, do CPQBA/UNICAMP.

2) Avaliar a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais e suas frações por meio da determinação das concentrações mínimas inibitórias (CIM), bactericidas (CBM) e fungicidas (CFM) contra microrganismos orais, visando a seleção dos óleos e/ou frações de melhor atividade.

3) Avaliar a ação dos óleos e frações de melhor atividade sobre biofilmes e a ocorrência de mudanças ou danos na morfologia das células microbianas.

4) Verificar o padrão de crescimento dos microrganismos em presença do óleo essenciais e frações de melhor atividade.

5) Determinar o rendimento em óleos essenciais e frações, e a composição química dos óleos essenciais e frações de melhor atividade antimicrobiana.

3. CAPÍTULO 1

Esta dissertação está de acordo com a Informação CCPG/002/06 – 13/09/2006, UNICAMP (Anexo I), que regulamenta o formato alternativo para dissertação e tese, permitindo a inserção de artigo(s) científico(s) de autoria ou co-autoria do candidato.

Assim sendo, este capítulo é composto por um estudo em fase de submissão para revista científica eCAM - **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine** (Anexo 2) (Fator de Impacto 2,96), conforme descrito abaixo:

“Evaluation of antimicrobial activity of essential oils against oral pathogens.”

Bersan SMF^{a,b}, Galvão, LCC^a, Goes VFF^b, Sartoratto A^b, Figueira GM^b, Rehder VLG^b, Alencar SM^c, Rosalen PL^a, Duarte MCT^{a,b,*}.

^a Department of Physiological Sciences, Piracicaba Dental School, University of Campinas (UNICAMP), 901 Limeira Av., Zip Code 13414-018, Piracicaba, SP, Brazil.

^b Chemical, Biological and Agricultural Pluridisciplinary Research Center (CPQBA), University of Campinas (UNICAMP) Box. 6171, Zip Code: 13081-970, Campinas, SP, Brazil.

^c Department of Agri-food industry, Food and Nutrition, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, University of São Paulo (USP), 11 Pádua Dias Avenue, Zip Code: 13418-900, Piracicaba, SP, Brazil.

*Corresponding author:

Phone +55 19 2139-2872; fax: +55 19 2139-2852.

mduarte@cpqba.unicamp.br

Abstract

In the present research essential oils obtained from twenty medicinal and aromatic plants were evaluated for their antimicrobial activity against oral pathogens organized in a planktonic way. The oils were obtained by hydro-distillation in a Clevenger-type system, and their minimum inhibitory concentrations (MIC) and minimum fungicidal (MFC) or bactericidal (MBC) concentrations were determined using the micro-dilution method against *Candida albicans*, *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis*, *Streptococcus sanguis* and *Streptococcus mitis*. The majority of the essential oils presented moderate to strong antimicrobial activity against the oral pathogens, with MIC values between 0.007 and 1.00 mg/mL. The best activities were shown by *Aloysia gratissima*, *Coriandrum sativum*, *Cyperus articulatus*, *Lippia sidoides* and *Mikania glomerata*, whose oils were fractionated and submitted to further studies against biofilms formation by microorganisms. The essential oil of *C. sativum* stood out, since it inhibited all investigated species with MIC lowest values, varying from 0.007 to 0.250 mg/mL, and for MBC from 0.015 to 0.500 mg/mL. The inhibition biofilm formation varied from 1.00 % for crude oil of *M. glomerata* on *S. mitis* to 63.96 % for crude oil of *C. articulatus* on *S. sanguis*. Through SEM images was no changes were observed in cell morphology, despite a decrease in biofilm formation and change on biofilm structure. Chemical analysis by CG-MS of the *C. sativum* revealed major compounds derivatives from alcohols and aldehydes, while *Cyperus articulatus* and *A. gratissima* presented mono and sesquiterpenes. In conclusion the crude *C. articulatus* oil showed the best results percentage inhibition on biofilms, whereas the *A. gratissima* oil inhibited the adherence of the *S. mitis* biofilm.

Keywords: antimicrobial activity, essential oil and oral biofilm

1. Introduction

The oral cavity is home of various microbial species, which form a complex community structure that can adhere to teeth surface or to epithelial mucosa, or form biofilms [1]. Microbial biofilms are communities formed when single cell microorganisms become firmly adhered to a solid surface covered by an extracellular polysaccharide matrix, and can be formed from multiple or single microbial species [2].

Dental biofilm acquires new microbial species in each stage of its development, including *Streptococcus mitis*, *S. mutans*, *S. sanguis*, *S. sobrinus* and *Lactobacillus casei*, which, due their could damage the enamel and gum tissue pathogenicity [3]. Diseases appear in this micro-environment when there is a lack of equilibrium in the ecosystem of the bacterial film formed [4], and thus the mechanical removal of the biofilm is an important factor in the prevention of caries and periodontal diseases. Since biofilm is an organized association, capable of adhering on teeth and causing pathological alterations in oral cavity, its desagregation is indicated as soon as possible [5], and

considering the importance of this dissociation, it is important to associate chemical methods and the mechanical procedures in order to control its formation [6].

Antimicrobial substances such as chlorhexidine digluconate have been considered as golden standard when compared to other chemical agents used in dentistry, due its capacity to avoid the dental biofilm formation [7]. The main advantages of using chlorhexidine are its wide antimicrobial spectrum, acting on both Gram-positive and Gram-negative microorganisms, and its prolonged and continuous substantivity even in the presence of blood and other body fluids [8]. However, the prolonged use of chlorhexidine can cause mucous peeling, stains on the teeth, alterations in the sense of taste, compromised of the wounds healing and reduction of the adhesion of fibroblasts to radicular surfaces [9]. Thus an alternative adjuvant with antimicrobial potential and less side-effects would be of great value in oral affections treatment.

An increasing interest in natural products as a source of new bioactive molecules has been observed in the literature [10]. These include essential oils from medicinal and aromatic plants, products of their secondary metabolism from the plant volatile by steam distillation. They are characterized as having a very diverse composition derived mainly from two different groups, the terpenoids (monoterpenes and sesquiterpenes) and phenylpropanoids [11]. These compounds come from different precursors of primary metabolism and are synthesized through different pathways conferring antimicrobial and antifungal properties on the oil recognized in the literature [12].

The antimicrobial properties of essential oils against a wide variety of bacteria and fungi has been shown [10], including oral pathogens [13,14,15]. Thus, the use of plants in alternative medicine has gained the attention of the scientific community, since this is a promising field for the treatment of pathogens, including those related to the oral cavity. Considering this increasing interest in using natural products as alternative antimicrobial substances, the objective of this research was to evaluate the activity of essential oils against oral pathogens organized in the planktonic and biofilm forms.

2. Material and methods

This study was carried out as a bioguided study, meaning that the results obtained from biological assays were used as a guide to select the essential oils and fractions containing the active chemical compound against the microorganisms tested.

2.1. Samples

For the development of this research, the reference microorganisms used were yeasts strains *Candida albicans* CBS 562 from "Centraalbureau voor Schimmelcultures" and bacteria *Streptococcus sanguis* ATCC 10556, *Streptococcus mitis* ATCC 903, *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 and *Fusobacterium nucleatum* ATCC 25586 from the American Type Culture Collection. The microorganisms were stored at -70 °C in a specific medium with 15 % glycerol and deposited in the microorganism collection of the Department of Microbiology of Center for Chemical, Biological and Agricultural Research of States University of Campinas (CPQBA/UNICAMP). Among the studied microorganisms, *C. albicans* is aerobic, *S. mitis* and *S. sanguis* are microaerophilic and *F. nucleatum* and *P. Gingivalis*, anaerobics.

2.2. Plant material

The list of twenty medicinal species studied, including the botanical name, voucher specimen and data related to traditional use and plant parts, are presented in Table 1. The selected plants were obtained from the "Collection of Medicinal and Aromatic Plants" - (CPMA) in the experimental field of CPQBA/UNICAMP, Campinas, SP, Brazil. The plants were collected in a predetermined time of the year (spring/summer) from November 2009 to January 2011, in the morning after dew point, which ensures good reproducibility in the research. The vouchers species were deposited in the Herbarium of the Institute of Biology at UNICAMP - UEC and registered in the herbarium of CPQBA with their identification numbers.

2.3. Essential oil extraction

The essential oils were obtained from 100 g of fresh plant parts by water distillation for 3h using a Clevenger-type system. The aqueous phase was extracted three times with 50 mL dichloromethane. The pooled organic phases were dried with sodium sulfate, filtered, and the solvent evaporated until dry. The oil samples were stored at -25 °C in sealed glass vials [16].

2.4. Fractionation of essential oil

The essential oils that presented the best antimicrobial activity were selected to be fractionated. The fractionation was carried out on a dry column prepared with silica gel 60 (0063-0200 mm) (Merck) by direct application onto the packed column, followed by elution. The best mobile phase for use on the columns was defined as dichloromethane by analyzing each essential oil using TLC (Thin-Layer Chromatography) in different eluents. After elution, the column was fractionated into four fractions and individually transferred to appropriate flasks, dissolved in dichloromethane and re-analyzed by TLC. Similar fractions were grouped and vacuum filtered and the silica residue extracted with dichloromethane [16]. All chemical wastes produced in present study were treated under approval of Environmental Ethics Committee of UNICAMP (322/2009).

Table 1: Medicinal plants from CPMA – “Collection of Medicinal and Aromatic Plants” - CPQBA/UNICAMP selected for this study.

<i>Medicinal Species</i>	<i>Family</i>	<i>Popular Name</i>	<i>Source</i>	<i>No. CPMA</i>	<i>No. Voucher*</i>	<i>Popular use</i>
<i>Aloysia gratissima</i> (Giil & Hook)	Verbenaceae	Brazilian lavender	leaf	714	UEC 121.393	Digestive antispasmodic
<i>Aloysia triphylla</i> (L'Hér.) Britton	Verbenaceae	Aloisia	leaf	274/700	UEC 121.412	Sedative, antispasmodic
<i>Alpinia speciosa</i> (Pers.) Burt & Smith	Zingiberaceae	Colony	root	447	UEC 145.185	Antimicrobial
<i>Baccharis dracunculifolia</i> DC.	Asteraceae	Broom weed	leaf	1841	-	Tonic, eupeptic, antipyretic
<i>Cinnamomun zeilanicus</i> Blume	Lauraceae	Cinnamon	leaf	455	IAC 19624	Carminative, antispasmodic
<i>Coriandrum sativum</i> L.	Apiaceae	Coriander	leaf	664	-	Antimicrobial, antifungal
<i>Cymbopogon citratus</i> (DC) Stapf	Poaceae	Lemon grass	leaf	503	UEC 85.210	Sedative, analgesic, anti-cough
<i>Cymbopogon. martini</i> (Roxb.) J.F. Watson	Poaceae	Palmarosa	leaf	354	UEC 127.115	Antiseptic, antifungal
<i>Cymbopogon winterianus</i> Jowitt.	Poaceae	Lemon verbena	leaf	712	UEC 121.414	Repellent, insecticide
<i>Cyperus articulatus</i> Vahl	Ciperaceae	Piprioca	bulbs	222	UEC 121.396	Anti-inflammatory
<i>Elyonurus muticus</i> Spreng	Poaceae	Agripalma	leaf	1701	UEC 20.580	Antibacterial
<i>Eugenia florida</i> DC.	Myrtaceae	Guamirin-cereja	leaf	1685	IAC 49207	Anti-inflammatory
<i>Eugenia uniflora</i> L	Myrtaceae	Pitanga	leaf	1816	-	Anti-hypertensive, diuretic
<i>Lippia alba</i> (Mill) N.E. Brown	Verbenaceae	False lemon balm	leaf	467/509	UEC 121.413	Treatment of migraines
<i>Lippia sidoides</i> Cham.	Verbenaceae	Rosemary	leaf	398/399	-	Bactericide, fungicide
<i>Mentha piperita</i> L.	Lamiaceae	Mint	leaf	560	UEC 127.110	Antifungal, antibacterial
<i>Mikania glomerata</i> Spreng	Asteraceae	Guaco	leaf	766	UEC 102.047	Anti-inflammatory, bronchodilator
<i>Siparuna guianenses</i> Aubl.	Monimiaceae	Wild lemon	leaf	2025	-	Tranquilizer, diuretic
<i>Syzygium aromaticum</i> (L.) Merr. & L. M.Perry	Myrtaceae	Cloves	leaf	455	IAC 19624	Seasoning, antibacterial
<i>Ziziphus joazeiro mart</i>	Rhamnaceae	Juzeiro fruit	leaf	2119	-	Astringent, Anti-inflammatory

*Deposited in the herbarium of species with no voucher number are being registered yet.

2.5. Microbiological assays

2.5.1. Inocula preparation

Candida albicans CBS 562 and the bacteria *Streptococcus sanguis* ATCC 10556, *S. mitis* ATCC 903, *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 and *Fusobacterium nucleatum* ATCC 25586 were grown overnight at 36 °C in Sabouraud Dextrose Broth (SDB, Merck®) and Mueller-Hinton (Difco®), respectively. The inocula were prepared according to microdilution method protocols M27-A2 and M7-A6 of CLSI 2002, 2005 [17,18]. The cells were diluted in 0.85 % NaCl solution and the suspension turbidity adjusted to 0.5 on the McFarland scale and confirmed in a spectrophotometer (Shimadzu UV mini 1240 Spectrophotometer) at 530nm (*C. albicans*) or 625 nm (bacteria) , to absorbance between 0.08-0.1 (10^6 cells/mL for yeast and 10^8 cells/mL for bacteria). The cell suspensions were finally diluted to 10^4 cells/mL for yeasts and 10^6 cells/mL for bacteria and inoculated into culture plates with 96 wells.

2.5.2. Minimal Inhibitory Concentration (MIC)

The MIC was determined using tissue culture microplates (96 wells) containing 100 µg /mL Brain Heart Infusion (BHI - Oxoid®) culture medium for bacteria and Sabouraud Dextrose Broth (SDB, Merck®) for *C. albicans*. The stock solutions of essential oils and fractions were diluted with propylene glycol (4 mg/mL) and transferred to the first well and serial dilutions were prepared such that concentrations in the range of 1-0.0048 mg/mL were obtained. Nystatin (Sigma® - 1%) and chlorhexidine digluconate (Sigma® - 0.12%) were used as the references for antimicrobial control. The inocula (100 µg /mL) were added to all the wells, and the plates incubated at 36 °C for 48 h in aerobic, microaerophilic or anaerobic conditions. They were then evaluated and the MIC was defined as the smallest concentration of material capable of preventing microbial growth. The tests were performed in three independent experiments, each in triplicate [17,18].

2.5.3. Minimal Bactericidal/Fungicidal Concentration (MBC/MFC)

Based on the results obtained in the MIC test (2.5.1), the cell suspension from the wells showing no visible microbial growth and from three wells above them was used to determine the MBC/MFC. A 10 µL aliquot of these wells was removed and subcultured in Petri dishes containing Sabourad Dextrose Agar medium (SDA- Merck®) for yeasts and Tryptic Soy Agar (TSA-Difco®) and Blood Agar media for bacteria. The plates were incubated at 36 °C for until five days in aerobic, microaerophilic or anaerobic conditions. The MBC/MFC was considered to be the lowest sample concentration showing no cell growth on the inoculated agar surface. The tests were performed in three independent experiments, each in triplicate [17,18].

2.6. Biofilms assays

2.6.1. MIC/MBC/MFC biofilm determination

The microdilution method employed for biofilm assays was carried out according to the methodology described in the item 2.5.2 with some modifications. The inocula from cultures were prepared at 10^7 cells/mL for bacteria and 10^5 cells/mL for *C. albicans* in BHI or SDB media enriched with 1% sucrose. The microplates were incubated at 36 °C for 72 h under appropriate atmosphere in order to promote microbial adherence to the bottom of the wells. To confirm MIC values and to establish MBC/MFC, the contents of each wells were discarded and each adhered the biofilm was transferred by swab technique on the surface of blood agar or SDA agar in petri dishes and incubated at 30 °C for until five days in microaerophilic or anaerobic conditions [17,18].

2.6.2. Effect of essential oils and fractions on biofilm formation.

The biofilm test were carried out using sterile untreated 96-well polyethylene plates (IPT) containing the specific medium (Sabouraud for yeast and BHI for bacteria, enriched with 2 % sucrose). The stock solutions of essential oils and fractions were diluted with propylene glycol (4 mg/mL) and transferred to the first well and serial dilutions were prepared such that concentrations in the range of 1-0.0048 mg/mL were obtained. The 1% Nystatin (Sigma®) and 0.12% chlorhexidine

digluconate (Sigma®) were used as the references for antimicrobial control. After this procedure standard, microbial cells (1.0×10^5 cells/mL for yeasts and 1.0×10^7 cells/mL for bacteria) were introduced into the formed biofilm in the presence of the essential oils and fractions of best activity was quantified using a crystal violet solution and measured at 595 nm in a microplate reader (SpectraMax 340 tunable Microplate Reader, Molecular Devices Ltda.) [19].

2.6.3. Biofilm quantification

The biofilm developed in each well was washed twice with 200 µg/mL of distilled water and then dried for 45 min. An aliquot of 100 µg/mL of 0.4 % crystal violet was then added to each well and left to rest for 45 min. After this procedure, the biofilms formed in the bottom of the wells were washed four times with distilled water and immediately distained with 200 µg/mL of 95 % ethanol. After a further 45 min, 100 µg/mL of well solution were transferred to a well in a new plate and the absorbance measured at 595 nm in the microplates reader (SpectraMax 340 tunable Microplate Reader, Molecular Devices Ltda). The amount of biofilm formed was measured by subtracting the values of the control well absorbance [20].

2.6.4. Scanning Electron Microscopy (SEM) of preformed and mature biofilms.

In order to assess the integrity of the microbial cells using SEM, biofilms were developed in the Lab-Tek TM coverslip chambers (Nunc) as described above, and treated with standard drugs and essential oils at 1 mg/mL. The samples were washed twice with 3 % glutaraldehyde in phosphate buffer (pH 7.4) and fixed in glutaraldehyde 0.15 M 2.5 % (v/v) for 12 hours. The dehydrated cells were submitted to sequential baths of ethanol at concentrations of 50 %, 70 %, 90 % and absolute ethanol twice, until the dried at the critical point, then coated with gold in a Metalizer and observed using a scanning electron microscope (Jeol modelo JSM 5600 Lv) [21].

2.7. Chemical Composition of essential oils and fractions

2.7.1. Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS).

The identification of volatile constituents was carried out using a Hewlett-Packard 6890 gas chromatograph equipped with a HP-5975 mass selective detector and HP-5 capillary column (30m×0.25mm×0.25 μ m diameter). GC and GC–MS were carried out using split (1:30) injection, with injector temperature set at 220 °C, column at 60 °C, and a heating ramp of 3 °C min^{–1} to a final temperature of 240 °C, with the MS and FID detectors set at 250 °C. Helium was used as the carrier gas at 1mL min^{–1}. The GC–MS electron ionization system was set at 70 eV. A sample of the essential oil was dissolved in ethyl acetate for the analyses. The retention indices (RI) were determined by injection of hydrocarbon standards, and the oil components were identified by comparison with profiles from the NIST 05 library, and by the injection of authentic standards when available [22].

3. Results

3.1. Oil yields and fractions

The essential oils yields obtained for each plant selected are presented in Table 2, expressed in relation to dry matter. The highest oil yields were obtained from *A. gratissima* (1.10 %), *C. citratus* (1.13 %), *C. winterianus* (1.48 %), *M. piperita* (2.22 %) and *L. sidoides* (4.67 %). The yields of the fractions obtained from the selected oils are shown in Table 3. The fraction F₂ from *L. sidoides* showed the highest yield (43.12 %), followed by fraction F₁ of *M. glomerata* (42.8 %), F₂ of *C. sativum* (39.2%) and F₁ of *L. sidoides* (31.96 %).

3.2. Antimicrobial assays

The results obtained for MIC/MBC/MFC of the essential oils against the oral microorganisms are shown in Table 2. In general, the oils presented MIC values between 0.007 and 1.00 mg/mL against planktonic cells. The highest antimicrobial activities were observed against *C. albicans* in the presence of the *A. speciosa*, *C. sativum* and *C. zeilanicus* essential oils (MIC - 0.007 mg/mL). *Coriandrum sativum* was capable to inhibit *F. nucleatum* and *S.mitis* with MIC lowest

values (MIC - 0.015 mg/mL and 0.062 mg/mL, respectively) while *S. guianenses* to inhibit growth of *P. gingivalis* (MIC- 0.062). *Mikania glomerata* stood out, since inhibited bacteria growth *S. sanguis* at 0.062 mg/mL.

Based on the MIC and MBC/MFC results, five essential oils were chosen to continue the microbiological assays according to their activity as well as spectrum of action against the microorganisms, oil yield, possibility of the seasonal cultivation of the plants, and the feasibility of oil production on a commercial scale, being the oils from *A. gratissima* (AG), *C. articulatus* (CA), *C. sativum* (CS), *L. sidoides* (LS) and *M. glomerata* (MG).

According to these criteria the oils (AG, CA, CS, LS, MG) were fractionated. The MIC/MBC/MFC results of oil fractions are presented in Table 3. The fractions presented MIC values between 0.031 and 1.00 mg/mL. All fractions were less active than the crude oil when assayed against *C. albicans*, while the fraction F₄AG showed best inhibitory and bactericidal effect against *F. nucleatum*, *S. sanguis* and *S. mitis* (MIC between 0.062 and 0.125 mg/mL). The better results was capable to inhibit bacteria growth *P. gingivalis* were observed for the F₁CA and F₄MG (MIC values of 0.125 mg/mL and 0.250 mg/mL, respectively) whereas F₂LS to inhibited of *S. sanguis* and *S. mitis* (MIC -0.125 mg/mL). The fraction F₄CA also to inhibit the growth *S. mitis* (MIC - 0.250 mg/mL) showed better inhibitory and bactericidal effect than the crude oil.

Inferior activities results were observed for the fractions of *C. sativum* when compared to the crude oil, suggesting a greater potential for the application of this oil in the crude form, which shows a synergistic effect between its components. The fractions selected for further testing showed the highest ability to inhibit microbial growth that the crude oil (MIC / MBC / MFC), were selected in this way F₄AG, F₄MG, F₄CA, and F₂LS.

Table 2: Oil yield and antimicrobial activity of the essential oils studied against oral pathogens (MIC/MBC/MFC – mg/mL)

Medicinal species	% Yield (%)	Microorganisms									
		<i>C. albicans</i> CBS 562		<i>F. nucleatum</i> ATCC 25586		<i>P. gingivalis</i> ATCC 33277		<i>S. sanguis</i> ATCC 10556		<i>S. mitis</i> ATCC 903	
		MIC	MFC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
<i>Aloysia gratissima</i> (Aff & Hook).Tr	1.10	0.015	0.062	0.125	0.250	0.125	0.125	0.500	1.000	0.250	0.250
<i>Aloysia triphylla</i> (L'Hér.) Britton	0.27	0.015	0.062	0.125	0.250	0.250	0.250	0.500	1.000	0.500	0.500
<i>Alpinia speciosa</i> (Pers.) Burt & Smith	0.22	0.007	0.062	0.125	0.125	0.125	0.250	0.500	*	0.500	*
<i>Baccharis dracunculifolia</i> DC.	0.80	0.250	0.500	0.125	0.250	0.125	0.125	0.500	0.500	0.250	0.250
<i>Cinnamomum zeilanicum</i> Blume	0.22	0.007	0.007	0.250	0.250	0.250	0.250	0.500	1.000	0.500	0.500
<i>Coriandrum sativum</i> L.	0.29	0.007	0.015	0.015	0.125	0.125	0.125	0.250	0.500	0.062	0.125
<i>Cymbopogon citratus</i> (DC) Stapf	1.13	0.015	0.125	0.250	0.250	0.250	0.250	0.500	*	0.250	0.500
<i>C. martini</i> (Roxb.) J.F. Watson	0.59	0.015	0.125	0.125	0.250	0.250	0.250	0.500	*	0.250	0.250
<i>C. winterianus</i> Jowitt.	1.48	0.015	0.125	0.125	0.250	0.250	0.500	0.500	*	0.250	0.500
<i>Cyperus articulatus</i> L.	0.50	0.125	0.500	0.250	0.250	0.250	0.250	0.250	0.500	0.250	0.500
<i>Elyonurus muticus</i> Spreng.	0.61	0.250	*	0.250	0.500	0.250	0.250	0.500	1.000	0.500	*
<i>Eugenia florida</i> DC.	0.34	0.125	*	0.125	0.250	0.125	*	0.125	0.250	0.500	0.500
<i>Eugenia uniflora</i> L	0.76	0.250	*	0.125	0.125	0.250	0.250	0.500	0.500	0.500	0.500
<i>Lippia alba</i> (Mill) N.E. Brown	0.30	0.250	0.500	0.125	0.125	0.250	0.250	0.250	1.000	0.250	*
<i>L. sidoides</i> Cham.	4.67	0.250	0.500	0.125	0.125	0.250	0.250	0.125	0.500	0.250	*
<i>Mentha piperita</i> L.	2.22	0.500	*	0.250	0.250	0.250	*	0.500	0.500	0.500	0.500
<i>Mikania glomerata</i> Spreng	0.40	0.250	0.250	0.250	0.500	0.500	*	0.062	0.125	0.125	0.125
<i>Siparuna guianensis</i> Aubl	0.29	0.125	0.250	0.062	0.250	0.062	0.125	0.250	1.000	0.125	0.250
<i>Syzygium aromaticum</i> (L.) Merr. & L. M.Perry	0.46	0.500	0.500	0.250	0.250	0.250	0.250	0.500	1.000	0.500	0.500
<i>Ziziphus joazeiro</i> Mart	0.46	1.000	*	0.250	0.500	0.250	0.250	0.500	1.000	0.500	0.500
Nystatin	-	0.007	0.015	-	-	-	-	-	-	-	-
Chlorhexidine digluconate	-	-	-	0.015	0.015	0.015	0.125	0.015	0.015	0.015	0.125

*Fungicidal/bactericidal action: MIC>1mg/mL

Table 3: Antimicrobial activity of the crude essential oils (EO) and their fractions with the best activity against oral pathogens (MIC/MBC/MFC – mg/mL)

<i>Medicinal species</i>	<i>% Yield fraction</i>	<i>Microorganisms</i>									
		<i>C. albicans</i> CBS 562		<i>F. nucleatum</i> ATCC 25586		<i>P. gingivalis</i> ATCC 33277		<i>S. sanguis</i> ATCC 10556		<i>S. mitis</i> ATCC 903	
		MIC	MFC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
<u>EO A. gratissima</u>		0.015	0.062	0.125	0.250	0.125	0.125	<u>0.500</u>	<u>1.000</u>	<u>0.250</u>	<u>0.250</u>
<i>F₁AG</i>	25.7	0.500	1.000	0.500	0.500	0.250	0.500	0.500	1.000	0.250	0.500
<i>F₂AG</i>	11.1	0.500	*	0.500	0.500	0.250	0.500	0.500	1.000	0.500	0.500
<i>F₃AG</i>	26.9	0.500	1.000	0.250	0.500	0.250	0.500	0.500	0.500	0.250	0.500
<i>F₄AG</i>	16.5	0.125	*	0.062	0.250	0.125	0.500	<u>0.125</u>	<u>0.125</u>	<u>0.125</u>	<u>0.125</u>
<u>EO C. sativum</u>		<u>0.007</u>	<u>0.015</u>	<u>0.015</u>	<u>0.125</u>	<u>0.125</u>	<u>0.125</u>	<u>0.250</u>	<u>0.500</u>	<u>0.063</u>	<u>0.125</u>
<i>F₁CS</i>	24.9	0.500	1.000	0.250	0.250	0.125	0.500	0.500	0.500	0.500	0.500
<i>F₂CS</i>	39.2	0.250	1.000	0.125	0.250	0.125	0.500	0.500	0.500	0.250	1.000
<i>F₃CS</i>	15.2	0.250	1.000	0.250	0.250	0.125	0.500	0.500	*	0.250	1.000
<i>F₄CS</i>	9.2	0.250	1.000	*	*	0.500	1.000	0.500	1.000	0.500	*
<u>EO C. articulatus</u>		0.125	0.500	0.250	0.250	0.250	0.250	0.250	0.500	<u>0.250</u>	<u>0.500</u>
<i>F₁CA</i>	9.2	0.250	1.000	0.250	*	0.125	0.250	*	*	0.500	*
<i>F₂CA</i>	9.4	0.250	*	0.250	0.250	0.500	1.000	1.000	*	0.500	*
<i>F₃CA</i>	24.5	0.250	*	0.250	0.250	0.250	1.000	0.500	1.000	0.250	0.500
<i>F₄CA</i>	26.2	0.250	1.000	0.125	0.250	0.250	0.250	0.250	0.500	<u>0.250</u>	<u>0.250</u>
<u>EO M. glomerata</u>		0.250	0.250	0.250	0.500	<u>0.500</u>	<u>*</u>	0.062	0.125	0.125	0.125
<i>F₁MG</i>	42.8	0.250	*	0.250	0.500	0.250	0.500	*	*	0.500	*
<i>F₂MG</i>	14.0	0.250	0.500	0.250	*	0.500	0.500	*	*	0.500	1.000
<i>F₃MG</i>	7.2	0.250	1.000	0.250	*	0.250	0.500	*	*	*	*
<i>F₄MG</i>	2.6	0.250	1.000	0.250	*	<u>0.250</u>	<u>0.250</u>	0.250	1.000	0.250	0.500
<u>EO L. sidoides</u>		0.250	0.500	0.125	0.125	0.250	0.250	<u>0.125</u>	<u>0.500</u>	<u>0.250</u>	<u>*</u>
<i>F₁LS</i>	31.9	0.250	*	0.062	0.250	0.250	*	0.500	0.500	0.250	*
<i>F₂LS</i>	43.1	0.500	1.000	0.031	0.250	0.125	*	<u>0.125</u>	<u>0.250</u>	<u>0.125</u>	<u>0.125</u>
<i>F₃LS</i>	13.3	0.500	0.500	0.062	0.250	0.250	0.500	0.250	0.250	0.125	0.250
<i>F₄LS</i>	4.9	0.250	1.000	0.125	0.250	0.250	*	0.250	0.500	0.250	*
Nystatin/		0.007	0.015	-	-	-	-	-	-	-	-
chlorhexidine digluconate		-	-	0.015	0.015	0.015	0.125	0.015	0.015	0.015	0.125

*Fungicidal/bactericidal action: MIC>1mg/mL ,

AG: A. gratissima, CA: C. articulatus, CS: C. sativum, MG: M. glomerata, LS: L. sidoides.

3.3. Effect of essential oils on biofilm formation

The oils and fractions presenting the best antimicrobial activity were selected for the assays with oral biofilms. The following crude oils and active fractions were chosen: *A. gratissima*, F₄AG, *C. articulatus*, F₄CA, *C. sativum*, *M. glomerata*, F₄MG, *L. sidoides* and F₂LS.

3.3.1. MIC/MBC/MFC biofilm

The results of MIC/MBC/MFC obtained from the selected essential oil and fractions are summarized in Table 4. The biofilm was shown ranges for MIC between 0.125 to 1 mg/mL or > 1mg/mL and MBC 0.250 to 1 mg/mL or > 1.00 mg/mL (Table 4). The essential oil of *C. articulatus* stood out, since it inhibited *C. albicans*, *F. nucleatum* and *S. sanguis* (MIC - 0.250 mg/mL) while *Aloysia gratissima* was capable at inhibited *P. Gingivalis* and *S. mitis* biofilm (MIC - 125 mg/mL and 0.250 mg/mL, respectivity).The fraction F₂LS were also efficient in inhibiting the growth of *F. nucleatum* and *S.sanguis* (MIC – 0.250mg/mL) while *C. sativum* was capable to inhibit bacteria growth *C. albicans* and *F.nucleatum* biofilm (MIC – 0.250 mg/mL).

3.3.2. Antibacterial and antifungal effects of the crude essential oils and selected fractions on biofilms

The results from the antibacterial and antifungal activities of the more active essential oils were used to determine the MBC:MIC or MFC:MIC ratio. The ratio was previously proposed by Hafidh *et al.* [23] to establish the nature of antimicrobial effect. According to authors, MBC:MIC or MFC:MIC between 01:01 - 02:01 indicate a bactericidal or fungicidal effect, while ratio higher than 2:1 indicate a bacteriostatic or fungistatic effect. The results of MIC/MBC/MFC of the crude oils and fractions which presents best activities and the mode action were shown in Table 4. Fungicidal action on the biofilm was observed for the crude oils from *M. glomerata* and *L. sidoides* and fraction F₄MG against *C. albicans*. *Lippia sidoides* oil and F₄MG presented bactericidal effect against *F. nucleatum* while only *A. gratissima* were bactericidal on *F. nucleatum* and *S.mitis*. Bactericidal action on the biofilm was observed for all oils and fractions against *S. sanguis* except for *C. sativum* and *M. glomerata*.

Table 4: Antimicrobial activity of the essential oils against biofilms (72 h) and MBC/MFC:MIC ratio.

<i>Medicinal species</i>	Microorganisms														
	<i>C. albicans</i> CBS 562			<i>F. nucleatum</i> ATCC 25586			<i>P. gingivalis</i> ATCC 33277			<i>S. sanguis</i> ATCC 10556			<i>S. mitis</i> ATCC 903		
	MIC	MBC	Ratio	MIC	MBC	Ratio	MIC	MBC	Ratio	MIC	MBC	Ratio	MIC	MBC	Ratio
<i>A. gratissima</i>	0.500	*	ND	0.500	0.500	1:1	0.125	*	ND	0.500	1.000	2:1	0.250	0.500	2:1
<i>F₄AG</i>	0.500	*	ND	0.250	1.000	4:1	0.500	*	ND	0.500	0.500	1:1	0.250	*	ND
<i>C. sativum</i>	0.250	1.000	4:1	0.250	*	ND	0.500	*	ND	0.500	*	ND	0.500	*	ND
<i>M. glomerata</i>	0.500	0.500	1:1	0.250	*	ND	1.000	*	ND	0.500	*	ND	0.500	*	ND
<i>F₄MG</i>	1.000	1.000	1:1	0.500	1.000	2:1	*	*	ND	0.500	0.500	1:1	0.500	*	ND
<i>C. articulatus</i>	0.250	0.250	1:1	0.250	0.500	2:1	0.250	1.000	4:1	0.250	0.500	2:1	0.500	1.000	2:1
<i>F₄CA</i>	1.000	*	ND	0.250	*	ND	*	*	ND	0.500	0.500	1:1	0.500	*	ND
<i>L. sidoides</i>	0.500	1.000	2:1	0.500	1.000	2:1	0.500	*	ND	0.250	0.500	2:1	0.500	*	ND
<i>F₂LS</i>	0.500	*	ND	0.250	1.000	4:1	0.250	*	ND	0.250	0.500	2:1	0.500	*	ND
Nystatin	1.000	*	ND	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Chlorhexidine	-	-	-	0.015	0.125	8:1	0.015	0.125	8:1	0.015	0.015	1:1	0.015	0.062	4:1

*Fungicidal/bactericidal action: MIC>1mg/mL

ND- Not determined

Ratio: MBC:MIC or MFC:MIC between 01:01 - 02:01 - bactericidal or fungicidal effect, while ratio >2:1 -a bacteriostatic or fungistatic effect.

3.3.3. Inhibition of biofilm formation

The results of inhibition biofilm formation for these essentials oils and fractions at 1 mg/mL are shown in Table 5. The inhibition varied from 1.00 % for the *M. glomerata* on *S. mitis* to 63.96 % for the crude oil of *C. articulatus* on *S. sanguis*. *Cyperus articulatus* inhibit the biofim formation of *C. albicans* (28.08%) and *S. sanguis* (63.96 %) while F₂LS inhibited of *F. nucleatum* (62.29 %) and *P. gingivalis* (44.41%). *Aloysia gratissima* oil was the one that most inhibited adherence of the *S. mitis* biofilm (9%). The fractions F₄AG and F₂LS presented higher percent inhibition than their respective crude oils on *C. albicans* and *F. nucleatum*, whereas F₄MG inhibited on *F. nucleatum* biofilm formation. The essential oil of *C. articulatus* stood out, since it inhibited all investigated species with highest values of biofilm formation inhibition except to *S. mitis* that have the best inhabitation by *A. gratissima*, thus were selected for further studies.

3.3.4. Effect of the *C. articulatus* and *A. gratissima* essential oils on the biofilm formation

Based on previous results at 1 mg/mL the inhibitory effect on biofilm formation were analysed in the presence of *C. articulatus* and *A. gratissima* essential oils at 0.0048 – 1mg/mL. The results summarized in Table 6 showing that *A.gratissima* inhibited the formation of *S. mitis* biofilm at the concentration of 1 mg / mL (9 %). The biofilm formation was also inhibited in the presence of *C. articulatus*, presenting a decrease in biofilm formation proportional concentrations employed. *Cypeus articulatus* essential oil inhibited the biofilm formation of *C. albicans* at concentrations from 0.00097 mg/mL (4.67 %) while the oil showed an inhibitory effect on adherence of bacterias cells at concentrations equal or greater than 0.250 mg/mL (28.24 % between 60.42%).

Table 5- Inhibition of biofilm formation (%) of the oral microorganisms in the presence of the essential oils and fractions.

<i>Medicinal species</i>	<i>Microorganisms</i>				
	<i>C. albicans</i> CBS 562	<i>F. nucleatum</i> ATCC 25586	<i>P. gingivalis</i> ATCC 33277	<i>S. sanguis</i> ATCC 10556	<i>S. mitis</i> ATCC 903
<i>EO A. gratissima</i>	12.31	55.83	39.12	60.83	<u>9.00</u>
<i>F₄AG</i>	19.23	56.46	30.88	58.13	8.50
<i>EO C. sativum</i>	23.08	55.83	39.71	58.33	1.50
<i>EO M. glomerata</i>	22.69	58.96	40.00	54.79	1.00
<i>F₄MG</i>	20.77	60.83	37.94	60.63	0.00
<i>EO C. articulatus</i>	<u>28.08</u>	<u>61.67</u>	<u>43.53</u>	<u>63.96</u>	5.00
<i>F₄CA</i>	25.77	61.25	39.41	61.67	2.50
<i>EO L. sidoides</i>	16.55	58.33	12.94	58.13	5.50
<i>F₂LS</i>	23.85	<u>62.29</u>	<u>44.41</u>	42.71	0.00
Nystatin/	29.62	—	—	—	—
Chlorhexidine digluconate	—	55.42	37.65	57.08	1.50

AG: *A. gratissima*, CA: *C. articulatus*, CS: *C. sativum*, MG: *M. glomerata*, LS: *L. sidoides*.

The values indicated in the table 0.00 demonstrated that don't have any inhibition on biofilm formation.

Table 6- Biofilm Inhibition (%) of the oral microorganisms in the presence of *C. articulatus* and *A. gratissima* essential oils.

Concentration	Microorganism									
	<i>C. albicans</i> CBS 562		<i>F. nucleatum</i> ATCC 25586		<i>P. gingivalis</i> ATCC 33277		<i>S. sanguis</i> ATCC 10556		<i>S. mitis</i> ATCC 903	
	<i>C. articulatus</i>	Nystatin	<i>C. articulatus</i>	Chlorhexidine	<i>C. articulatus</i>	Chlorhexidine	<i>C. articulatus</i>	Chlorhexidine	<i>A. gratissima</i>	Chlorhexidine
1	28.08	29.62	61.67	55.42	43.53	37.65	63.96	57.08	9.00	1.50
0.500	14.23	28.72	54.79	56.46	32.35	37.94	58.96	46.46	0.00	3.50
0.250	22.69	20.77	60.42	55.21	28.24	35.59	54.17	55.83	0.00	0.00
0.125	19.23	27.69	57.50	55.42	0.00	39.12	23.13	57.92	0.00	0.00
0.062	21.54	23.08	49.17	53.54	0.00	37.06	7.29	56.25	0.00	0.00
0.031	19.23	21.15	44.38	55.83	0.00	29.41	10.02	56.04	0.00	0.00
0.015	19.62	13.08	40.21	55.21	0.00	13.82	10.63	53.54	0.00	0.00
0.007	16.92	16.15	31.67	42.50	0.00	1.76	4.38	51.46	0.00	0.00
0.003	14.62	0.00	0.00	52.92	0.00	0.00	0.00	47.08	0.00	0.00
0.0019	17.69	0.00	0.00	48.33	0.00	0.00	0.21	50.63	0.00	0.00
0.00097	4.62	0.00	0.00	53.96	0.00	0.00	0.00	27.08	0.00	0.00
0.00048	0.00	0.00	0.00	54.17	0.00	0.00	3.54	18.33	0.00	0.00

The values indicated in the table 0.00 demonstrated that don't have any inhibition on biofilm formation.

3.4. SEM

Scanning electronic microscopy (SEM) was used to detect possible morphological alterations in the microorganisms caused by the standard drugs, essential oils (Figure 6). Through the images was not possible to observe changes in the cell morphology, but a decrease in biofilm formation and changes in biofilm structure.

3.5. Chemical composition of the oils and fractions

The chemical constituents of the selected essential oils showing the best activity were identified by CG-MS analysis, calculating the retention indices of the analytes and comparing with those in the equipment library and data found in the literature. The major compounds identified in the essential oils and fractions are best activity in planktonic cells and biofilm shown in Table 7.

According to the results obtained, the essential oil from *C. sativum* presented the best activity against the planktonic cells, whereas the *A. gratissima* and *C. articulatus* oils showed the best action in inhibiting the formation of biofilms.

The *A. gratissima* oil showed volatile terpene derivatives such as trans-pinocamphone (16.07%), β -pinene (12.01 %), guaiol (8.53 %) and trans-pinocarveol acetate (8.19 %) as major constituents while *C. sativum* essential oil presented 1-decanol (33.91 %), trans-2-decen-1-ol (23.59 %), 2 dodecen-1-ol (13.06 %), trans-2-tetradecen-1-ol (5.46%) and trans-3-hexen-1-ol (5.11 %) represented the greater part of the compounds, all derivatives from alcohols and aldehydes. The presence of large amounts of monoterpenes was found in *C. articulatus* included α -pinene (7.82 %), α -bulnesene (6.87 %) and α -copaene (6.79 %).

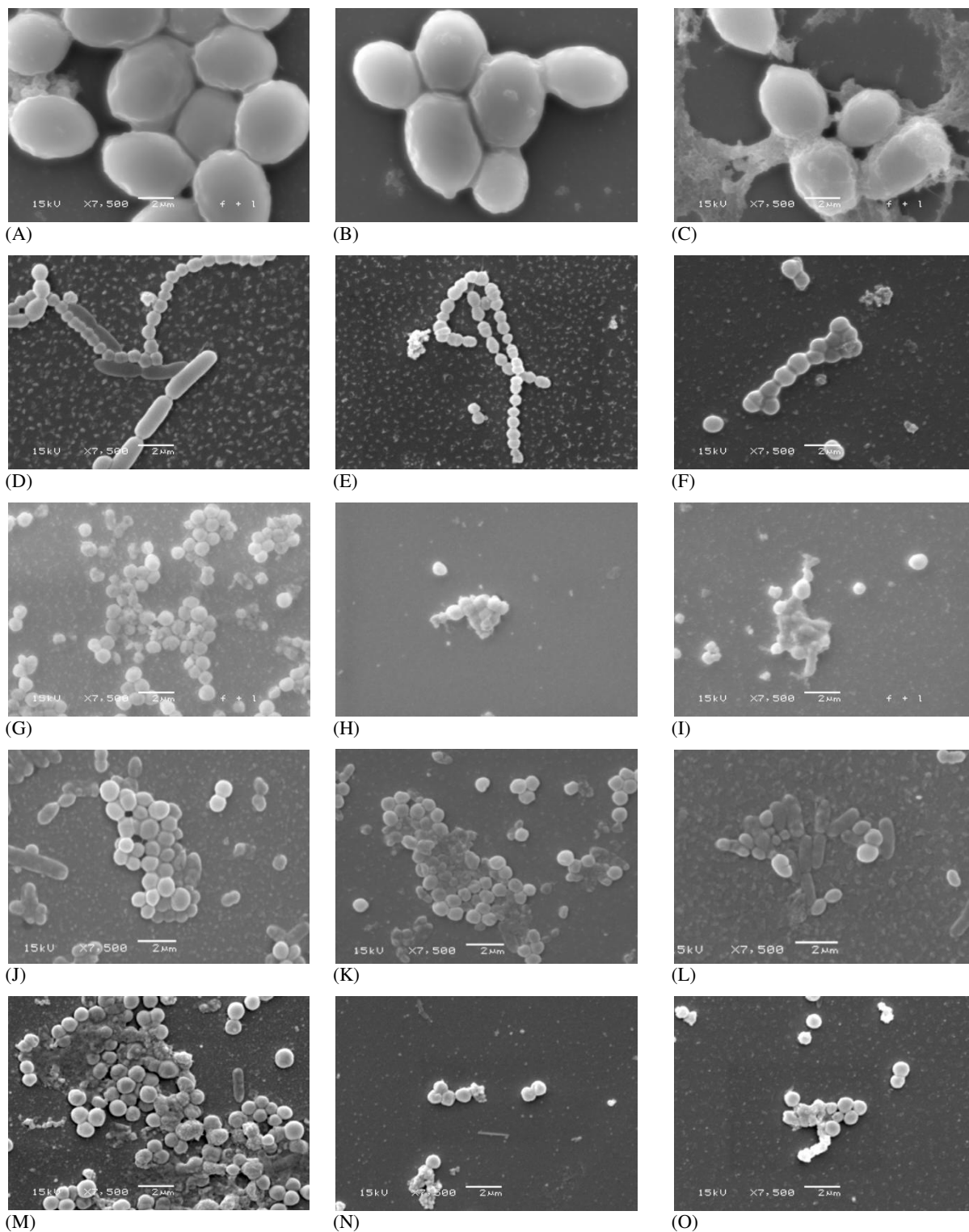


Figure 6. Scanning electron micrographs biofilms formed - 7.500x. (A) *C.albicans*; (B) *C.albicans* in the presence of *C. articulatus*; (C) *C.albicans* in the presence of Nystatin; (D) *F. nucleatum*; (E) *F. nucleatum* in the presence of *C. articulatus*; (F) *F. nucleatum* in the presence of chlorhexidine digluconate. (G) *P. gingivalis*; (H) *P. gingivalis* in the presence of *C. articulatus*; (I) *P. gingivalis* in the presence of chlorhexidine digluconate; (J) *S. mitis*; (K) *S. Mitis* in the presence of *A. gratissima*; (L) *S. Mitis* in the presence of chlorhexidine digluconate; (M) *S. sanguis*; (N) *S. sanguis* in the presence of *C. articulatus*; (O) *S. sanguis* in the presence of chlorhexidine digluconato.

Table 7 – Compounds identified in the essential oils.

Compounds ^a	RI ^b	AG ^c	CA	CS	MG	LS	F ₄ AG	F ₄ CA	F ₄ MG	F ₂ LS
3-hexen-1-ol <Z>	857			5.11						
2-hexen-1-ol <E>	868			2.17						
Cyclohexanone	899					6.50				
Nonane	901			2.70						
Alpha-pinene	933		7.82							
Beta-pinene	977	12.01	4.81							
Para-cymene	1024		0.94			17.28				
Limonene	1027	1.51	1.63		2.24					
Linalol	1101	0.49		0.77			2.62			
Trans-pinocarveol	1138	2.96	6.02				13.16	21.97		
Trans-verbenol	1144	1.59	3.08					8.43		
Trans-sabinol	1145						4.29			
Trans-pinocamphone	1161	16.07					0.84			
Alpha-phellandrene-8-ol	1167		2.25							
Para-menta-1,5-dien-8-ol	1169							8.97		
Cis-pinocamphone	1173	6.04					0.46			
Para-cymen-8-ol	1186						0.93	2.97		
Alpha-terpineol	1192						0.95	2.17		
Myrtenal	1195		3.22					9.18		
Myrtenol	1196	1.81	2.89				5.31			
Verbenone	1208		2.28					9.73		
Trans-carveol	1220						1.06	2.29		
Geraniol	1264									
1-decanol	1269			33.91						
2-decen-1-ol <E>	1271			23.59						
Geranial	1272									
Thymol	1290					65.76		0.60		97.20
Trans-pinocarveol acetate	1299	8.19								
Alpha-copaene	1373		6.79		0.82					
Trans-caryophyllene	1416	7.19			10.30	10.46				
Alpha-guaiene	1436		2.98							
2-dodecen-1-ol	1469			13.06						
Gama-murolene	1477	3.79							3.39	
Germacrene D	1481				41.77					
Beta-selinene	1482		4.50							
Alpha-selinene	1491		3.35							
Bicyclogermacrene	1493	4.20			8.69					
Alpha-bulneseno	1503		6.87							
Elemol	1547	0.48			1.03		1.64		7.39	
Germacrene b	1552				3.64					
Sphatulenol	1574	1.54			3.86		3.96		4.31	
Caryophyllene oxide	1578	2.60	4.36		4.52		1.85	0.55	5.63	0.50
Guaiol	1596	8.53					29.63			
Isolongifolan-7-alpha-ol	1620								11.58	
Murola-4,10-dien-1-beta-ol	1628								10.42	
Alpha-murolol	1646						0.77		3.45	
Alpha-cadinol	1652				3.62				25.85	
Bulnesol	1665	3.14					11.79			
Tetradecanol	1670			2.92						
2-tetradecen-1-ol <E>	1674			5.46						
Mustakone	1675		6.06							
Ishwarone	1680							8.80		
Germacre-4(15),5,10(14)-trien-1-alpha-ol	1684								5.13	
Eudesma-4(15),7-dien-1-beta-ol	1685								9.85	
Cis-thujopsene	1706		3.24					2.08		
E,E-farnesyl	1721									
Farnesol	1726									
Others compounds identified < 2%	-	10.21	7.58	8.04	8.32	-	6.55	7.39	3.77	2.31
Total		92.35	80.67	97.73	88.81	100	86.04	85.18	90.56	99.80

^aMw = molecular weight ;^bRI = retention index;^cResults expressed as % of area. AG: *A. gratissima*, CA: *C. articulatus*, CS: *C. sativum*, MG: *M. glomerata*, LS: *L. sidoides*, F₄MG: F₄ *M. glomerata*, F₄CA: F₄ *C. articulatus*, F₄AG: F₄ *A. gratissima*, F₂LS: F₂ *L. sidoides*.

4. Discussion

The antimicrobial activity of essential oils is currently the object of innumerable studies. However, the majority of these studies concerning the use of essential oils and medicinal plant extracts as oral antimicrobial agents deal with cells in the planktonic form [13,14,24]. Considering that the oral cavity is inhabited by a microbial flora organized in the biofilm form, and that ecological imbalance in this microenvironment is of great clinical relevance, there is a need for further studies on the action mechanisms of natural products able to control the biofilm formation.

As there is no accord regarding the satisfactory inhibition level for natural products, this study considered the definition proposed by Duarte *et al.* [25], which antimicrobial activity was classified as strong, moderate or weak when the value for MIC was up to 0.5 mg/mL, from 0.51 to 1.0 mg/mL or above 1.1 mg/mL, respectively. Thus, according to the results obtained for the present study, the essential oils showing moderate to strong antimicrobial activity against the microorganisms evaluated, with MIC values between 0.007 and 1.00 mg/mL (Table 2). The fractions, F₄MG, F₄CA, F₄AG and F₂LS showed strong antimicrobial activity (MIC between 0.031 and 0.500 mg/mL) and a greater inhibitory capacity against the microorganisms when compared to the respective crude essential oil, as can be seen from MIC values for at least one microorganism evaluated (Table 3). With respect to the other fractions, despite the important antimicrobial activity observed, they did not present greater inhibitory capacity than the crude essential oils, and were therefore not used in the subsequent trials.

In order to compare the results obtained for the antimicrobial activity of the essential oils with nystatin and chlorhexidine digluconate, the drugs being more active than the essential oils and their fractions (MIC between 0.007 and 0.015 mg/mL), with the exception of the activity observed for the crude *C. sativum* oil against *C. albicans*. Considering that we are comparing the effects of a monodrug (chlorhexidine or nystatin) and a crude natural product (EO) that consists of numerous compounds with synergistic capabilities and interfering, it is observed that the natural product is as

active as drugs in relation to the strains analyzed demonstrating its potential application as an antimicrobial.

The essential oil of *C. sativum* stood out, since it inhibited all investigated species with MIC lowest values, varieting from 0.007 to 0.250 mg/mL, and for MBC from 0.015 to 0.500 mg/mL (Table 2). The same had been observed for *C. articulatus* and *M. glomerata*, with MIC and MBC values only superiors from those of *C. sativum* for the bacteria *S. sanguis* e *S. mitis* (from 0.062 to 0.500 mg/mL), whereas the essential oil from *A. gratissima* was active against *C. albicans* (Table 2).

The marked activity found for the oil from *C. sativum* in the present study was verified for different standard and clinical isolates of *Candida* spp species (MIC 0.007 to 0.500 mg/mL) [26]. The inhibitory effects of the oil from *C. articulatus* have also been described against bacteria such as *Bacillus megaterium*, *B. cereus*, *S. piogenes*, *Escherichia coli* and *Proteus mirabilis* [27]. In the present research, the oil from *L. sidoides* was capable of inhibiting *S. mitis* and *S. sanguis* with values for MIC higher than those observed by Botelho *et al.* [28] (MIC from 0.625 to 10 mg/mL), who carried out an analogous study.

In a general analysis of the results obtained, all the microbial strains planktonic presented elevated susceptibility to the essential oils selected as compared to biofilm. Planktonic cells presented elevated susceptibility to the essential oils fractions selected showing MIC values from 0.007 to 0.500 mg/mL and MBC from 0,015 to 1 mg/mL or > 1.00 mg/mL (Table 2). The biofilm was shown that they presented less susceptibility as compared to planktonic cells, with ranges for MIC between 0.125 to 1 mg/mL or > 1mg/mL and MBC 0.250 to 1 mg/mL or > 1.00 mg/mL (Table 4).

The essential oil of *C. articulatus* stood out, since it inhibited all investigated species with biofilm MIC/MBC lowest values, varieting from 0.250 to 1.00 mg/mL, except to *S. mitis* that have the best inhabitation by *A. gratissima* whith a biofilm MIC/MBC 0.250 and 0.500, respectivity

(Table 4). The biofilm MIC/MBC values of the F2LS and *L. sidoides* oil essential for *S. sanguis* also demonstrated the equal activity (MIC 0.250 mg/mL).

Microbial biofilms are more resistant to a great variety of antimicrobial agents than in planktonic cells like was previously reported by various authors in the literature [29,30]. Chandra [31] showed that the antifungal agents used were much less active against *C. albicans* biofilms than against the planktonic cells, and that the concentrations required to reach 50 % inhibition of the metabolic activity were from 5 to 8 times higher. *Eucalyptus* oil and its major component 1,8-cineol, alone, or synergically with chlorhexidine digluconate were used against biofilm cultures, including those of *C. albicans* showing better activity of the oil and its component against the planktonic microorganisms [32].

The decrease in susceptibility of the biofilm can be explained by the occurrence of various resistance mechanisms, which are still not completely understood given by the expression of resistance genes, and which can be attributed to a decrease in the rate of cell growth, particularly to those situated close to the adherence surface [33]. The decrease in the adherence of the biofilms and changes in their formation and organization observed in the present study through the SEM images was demonstrated previously in the literature [29,34].

The most essential oils and fractions showed MBC: MIC or MFC: MIC ratio (Table 4) which allowed classifying their mode of action. *Cyperus articulatus* stood out showing bactericidal effect against all microorganisms studied. Therefore, it can be considered as a new source of an antibacterial agent with great potential against oral pathogens. The mode of bactericidal and fungicidal action observed for the oil of *C. articulatus* may be related to possible mechanisms of action presented by its major components. *Cyperus articulatus* presents compounds as α - and β -pinene that could be able to destroy cell integrity, and inhibit respiration and the ion transport processes, leading to cell death [35]. They exerted a considerable antibacterial effect, especially on

a methicilline-resistant *Staphylococcus aureus* and on Gram-positive and Gram-negative bacteria [36].

The results showed *C. articulatus*, *A. gratissima* and F₂LS demonstrated the highest percentages of inhibition of biofilm formation. The results showed no differences between the action of the *C. articulatus* oil and the fraction F₂LS on the *F. nucleatum* and *P. gingivalis* biofilms. Thus, the crude *C. articulatus* oil showed the best results percentage inhibition (28.08 to 63.96 %), whilst the *A. gratissima* oil was the one that most inhibited adherence of the *S. mitis* biofilm (9%).

In general, chlorhexidine inhibited the formation of biofilms by the microorganisms under study at lower concentrations than the essential oils. Nevertheless when higher concentrations of the oils were used, the effects of these and of the chlorhexidine were similar, suggesting that would be possible to obtain the same effect as that conferred by the drug on formation biofilm. In relation to *C. albicans* essential oil of *C. articulatus* inhibits yeast growth at concentrations similar to those of nystatin above 0.007 mg/mL, percentage of inhibition of 28.08 % and 29.62 % respectively.

The data presented on the MIC / MBC / MFC biofilm, inhibition formation and mode action showed the *A. gratissima* essential oils (stood out against *S. mitis* MIC-0.250 mg/mL, percentual inhibition – 9% and bactericidal effect) and *C. articulatus* (MIC - 0.250 mg/mL, percentual inhibition – 28.08 at 63.96% and bactericidal effect except *P. gingivalis*) showing potential in relation to other studies, confirming its promising antimicrobial activity.

The analyses showed that the main compounds present in *C. sativum* were 1-decanol, trans-2-decen-1-ol , 2 dodecen-1-ol , trans-2 tetradecen-1-ol , trans-3-hexen-1-ol (76.02 % oil, Table 7). These substances were previously described for *C. sativum* oil [37] and are all volatile substances derived from alcohols and aldehydes. The anti-*Candida* activity of these compounds was verified by Furletti *et al.* [26], who used standards such as cis-2-hexen-ol, trans-2-hexen-ol, trans-3-hexen-ol and 1-decanol in the activity tests, comparing their action with that of the fractions obtained from the crude *C. sativum* oil against standard strains and clinical isolates of *C. albicans*. In this study all

the standards showed strong inhibitory activity against the yeasts (MIC up to 0.5 mg/mL). The action mechanism of *C. sativum* suggested by the literature might include the inhibition of proton motive force and electron transfer, inhibition of the respiratory chain and decrease in substrate oxidation promoting membrane damage, which leads to cell death [38].

In the present study, the main compounds identified in the crude *A. gratissima* oil were trans-pinocamphone, β -pinene, guaiol and trans-pinocarveol acetate (44.80 % oil, Table 7). Various authors have already shown the efficacy of the antibacterial activity of β -pinene against both Gram-positive and Gram-negative bacteria [39,40] who also studied the action mechanisms of these compounds against microbial cells showing physical damage and morphological alterations of the cell membrane and its functions. The β -pinenes also showed anti-*Candida* properties in earlier studies [41].

The terpenoid compounds α -pinene, α -bulnesene and α -copaene were found in the *C. articulatus* oil (21.48 % oil, Table 7), and essential oils rich in α -pinene have already shown potential antimicrobial activity [42,43]. Oyediji & Afolayan [44] showed that monoterpene bicarbonates and terpenes showed moderate to strong antimicrobial activity against Gram-positive bacteria. It has also been shown that monoterpene compounds destroy microbial cell integrity by inhibiting the respiratory process and by mechanisms of transport and adhesion to lipophilic components of the cytoplasmatic membrane [35,45,46]. One of these mechanisms of action proposed by the authors may have occurred in the present study by use of *A. gratissima*, *C. articulatus* and *C. sativum* essential oils, against the oral pathogens studied. However, further studies should be developed in order to demonstrate the mechanisms by which the oils and their compounds act on the cells.

5. Conclusion

The results showed an important contribution to the definition of the antimicrobial activity of essential oils, including species of the Brazilian flora, indicating the potential of the plants in the prevention of oral cavity diseases. The action of the essential oil of *C. sativum* against planktonic cells of *C. albicans* stood out from others essential oils showing the lowest values of inhibition against all microorganisms. The crude *C. articulatus* oil showed the best results percentage inhibition on biofilm while the *A. gratissima* inhibited the *S. mitis* biofilm formation to great extent. The oils from these plants can be considered as new sources of antibacterial agent with great potential against oral pathogens.

6. Acknowledgements

The authors thank FAPESP (São Paulo Research Foundatio - Brazil) and CNPq (National Council for Scientific and Technological Development - Brazil) for the financial support.

7. References

1. Kolenbrander PE. Oral microbial communities: biofilms, interactions, and genetic systems. *Annu Rev Microbiol.* 2000; 54: 413-437.
2. Spratt PA, Pratten J. Biofilms and the oral cavity. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology.* 2003; 2: 463-467.
3. Kolenbrander PE. Multispecies communities: interspecies interactions influence growth on saliva as sole nutritional source. *Int J Oral Sci.* 2011; 3(2):49-54.
4. Marsh PD. Dental plaque: biological significance of a biofilm and community life-style. *Journal of Clinical Periodontology.* 2005; 32: 7-15.
5. Bernimoulin JP. Recent concepts in plaque formation. *J Clin Periodontol.* 2003; 30(5): 7-9.
6. Marsh PD. Are dental diseases examples of ecological catastrophes? *Microbiology.* 2003; 149: 279-94.
7. Filoche SK, Soma K, Sissons CH. Antimicrobial effects of essential oils in combination with chlorhexidine digluconate. *Oral Microbiol Immunol.* 2005; 20(4): 221-5.
8. Rosenthal S, Spangberg L, Safavi K, Conn F. Chlorhexidine substantivity in root canal dentin. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2004; 98: 488-92.
9. Zheng CY, Wang ZH. Effects of chlorhexidine, listerine and fluoride listerine mouthrinses on four putative root-carries pathogens in the biofilm. *Chin J Dent Res.* 2011; 14(2): 135-140.

10. Lang G, Buchbauer G. A review on recent research results (2008-2010) on essential oils as antimicrobials and antifungals. A review. *Flavour and Fragrance Journal*. 2012; 27(1): 13-39.
11. Calsamiglia S, Busquet M, Cardozo PW, Castillejos L, Ferret A. Invited review: essential oils as modifiers of rumen microbial fermentation. *Journal of Dairy Science*. 2007; 6(90): 2580-2595.
12. Khan A, Ahmad A, Akhtar F, Yousuf S, Xess I, Khan LA, Manzoor N. Induction of oxidative stress as a possible mechanism of the antifungal action of three phenylpropanoids. *FEMS Yeast Res*. 2011; 11: 114-122.
13. Cha JD, Jeong MR, Jeong SII, Moon SE, Kil BS, Yun SII, Lee KY, Song YH. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Cryptomeria japonica*. *Phytotherapy*. 2007; 21: 295-299.
14. Maggi F, Cacchini C, Cresci A, Coman MM, Tirillini B, Sagratini G, Papa F, Vittori S. Chemical composition and antimicrobial activity of *Hypericum hircinum* L. Subsp. *majus* essential oil. *Chemistry of Natural Compounds*. 2010; 1(46): 125-129.
15. Nascimento PFC, Alviano WS, Nascimento ALC, Santos PO, Arrigoni-Blank MF, Jesus RA, Azevedo VG, Alviano DS, Bolognese AM, Trindade RC. *Hyptis pectinata* essential oil: chemical composition and anti-*Streptococcus mutans* activity. *Oral Diseases*. 2008; 14: 485-489.
16. Gorelov VE, Aksel'rod LS, Migalinskaya LN. An investigation of the hydraulics and effectiveness of fractionation columns with sieve packing. *Chem Petrol Eng*. 1971; 7(3): 211-214.
17. CLSI. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Norma M27-A2. Método de referência para testes de diluição em caldo para determinação da sensibilidade de leveduras à terapia antifúngica. 2ed. Pennsylvania: NCCLS; 2002. 51p.
18. CLSI. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Norma M7-A6. Metodologia dos testes de sensibilidade a agentes antimicrobianos por diluição para bactéria de crescimento aeróbico. 6.ed. Pennsylvania: NCCLS; 2005.
19. Niu C & Gilbert ES. Colorimetric Method for Identifying Plant Essential Oil Components that Affect Biofilm Formation and Structure. *Applied and Environmental Microbiology*. 2004; 70(12): 6951-56
20. Djordjevic D, Wiedmann M, McLandsborough LA. Microtiter plate assay for assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm formation. *Appl Environ Microbiol*. 2002; 68(6): 2950-2958.
21. Hawser SP & Douglas LJ. Biofilm formation by *Candida* species on the surface of catheter materials *in vitro*. *Infection and Immunity*. 1994; 62(3): 915-21.
22. Adams, RP. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. Allured Publishing. 2007; 4: 804.
23. Hafidh RR, Abdulmir AS, Vern LS, Bakar FA, Abas F, Jahanshiri F, Sekawi Z. Inhibition of growth of highly resistant bacterial and fungal pathogens by a natural product. *The Open Microbiology Journal*. 2011; 5: 96-106.
24. Yang JK, Choi MS, Seo WT, Rinker DL, Han SW, Cheong GW. Chemical composition and antimicrobial activity of *Chamaecyparis obtusa* leaf essential oil. *Fitoterapia*. 2007; 78: 149-152.
25. Duarte MCT, Figueira GM, Sartoratto A, Rehder VL, Delarmelina C. Anti-*Candida* activity of Brazilian medicinal plants. *J Ethnopharmacol*. 2005; 97(2): 305-11.

26. Furletti VF, Teixeira IP, Obando-Pereda G, Mardegan RC, Sartoratto A, Figueira GM, Duarte RMT, Rehder VLG, Duarte MCT, Höfling JF. Action of *Coriandrum sativum* L. essential oil upon oral *Candida albicans* biofilm formation. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2011; 1-9.
27. Oladusu IA, Usman LA, Olawore NO, Atata RF. Antibacterial activity of rhizomes essential oils of types of *Cyperus articulatus* Growing in Nigeria. *Advances in Biological Research*. 2011; 5(3): 179-183.
28. Botelho MA, Nogueira NAP, Bastos GM, Fonseca SGC, Lemos TLG, Matos FJA, Montenegro D, Heukelbach J, Rao VS, Brito GAC. Antimicrobial activity of the essential oil from *Lippia sidoides*, carvacrol and thymol against oral pathogens. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2007; 40: 349-356.
29. Donlan RM & Costerton JW. Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. *Clin Microbiol Rev*. 2002; 15: 167-93.
30. Hope CK, Wilson M. Analysis of the effects of chlorhexidine on oral-biofilm vitality and structure based on viability profiling and an indicator of membrane integrity. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004; 48: 1461-1468.
31. Chandra J. Antifungal resistance of *Candida* biofilms formed on denture acrylic *in vitro*. *J Dent. Res*. 2003; 80 903-8.
32. Hendry ER, Worthington T, Conway BR, Lambert PA. Antimicrobial efficacy of eucalyptus oil and 1,8-cineole against microorganisms grow in planktonic and biofilm cultures. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2009; 64: 1219-1225.
33. Douglas LJ. *Candida* biofilms and their role in infection. *Trends in Microbiol*. 2004; 11(1): 30-36.
34. Mah TFC, O'Toole GA. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol*. 2004; 9: 34-9.
35. Carson CF, Me BJ, Riley TV. Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage, and salt tolerance assays and electron microscopy. *Antimicrobial Agents and Chemoterapy*. 2002; 46: 1914-1920.
36. Martins A, Salgueiro LR, Gonçalves MJ, Proença SC, Vila A, Canigüeral R. Essential oil composition and antimicrobial activity of *Santiria trimera* bark. *Planta Med*. 2003; 69: 77-9.
37. Begnami AF, Duarte MCT, Furletti V, Rehder VLG. Antimicrobial potential of *Coriandrum sativum* L. against different *Candida* species *in vitro*. *Food chemistry*. 2010; 118: 74-77.
38. Silva F, Ferreira S, Queiroz JA, Domingues FC. Coriander (*Coriandrum sativum* L.) essential oils: its antibacterial activity and mode of action evaluated by flow cytometry. *Journal of Medical Microbiology*. 2011; 60(10): 1479-1486.
39. Dorman H, Deans S. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *J Appl. Microbiol*. 2000; 88: 308-316.
40. Mercier B, Prost J, Prost M. The essential oil of turpentine and its major volatile fraction (alpha- and beta-pinenes): a review. *Int. J. Occup. Med. Environ. Health* .2009; 22: 331-342.

41. Khan A, Ahmad A, Akhtar F, Yousuf S, Xess I, Khan LA, Manzoor N. *Ocimum sanctum* essential oil and its active principles exert their antifungal activity by disrupting ergosterol biosynthesis and membrane integrity. *Res. Microbiol.* 2010; 161:816-23.
42. Delaquis PJ, Stanich K, Girard B, Mazza G. Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils. *Int. J. Food Microbiol.* 2001; 74: 101-109.
43. Kim K, Kim Y, Yu H, Jeong S, Cha J, Kil B, You Y. Antibacterial activity and chemical composition of essential oil of *Chrysanthemum boreal*. *Planta Med.* 2003; 69: 274-277.
44. Oyedeji O, Afolayan A. Comparative study of essential oil composition and antimicrobial activity of *Leonotis leomurus* and *L-ocymifolia* in the Eastern Cape. *African J. Bot.* 2005; 71: 114-116.
45. Pavithra PS, Sreevidya N, Verma RS. Antibacterial activity and chemical composition of essential oil of *Pamburus missionis*. *J. Ethnopharmacol.* 2009; 124: 151-153.
46. Magwa ML, Gundidza M, Gwerua N, Humphrey G. Chemical composition and biological activities of essential oil from the leaves of *Sesuvium portulacastrum*. *Journal of Ethnopharmacology.* 2006; 103: 85-89.

4. CONCLUSÃO

1. Os óleos essenciais das diferentes espécies de plantas medicinais estudados apresentaram atividade antimicrobiana de moderada a forte contra os microorganismos avaliados, com valores de MIC entre 0,007 e 1 mg/mL.

2. O óleo essencial de *C. sativum* se destacou, uma vez que inibiu todas as espécies estudadas com os mais baixos valores de MIC, que variou 0,007 a 0,250 mg/mL, e CBM de 0,015 a 0,500 mg/mL

3. O óleo de *C. articulatus* mostrou o mais amplo espectro de ação em relação a inibição de formação de biofilme com percentual de inibição variando de 28,08 % a 63,96 %, enquanto o óleo de *A. gratissima* foi o que mais inibiu a aderência do biofilme de *S. mitis* (9 % de inibição).

4. As células microbianas planctônicas apresentaram maior susceptibilidade aos óleos essenciais de melhor atividade mostrando os valores de MIC 0,007 a 0,500 mg/mL e CBM de 0,015 a 1 mg/mL ou maior que 1 mg/mL enquanto os biofilmes apresentaram menor susceptibilidade com intervalos de MIC e CBM entre 0,125 a 1 mg/mL ou maior que 1,00 mg/mL

5. Através da análise das imagens do MEV não foi possível observar alterações na morfologia celular, observando-se a redução na formação e alteração na organização da estrutura morfológica do biofilme.

6. A análise química por CGMS do *C. sativum* detectou compostos majoritários derivados dos álcoois e aldeídos enquanto *Cyperus articulatus* e *A. gratissima* apresentaram compostos mono e sesquiterpenos.

5. REFERÊNCIAS ¹

- Almeida RVD, Castro RD, Pereira MSV, Paulo MQ, Santos JP, Padilha WWN. Efeito clínico de solução anti-séptica a base de própolis em crianças cárie ativas. *Pesq Bras Odontoped Clin Integr*. 2006; 1(6): 87-92.
- Bernimoulin JP. Recent concepts in plaque formation. *J Clin Periodontol*. 2003; 30(5): 7-9.
- Botelho MA, Nogueira NAP, Bastos GM, Fonseca SGC, Lemos TLG, Matos FJA, Montenegro D, Heukelbach J, Rao VS, Brito GAC. Antimicrobial activity of the essential oil from *Lippia sidoides*, carvacrol and thymol against oral pathogens. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2007; 40: 349-356.
- Calsamiglia S, Busquet M, Cardozo PW, Castillejos L, Ferret A. Invited review: essential oils as modifiers of rumen microbial fermentation. *Journal of Dairy Science*. 2007; 6(90): 2580-2595.
- Carson CF, Me BJ, Riley TV. Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage, and salt tolerance assays and electron microscopy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2002; 46: 1914-1920.
- Cha JD, Jeong MR, Choi HJ, Jeong SII, Moon SE, Yun SII, Kim YH, Kil BS, Song YH. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Artemisia lavandulaefolia*. *Planta Med*. 2005; 71: 575-577.
- Cha JD, Jeong MR, Jeong SII, Moon SE, Kil BS, Yun SII, Lee KY, Song YH. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Cryptomeria japonica*. *Phytotherapy*. 2007; 21: 295-299.
- Charles CH, Mostler KM, Bartels LL, Mankodi SM. Comparative antiplaque and antigingivitis effectiveness of a chlorhexidine and an essential oil mouthrinse: 6-month clinical trial. *J Clin Periodontol*. 2004; 31: 878-84.
- Cox SD, Markham JL. Susceptibility and intrinsic tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* to selected plant volatile compounds. *Journal of Applied Microbiology*. 2007; 103: 930-936.
- Cragg GM, Grothaus PG, Newman DJ. Impact of Natural Products on Developing New Anti-Cancer Agents. *Chem. Rev*. 2009; 109 (7): 3012-43
- Cristani M, D'Arrigo M, Mandalari G, Castelli F, Sarpietro MG, Micieli D, Venuti V, Bisignano G, Saija A, Trombetta D. Interaction of Four Monoterpenes Contained in Essential Oils with Model Membranes: Implications for Their Antibacterial Activity. *Agric. Food Chem*. 2007; 55: 6300-6308.

- Duarte MCT, Figueira GM. Anti-*Candida* activity of extracts and essential oils from native and exotic medicinal plants in Brazil. In Maria Cecilia Carpinella, Mahendra Rai (Org). Novel Therapeutic Agents from Plants. 1st ed. New Hampshire: Science Publishers, 2008.
- Duarte MCT, Leme EE, Delarmelina C, Soares AA, Figueira GM, Sartoratto A. Activity of essential oils from Brazilian medicinal plants on *Escherichia coli*. J Ethnopharmacology. 2006; 111: 197-201.
- Filoché SK, Soma K, Sissons CH. Antimicrobial effects of essential oils in combination with chlorhexidine digluconate. Oral Microbiol Immunol. 2005; 20(4): 221-225.
- Furletti VF, Teixeira IP, Obando-Pereda G, Mardegan RC, Sartoratto A, Figueira GM, Duarte RMT, Rehder VLG, Duarte MCT, Höfling JF. Action of *Coriandrum sativum* L. essential oil upon oral *Candida albicans* biofilm formation. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. 2011; 1-9.
- Hajlaoui H, Trabelsi N, Noumi E, Snoussi M, Fallah H, Ksouri R, Bakhrouf A. Biological activities of the essential oils and methanol extract of two cultivated mint species (*Mentha longifolia* and *Mentha pulegium*) used in the Tunisian folkloric medicine. World J Microbiol Biotechnol. 2009; 25: 2227-2238.
- Hammer KA, Dry L, Johnson M, Michalak EM, Carson CF, Riley TV. Susceptibility of oral bacteria to *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil in vitro. Oral Microbiol Immunol. 2003; 18: 389-392.
- Karpanen TJ, Worthington T, Hendry ER, Conway BR, Lambert PA. Antimicrobial efficacy of chlorhexidine digluconate alone and in combination with eucalyptus oil, tea tree oil and thymol against planktonic and biofilm cultures of *Staphylococcus epidermidis*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2008; 62: 1031-1036.
- Khan A, Ahmad A, Akhtar F, Yousuf S, Xess I, Khan LA, Manzoor N. *Ocimum sanctum* essential oil and its active principles exert their antifungal activity by disrupting ergosterol biosynthesis and membrane integrity. Res. Microbiol. 2010; 161:816-23.
- Khan A, Ahmad A, Akhtar F, Yousuf S, Xess I, Khan LA, Manzoor N. Induction of oxidative stress as a possible mechanism of the antifungal action of three phenylpropanoids. FEMS Yeast Res. 2011; 11: 114-122.
- Kolenbrander PE. Oral microbial communities: biofilms, interactions, and genetic systems. Annu Rev Microbiol. 2000; 54: 413-437.
- Kolenbrander PE. Multispecies communities: interspecies interactions influence growth on saliva as sole nutritional source. Int J Oral Sci. 2011; 3(2):49-54.

Maggi F, Cacchini C, Cresci A, Coman MM, Tirillini B, Sagratini G, Papa F, Vittori S. Chemical composition and antimicrobial activity of *Hypericum hircinum* L. Subsp. *majus* essential oil. Chemistry of Natural Compounds. 2010; 1(46): 125-129.

Marinho BVS, Araújo ACS. O uso dos enxaguatórios bucais sobre a gengivite e o biofilme dental. International Journal of Dentistry. 2007; 6(4): 124-131.

Marsh PD. Are dental diseases examples of ecological catastrophes? Microbiology. 2003; 149: 279-94.

Magwa ML, Gundidza M, Gwerua N, Humphrey G. Chemical composition and biological activities os essential oil from the leaves of *Sesuvium portulacastrum*. Journal of Ethnopharmacology. 2006; 103: 85-89.

Marsh PD. Dental plaque: biological significance of a biofilm and community life-style. Journal of Clinical Periodontology. 2005; 32: 7–15.

Mulyaningsih S, Sporer F, Zimmermann S, Reichling J, Wink M, Sinergistic properties of terpenoids aromadendrene and 1,8-cineole from the essential oil of *Eucalyptus globulus* against antibiotic-susceptible and antibiotic-resistant pathogens. Phytomedicine. 2010; 17: 1061-1066.

Nascimento PFC, Alviano WS, Nascimento ALC, Santos PO, Arrigoni-Blank MF, Jesus RA, Azevedo VG, Alviano DS, Bolognese AM, Trindade RC. *Hyptis pectinata* essential oil: chemical composition and anti-*Streptococcus mutans* activity. Oral Diseases. 2008; 14: 485-489.

Newman DJ, Cragg GM. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. J Nat Prod. 2007; 70: 1022–1037.

Omidbeygi M, Barzegar M, Hamidi Z, Nafhdibadi H. Antifungal activity of thyme, summer savory and clove essential oils against *Aspergillus flavus* in liquid medium and tomato paste. Food. 2007; 18: 1518-1523.

Oladusu IA, Usman LA, Olawore NO, Atata RF. Antibacterial activity of rhizomes essential oils of types of *Cyperus articulatus* Growing in Nigeria. Advances in Biological Research. 2011; 5(3): 179-183.

Rosenthal S, Spangberg L, Safavi K, Conn F. Chlorhexidine substantivity in root canal dentin. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2004; 98: 488-92.

Sangwan NS, Farooqi AHA, Shabih F, Sangwan RS. Regulation of essential oil production in plants. Plants growth Reg. 2001; 34: 3-21.

Sartoratto A, Machado ALM, Delarmelina C, Figueira GM, Duarte MCT, Rehder VLG. Composition and antimicrobial acitivity of essential oils from aromatic plants used in Brazil.

Br J Microbiol. 2004; 35: 275-80.

Semenoff TADV, Semenoff-Segundo A, Biasoli ER. Efetividade antimicrobiana in vitro de enxaguatórios bucais frente aos microrganismos *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*. Rev. Odonto Ciência. 2008; 23(4): 351-354.

Souza DH, Yamamoto CH, Pinho JJRC, Alves MS, Araújo ALA, Sousa OV. Atividade antibacteriana frente aos *Streptococcus mutans* e estabilidade de produtos naturais contendo extrato de *Mikania glomerata sprengel*. HU revista. 2006; 32(1): 11-14.

Spratt PA, Pratten J. Biofilms and the oral cavity. Reviews in Environmental Science and Biotechnology. 2003; 2: 463-467.

Takarada K, Kimizuka R, Takahashi N, Honma K, Okuda K, Kato T. A comparison of the antibacterial efficacies of essential oils against oral pathogens. Oral Microbiol Immunol. 2004; 19: 61-64.

Trovati G, Chierice GO, Sanches EA, Galhiane MS. Essential oil composition of *Aloysia gratissima* from Brazil. Journal of Essential Oil Research. 2009; 21: 325-326.

Yatsuda R, Rehder VLG, Rosalen PL, Koo, H. Estudo in vitro da ação antimicrobiana de duas espécies do gênero *Mikania* (Asteraceae) sobre estreptococos orais. Brazilian Oral Research. 2006; 20: 227-227.

Zoghbi MGB, Andrade EHA, Oliveira AJ, Carreira LMM. Yield and chemical composition of the essential oil of the stems and rhizomes of *Cyperus articulatus* L. cultivated in the state of Pará, Brazil. J. Essect. Oil Res. 2006; 18: 10-12.

Zheng CY, Wang ZH. Effects of chlorhexidine, listerine and fluoride listerine mouthrinses on four putative root-caries pathogens in the biofilm. Chin J Dent Res. 2011; 14(2): 135-140.

- 1 Baseada na norma do International Committee of Medical Journal Editors – Grupo Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o PubMed

APÊNDICE

Apêndice 1:

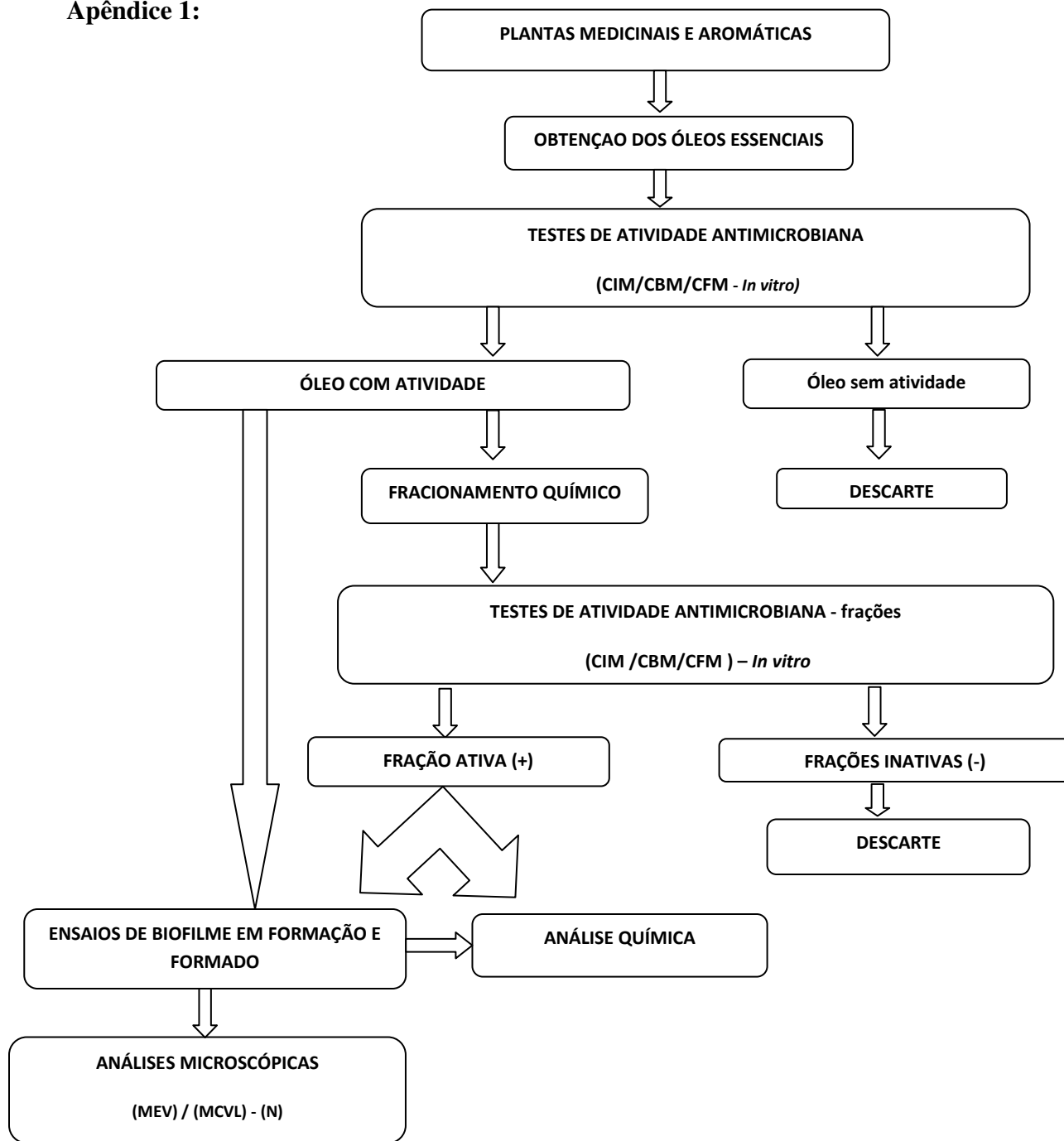


Figura 1: Fluxograma experimental desde a obtenção do óleo essencial até o fracionamento químico dos óleos que apresentaram resposta biológica positiva *in vitro*, bem como análises químicas, ensaios em biofilme e análises microscópicas.

Apêndice 2:

Tabela 1: Rendimento em óleo essencial (%) das plantas medicinais e aromáticas utilizadas no presente trabalho.

Espécie Medicinal	Nome Popular	No. CPMA	Umidade (%)	Massa da planta Fresca (g)	Massa do óleo (g)	Rendimento em óleo (%)
<i>Aloysia gratissima</i> (Giil & Hook)	Alfazema do Brasil	714	67,01	1196	4,3556	1,10
<i>Aloysia triphylla</i> (L'Hér.) Britton	Aloisia	274/700	70,22	889	1,6787	0,27
<i>Alpinia speciosa</i> (Pers.) Burt & Smith	Colônia	447	76,13	1930	0,9946	0,22
<i>Baccharis dracunculifolia</i> DC	Vassourinha	1841	39,25	1020	3,2023	0,80
<i>C. martini</i> (Roxb.) J.F. Watson	Palmarosa	354	42,01	907,36	5,3421	0,59
<i>C. winterianus</i> Jowitt.	Citronela	712	47,18	446,75	3,1295	1,48
<i>Cinnamomum zeylanicum</i> Blume	Canela	455	49,69	814	0,8918	0,22
<i>Coriandrum sativum</i> L.	Coentro	664	90,79	12080	3,2316	0,29
<i>Cymbopogon citratus</i> (DC) Stapf	Capim-limão	503	23,78	930,36	2,5045	1,13
<i>Cyperus articulatus</i> Vahl	Piprioca	222	57,99	1394	2,9604	0,50
<i>Elyonurus muticus</i> Spreng	Agripalma	1701	52,62	1347	3,9115	0,61
<i>Eugenia florida</i> DC.	Guamirin-cereja	1685	18,78	661	0,4209	0,34
<i>Eugenia uniflora</i>	Pitanga	1816	21,60	796	4,7537	0,76
<i>L. sidoides</i> Cham.	Alecrim pimenta	398/399	60,51	655	12,0979	4,67
<i>Lippia alba</i> (Mill) N.E. Brown	Falsa melissa	467/509	75,68	554,22	0,412	0,30
<i>Mentha piperita</i> L.	Hortelã	560	76,68	350,18	1,8943	2,22
<i>Mikania glomerata</i> Spreng	Guaco	766	82,70	1718	1,1981	0,40
<i>Siparuna guianenses</i> Albl.	Limão-bravo	2025	36,78	1250	2,31	0,29
<i>Syzygium aromaticum</i> (L.) Merr. & L. M. Perry	Cravo-da-Índia	455	87,93	1500	6,0714	0,46
<i>Ziziphus joazeiro</i> Mart	Juá	2119	30,27	400	0,557	0,46

Apêndice 3:

Tabela 1. Rendimento (%) das frações dos óleos essenciais fracionados por CCD em coluna seca.

Planta Medicinal	Rendimento % Frações			
	F1	F2	F3	F4
<i>A. gratissima</i>	25,7	11,12	26,94	16,48
<i>C. sativum</i>	24,88	39,20	15,20	9,20
<i>C. articulatus</i>	9,2	9,41	24,51	26,16
<i>L. sidoides</i>	31,96	43,12	13,34	4,96
<i>M. glomerata</i>	42,8	14	7,2	2,56

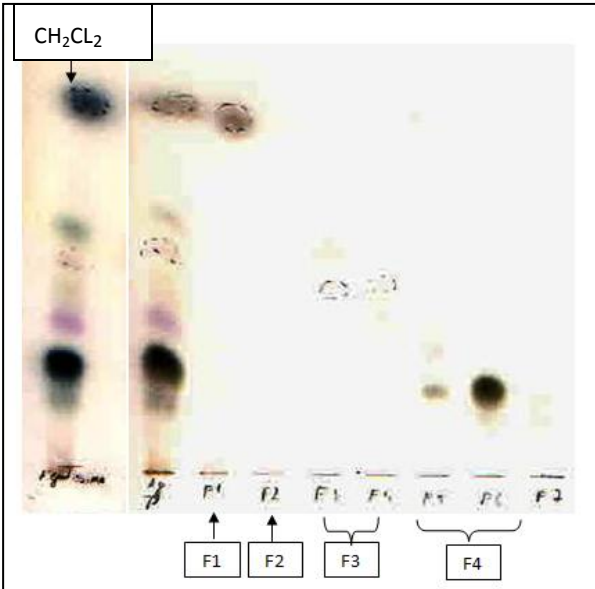


Figura 3.1 – CCD do OE. *A. gratissima* e frações
Eluente: CH₂CL₂
Revelador: UV(254 nm) – Solução de anisaldeído

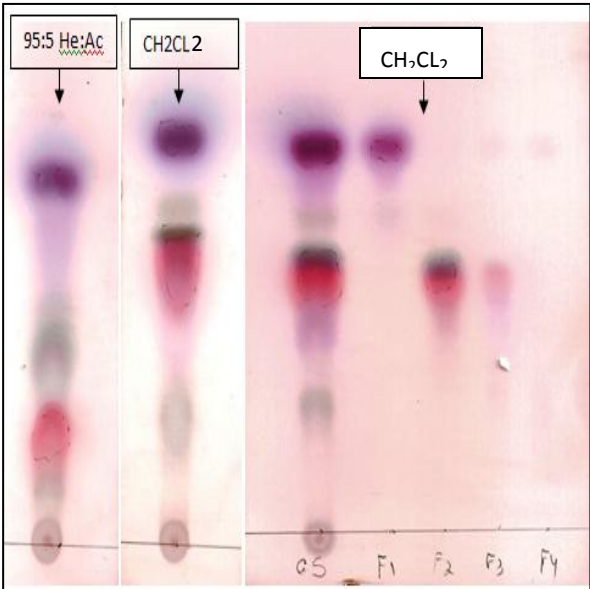


Figura 3.2 – CCD do OE. *C. sativum* e frações
Eluente: CH₂CL₂
Revelador: UV(254 nm) – Solução de anisaldeído

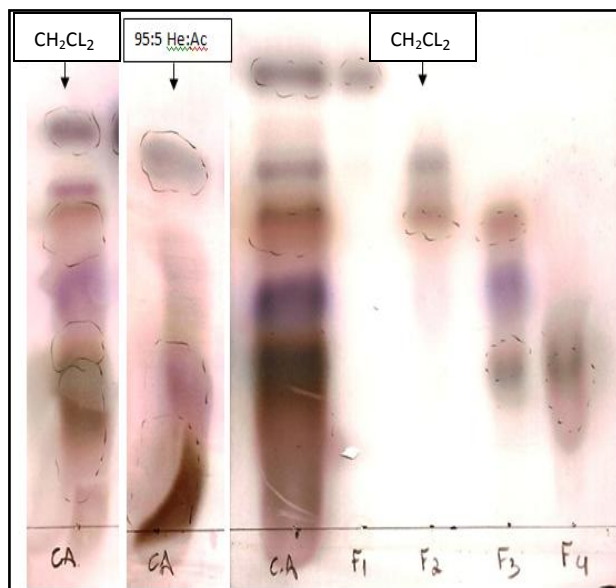


Figura 3.3 – CCD do OE. *C. articulatus* e frações
Eluente: CH₂CL₂
Revelador: UV(254 nm) – Solução de anisaldeído

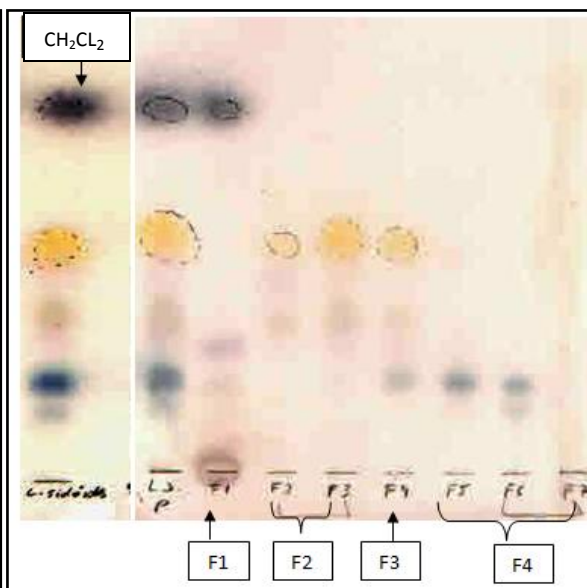


Figura 3.4 – CCD do OE. *L. sidoides* e frações
Eluente: CH₂CL₂
Revelador: UV(254 nm) – Solução de anisaldeído

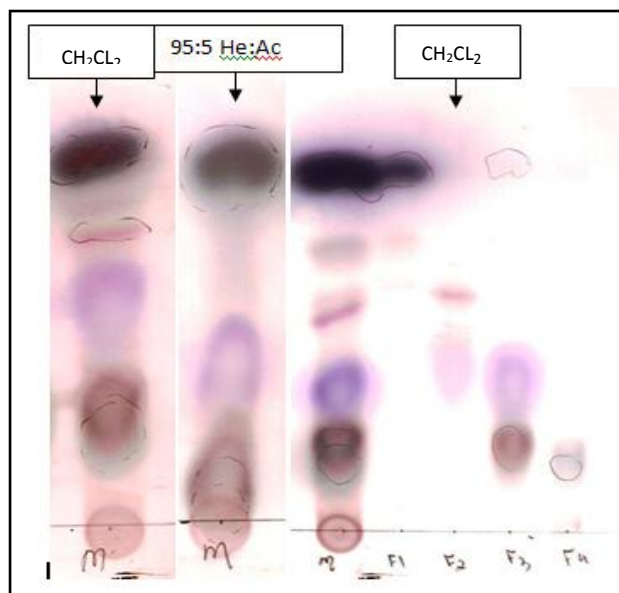


Figura 3.5 – CCD do OE. *M. glomerata* e frações
Eluente: CH₂CL₂
Revelador: UV(254 nm) – Solução de anisaldeído

Apêndice 4:

Tabela 4.1. Atividade antimicrobiana (MIC/MBC/MFC – mg/mL) dos óleos essenciais estudados contra patógenos orais.

Espécie Medicinal	Rendimento (%)	Microorganismos									
		<i>C. albicans</i> CBS 562		<i>F. nucleatum</i> ATCC 25586		<i>P. gingivalis</i> ATCC 33277		<i>S. sanguis</i> ATCC 10556		<i>S. mitis</i> ATCC 903	
		MIC	MFC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
<i>Aloysia gratissima</i> (Aff & Hook).Tr	1,10	0,015	0,062	0,125	0,250	0,125	0,125	0,500	1	0,250	0,250
<i>Aloysia triphylla</i> (L'Hér.) Britton	0,27	0,015	0,062	0,125	0,250	0,250	0,250	0,500	1	0,500	0,500
<i>Alpinia speciosa</i> (Pers.) Burt & Smith	0,22	0,007	0,062	0,125	0,125	0,125	0,250	0,500	*	0,500	*
<i>Baccharis dracunculifolia</i> DC.	0,80	0,250	0,500	0,125	0,250	0,125	0,125	0,500	0,500	0,250	0,250
<i>Cinnamomun zeilanicus</i> Blume	0,59	0,007	0,007	0,250	0,250	0,250	0,250	0,500	1	0,500	0,500
<i>Coriandrum sativum</i> L.	0,29	0,007	0,015	0,015	0,125	0,250	0,125	0,250	0,500	0,062	0,125
<i>Cymbopogon citratus</i> (DC) Stapf	1,13	0,015	0,125	0,250	0,250	0,250	0,250	0,500	*	0,250	0,500
<i>C. martini</i> (Roxb.) J.F. Watson	0,59	0,015	0,125	0,125	0,250	0,250	0,250	0,500	*	0,250	0,250
<i>C. winterianus</i> Jowitt.	1,48	0,015	0,125	0,125	0,250	0,250	0,500	0,500	*	0,250	0,500
<i>C. articulatus</i> L.	0,50	0,125	0,500	0,250	0,250	0,250	0,250	0,250	0,500	0,250	0,500
<i>Elyonurus muticus</i> Spreng.	0,61	0,250	*	0,250	0,500	0,250	0,250	0,500	1	0,500	*
<i>Eugenia florida</i> DC.	0,34	0,125	*	0,125	0,250	0,125	*	0,125	0,250	0,500	0,500
<i>Eugenia uniflora</i> L.	0,76	0,250	*	0,125	0,125	0,250	0,250	0,500	0,500	0,500	0,500
<i>Lippia alba</i> (Mill) N.E. Brown	0,30	0,250	0,500	0,125	0,125	0,250	0,250	0,250	1	0,250	*
<i>L. sidoides</i> Cham.	4,67	0,250	0,500	0,125	0,125	0,250	0,250	0,125	0,500	0,250	*
<i>Mentha piperita</i> L.	2,22	0,500	*	0,250	0,250	0,250	*	0,500	0,500	0,500	0,500
<i>Mikania glomerata</i> Spreng	0,40	0,007	0,007	0,250	0,500	0,500	*	0,062	0,125	0,125	0,125
<i>Siparuna guianenses</i> Aubl	0,29	0,125	0,250	0,062	0,250	0,062	0,125	0,250	1	0,125	0,250
<i>Syzygium aromaticum</i> (L.) Merr. & L. M.Perry	0,46	0,500	0,500	0,250	0,250	0,250	0,250	0,500	1	0,500	0,500
<i>Ziziphus joazeiro</i> Mart	0,46	1	*	0,250	0,500	0,250	0,250	0,500	1	0,500	0,500
<i>Nistatina/ Digluconato de clorexidina</i>	-	0,007	0,015	0,015	0,015	0,015	0,125	0,015	0,015	0,015	0,125

* Ação fungicida/bactericida: MIC > 1mg/mL

Tabela 4. 2. Atividade antimicrobiana (MIC/MBC/MFC – mg/mL) dos óleos essenciais brutos (OE) de melhor atividade contra os patógenos orais e de suas frações.

<i>Espécie Medicinal</i>	Microorganismos									
	<i>C. albicans</i> CBS 562		<i>F. nucleatum</i> ATCC 25586		<i>P. gingivalis</i> ATCC 33277		<i>S. sanguis</i> ATCC 10556		<i>S. mitis</i> ATCC 903	
	MIC	MFC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
<i>OE C. sativum</i>	0,008	0,016	0,016	0,125	0,250	0,125	0,250	0,500	0,063	0,125
<i>F1</i>	0,500	1	0,250	0,250	0,125	0,500	0,500	0,500	0,500	0,500
<i>F2</i>	0,250	1	0,125	0,250	0,125	0,500	0,500	0,500	0,250	1
<i>F3</i>	0,250	1	0,250	0,250	0,125	0,500	0,500	*	0,250	1
<i>F4</i>	0,250	1	*	*	0,500	1	0,500	1	0,500	*
<i>OE M. glomerata</i>	0,007	0,007	0,250	0,500	0,500	*	0,062	0,125	0,125	0,125
<i>F1</i>	0,250	*	0,250	0,500	0,250	0,500	*	*	0,500	*
<i>F2</i>	0,250	0,500	0,250	*	0,500	0,500	*	*	0,500	1
<i>F3</i>	0,250	1	0,250	*	0,250	0,500	*	*	*	*
<i>F4</i>	0,250	1	0,250	*	0,250	0,250	1	1	0,250	0,500
<i>OE C. articulus</i>	0,125	0,500	0,250	0,250	0,250	0,250	0,250	0,500	0,250	0,500
<i>F1</i>	0,250	1	0,250	*	0,125	0,250	*	*	0,500	*
<i>F2</i>	0,250	*	0,250	0,250	0,500	1	1	*	0,500	*
<i>F3</i>	0,250	*	0,250	0,250	0,250	1	0,500	1	0,250	0,500
<i>F4</i>	0,250	1	0,125	0,250	0,250	0,250	0,250	0,500	0,250	0,250
<i>A. gratissima</i>	0,015	0,062	0,125	0,250	0,125	0,125	0,500	1	0,250	0,250
<i>F1</i>	0,500	1	0,500	0,500	0,250	0,500	0,500	1	0,250	0,500
<i>F2</i>	0,500	*	0,500	0,500	0,250	0,500	0,500	1	0,500	0,500
<i>F3</i>	0,500	1	0,250	0,500	0,250	0,500	0,500	0,500	0,250	0,500
<i>F4</i>	0,125	*	0,062	0,250	0,125	0,500	0,125	0,125	0,125	0,125
<i>L. sidoides</i>	0,250	0,500	0,125	0,125	0,250	0,250	0,125	0,500	0,250	*
<i>F1</i>	0,250	*	0,062	0,250	0,250	*	0,500	0,500	0,250	*
<i>F2</i>	0,500	1	0,031	0,250	0,125	*	0,125	0,250	0,125	0,125
<i>F3</i>	0,500	0,500	0,062	0,250	0,250	0,500	0,250	0,250	0,125	0,250
<i>F4</i>	0,250	1	0,125	0,250	0,250	*	0,250	0,500	0,250	*
<i>Nistatina/ Digluconato de clorexidina</i>	0,007	0,015	0,015	0,015	0,015	0,125	0,015	0,015	0,015	0,125

* Ação fungicida/bactericida: MIC > 1mg/mL

Apêndice 5:

Imagens dos Biofilmes formados analisados pela Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

5.1. Imagens dos biofilmes formados de *S. mitis* ATCC 903

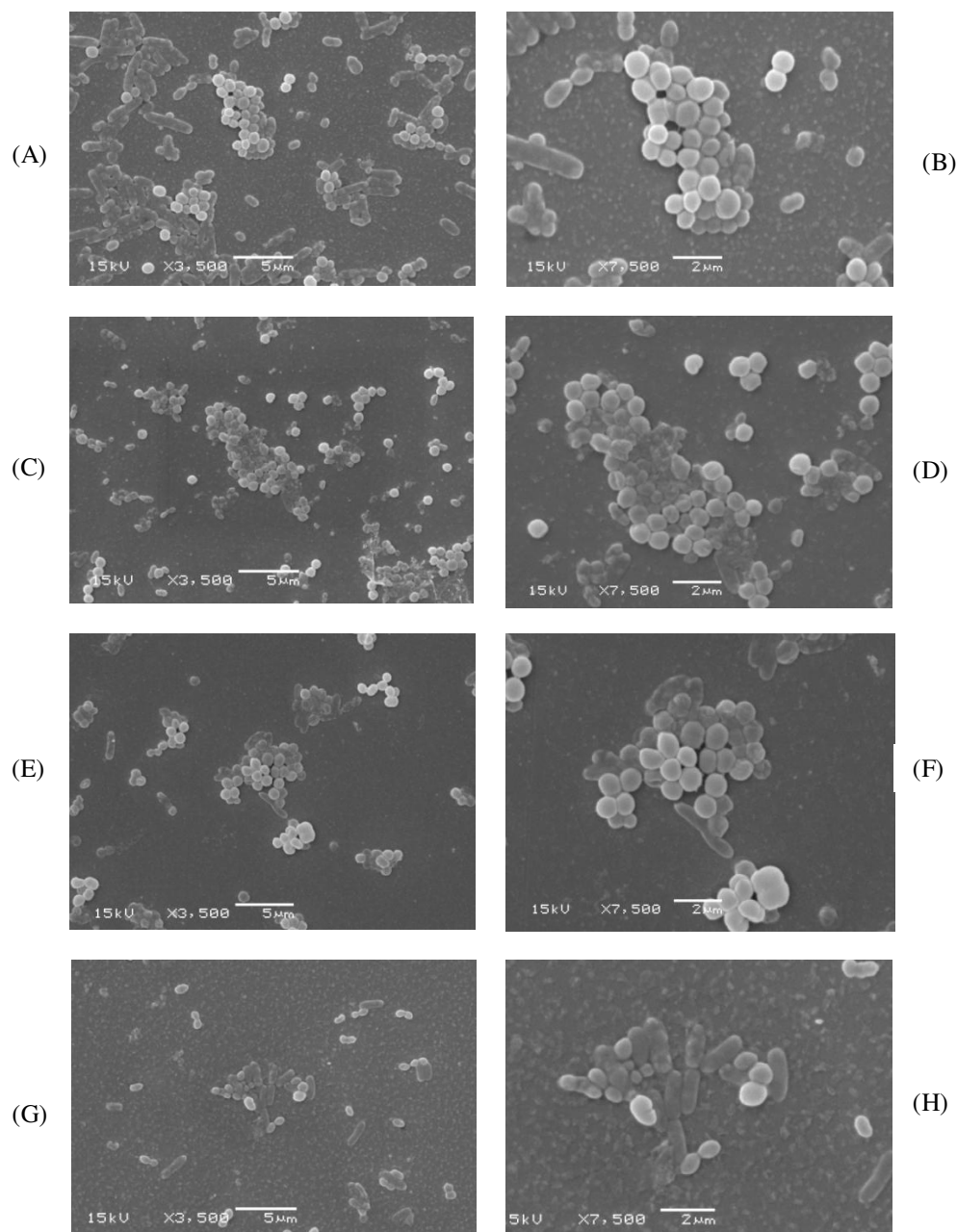


Figura 5.1. Efeito óleo essencial de *A. gratissima* sobre o biofilme formado de *S. mitis* analisado por MEV.

(A) Biofilme formado de *S. mitis* - aumento de 3.500x e (B) 7.500x; (C) OE bruto - 3.500x e (D) 7.500x; (E) Fração F4 - 3.500x e (F) 7.500x; (G) Gluconato de clorexidina 0,12% - 3.500x e (H) 7.500x.

5.2. Imagens dos biofilmes formados de *S. sanguis* ATCC 10556

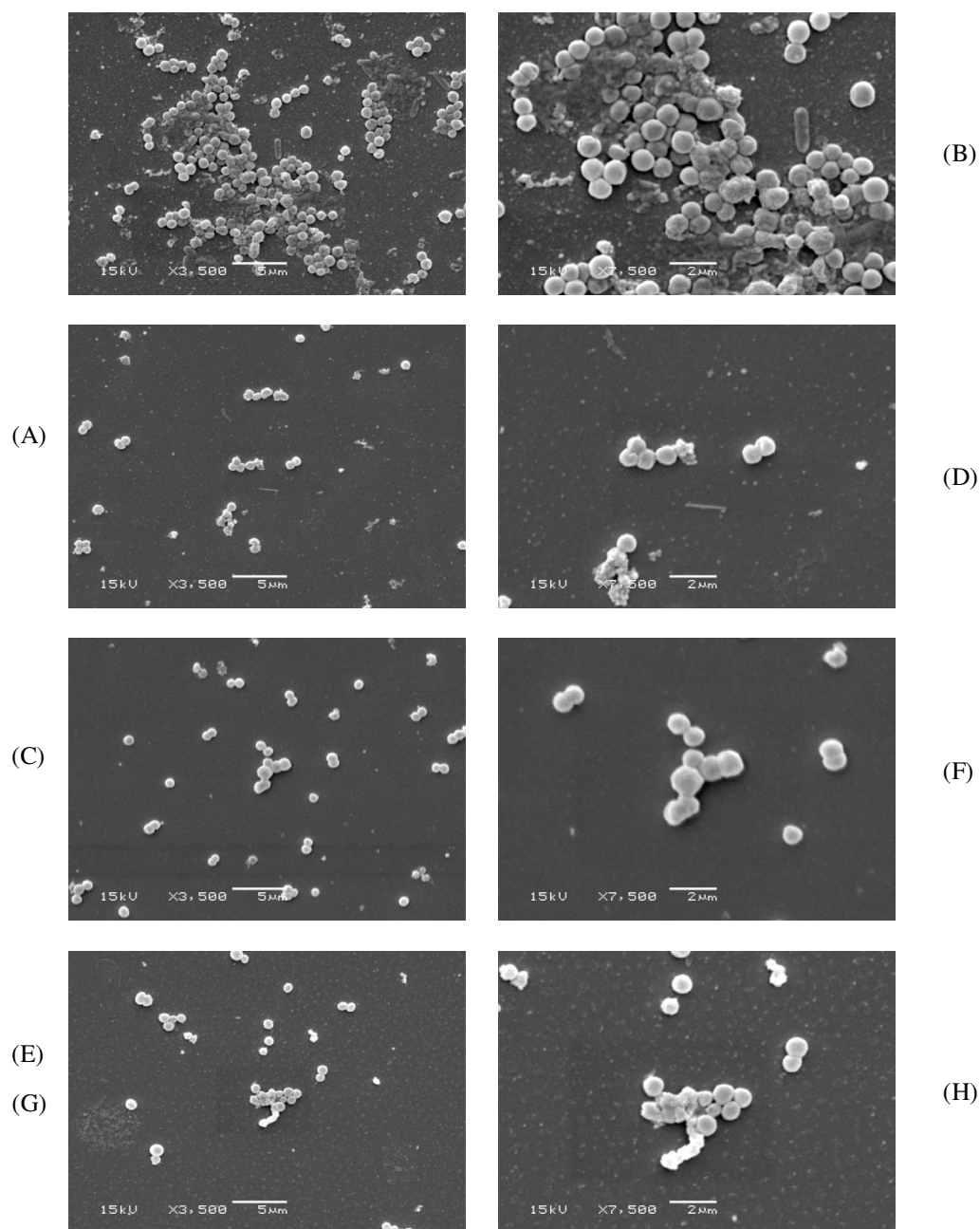


Figura 5.2. Efeito óleo essencial de *C. articulatus* e F₂ de *L. sidoides* sobre o biofilme formado de *S. sanguis* analisado por MEV.

(A) Biofilme formado de *S. sanguis* - aumento de 3.500x e (B) 7.500x; (C) OE bruto - 3.500x e (D) 7.500x; (E) Fração F₂ de *L. sidoides* - 3.500x e (F) 7.500x; (G) Gluconato de clorexidina 0,12% - 3.500x e (H) 7.500x.

5.3. Imagens dos biofilmes formados de *F. nucleatum* ATCC 25586

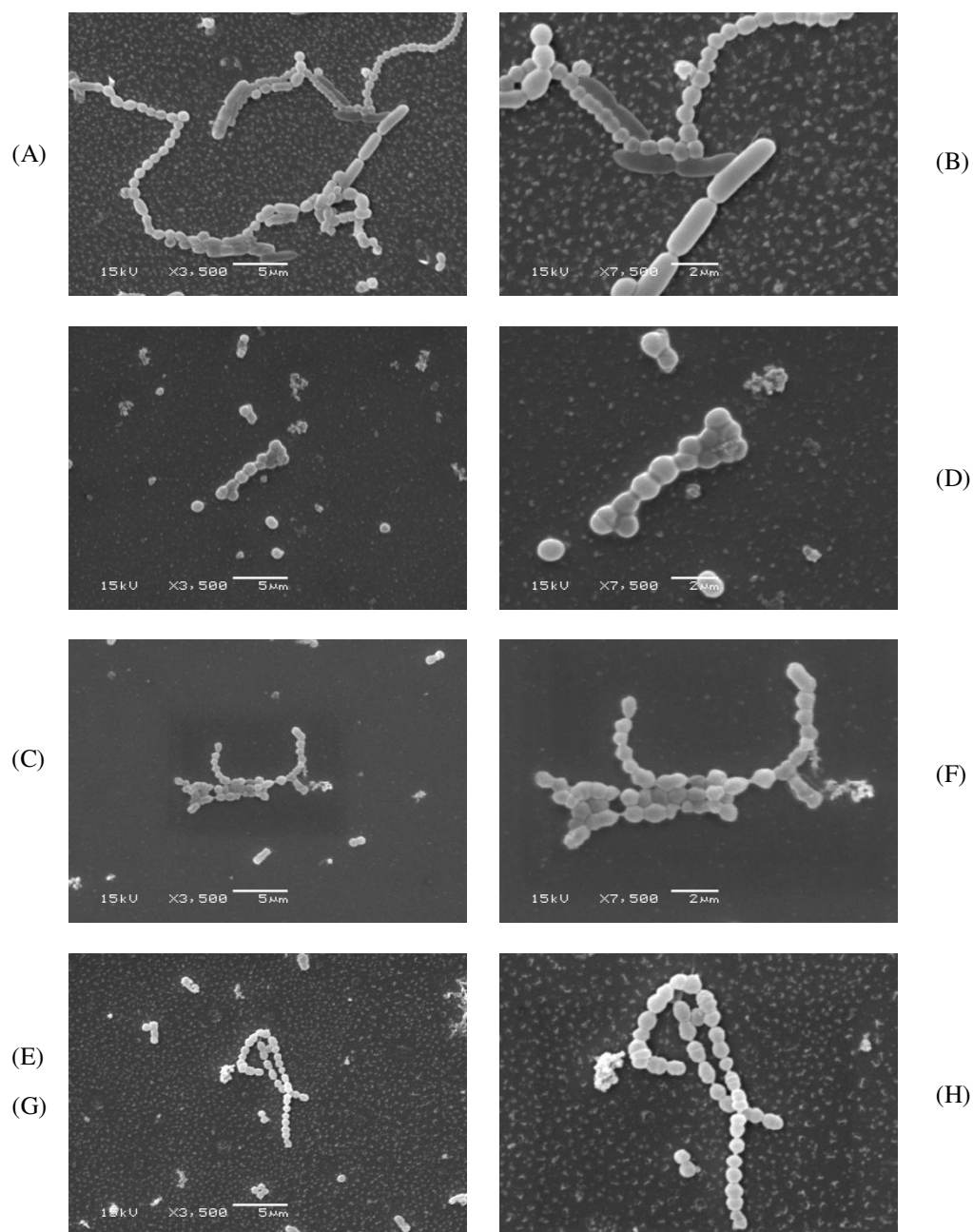


Figura 5.3. Efeito óleo essencial de *C. articulatus* e F₂ de *L. sidoides* sobre o biofilme formado de *F. nucleatum* analisado por MEV.

(A) Biofilme formado de *F. nucleatum* - aumento de 3.500x e (B) 7.500x; (C) OE bruto - 3.500x e (D) 7.500x; (E) Fração F₂ de *L. sidoides* - 3.500x e (F) 7.500x; (G) Gluconato de clorexidina 0,12% - 3.500x e (H) 7.500x.

5.4. Imagens dos biofilmes formados de *C. albicans* CBS 562

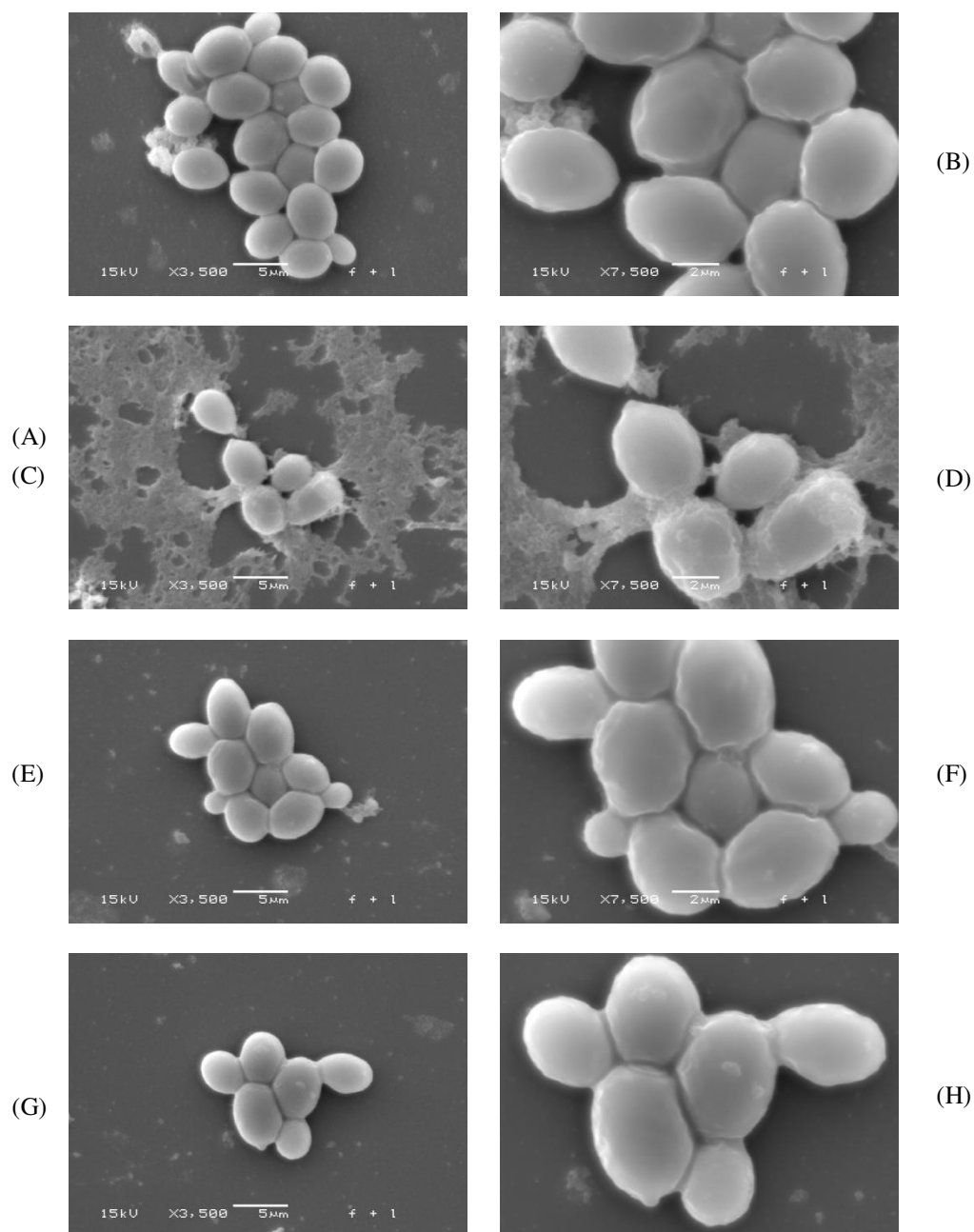


Figura 5.4 Efeito óleo essencial de *C. articulatus* e F₄ de *A. gratissima* sobre o biofilme formado de *C. albicans* analisado por MEV.

(A) Biofilme formado de *C. albicans* - aumento de 3.500x e (B) 7.500x; (C) OE bruto - 3.500x e (D) 7.500x; (E) Fração F₄ de *A. gratissima* - 3.500x e (F) 7.500x; (G) Gluconato de clorexidina 0,12% - 3.500x e (H) 7.500x.

5.5. Imagens dos biofilmes formados de *P. gingivalis* ATCC 33277

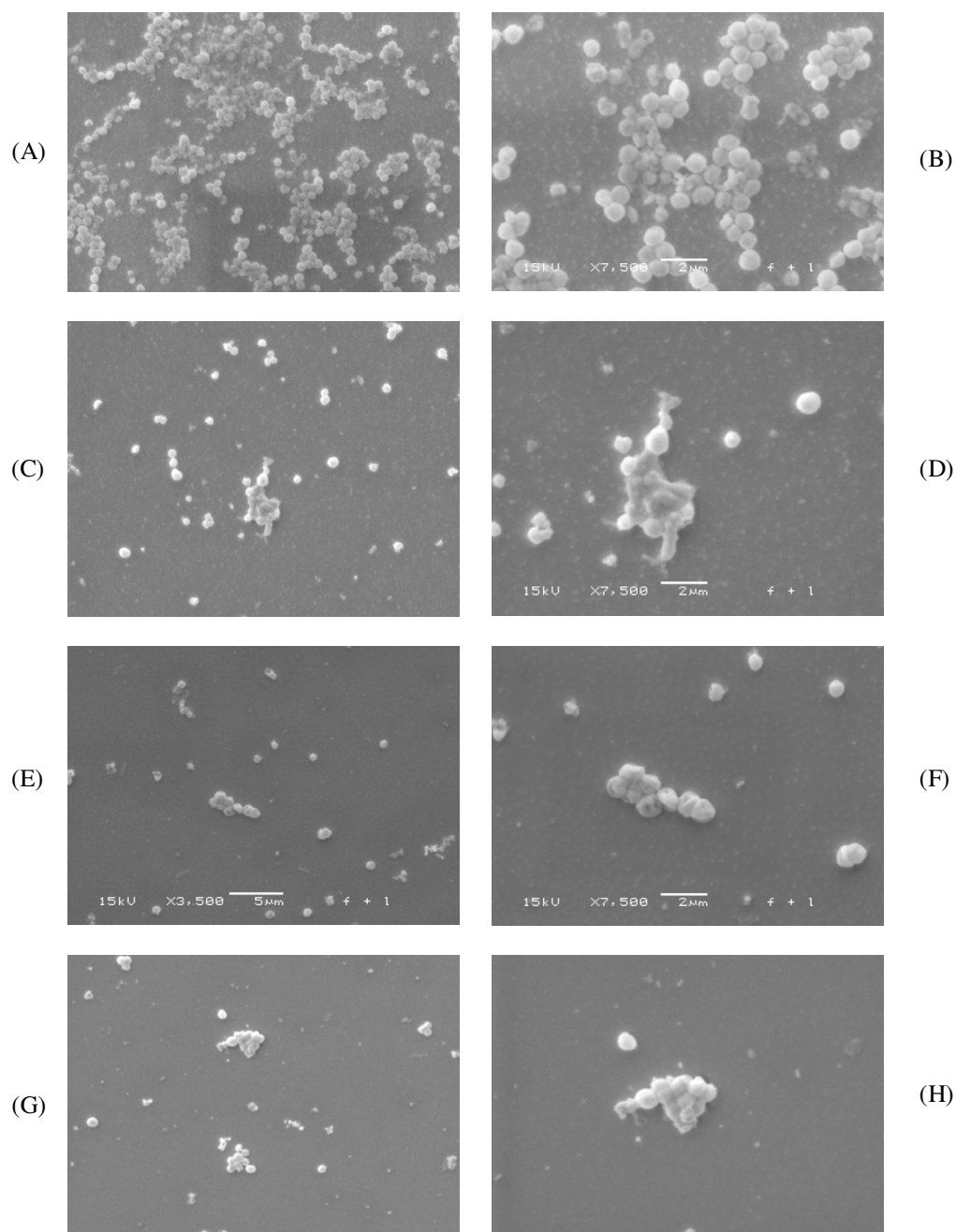


Figura 5.5. Efeito óleo essencial de *C. articulatus* e F₂ de *L. sidoides* sobre o biofilme formado de *P. gingivalis* analisado por MEV.

(A) Biofilme formado de *P. gingivalis* - aumento de 3.500x e (B) 7.500x; (C) OE bruto - 3.500x e (D) 7.500x; (E) Fração F₂ de *L. sidoides* - 3.500x e (F) 7.500x; (G) Gluconato de clorexidina 0,12% - 3.500x e (H) 7.500x.

Apêndice 6 – Metodologia Curva Crescimento planctônico e Efeito dos óleos essenciais estudados sobre biofilmes orais formados de 72h.

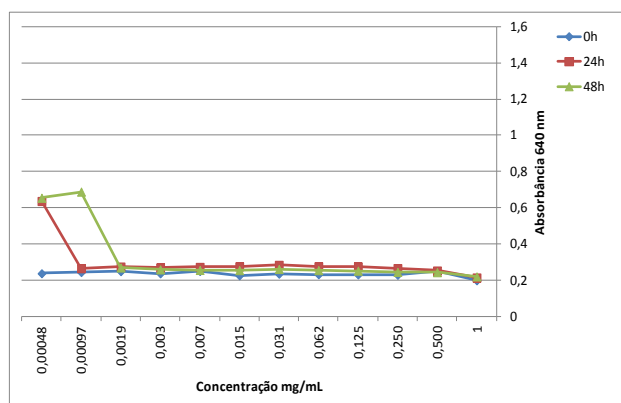
6.1. Curva Crescimento Planctônico - Metodologia realizada paralelamente aos ensaios de biofilme.

Effect of the essential oils and fractions on microorganisms kinetic growth

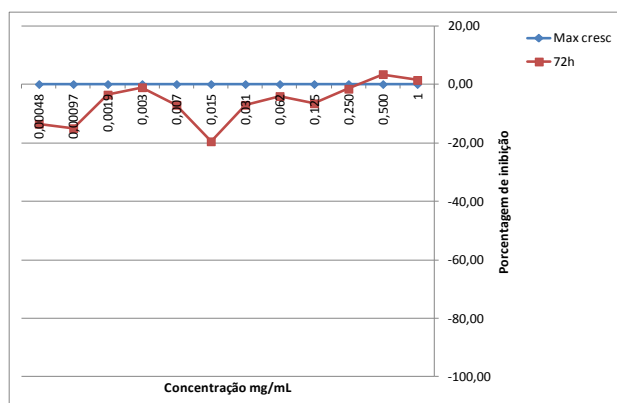
Tests for determination of microorganisms kinetic growth were carried out on sterilized tissue culture microplates (96 wells) containing 100 µg /mL Brain Heart Infusion (BHI - Oxoid®) culture medium for bacteria and SDB for *C. albicans*. Initially, the essential oils and fractions showing best activity were diluted and transferred to the first well and serial dilutions were prepared such that concentrations in the range of 1-0.0048 mg/mL were obtained. After, 100 µg /mL suspension containing bacteria (10^6 cells/mL) and *C. albicans* (10^4 cells/mL) was transferred to all wells, and the plates incubated at 36 °C for 48 h under appropriate atmosphere conditions. The microbial growth was determined in a microplate reader (SpectraMax 340 tunable Microplate Reader, Molecular Devices Ltda.) with successive readings after 24 and 48 h.

The 0.12 % chlorhexidine digluconate and 1 % nystatin controls were also included in the tests. The tests were carried out in three independent experiments, each in triplicate (Furletti *et al.*, 2011).

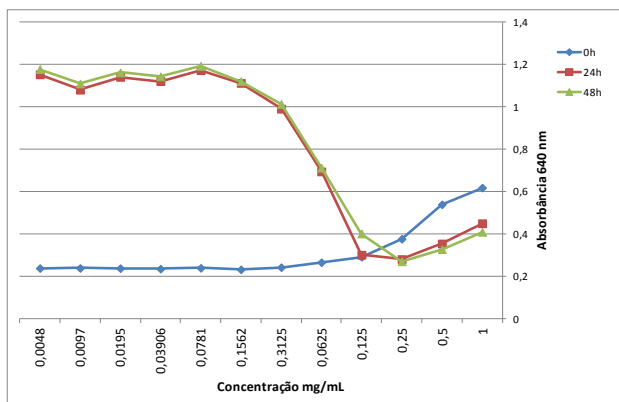
6.1. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais frente as células planctônicas e biofilme de *S. mitis* ATCC 903.



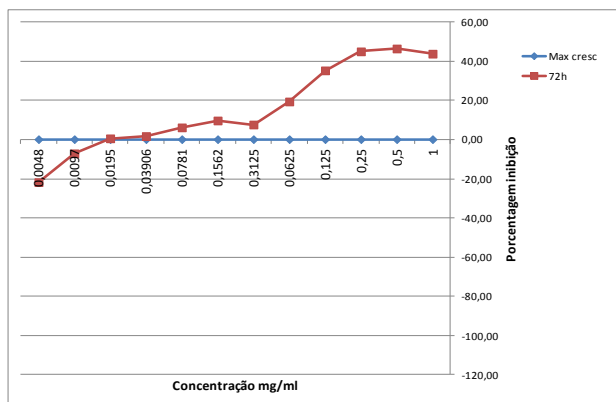
Curva de crescimento planctônico de *S. mitis* ATCC 903 na presença de gluconato de clorexidina 0,12% no período de 48 h.



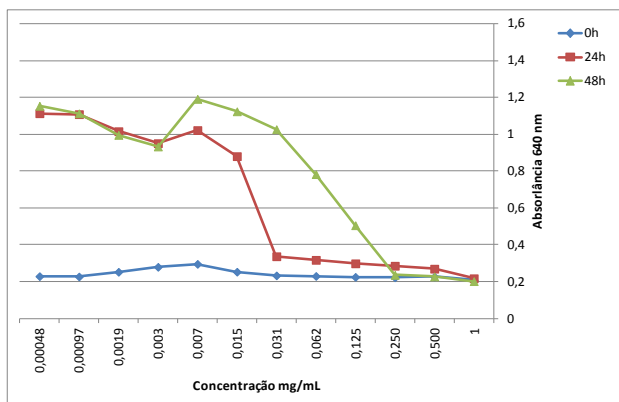
Efeito do gluconato de clorexidina 0,12% sobre o biofilme formado de *S. mitis* ATCC 903 após o período 72 h.



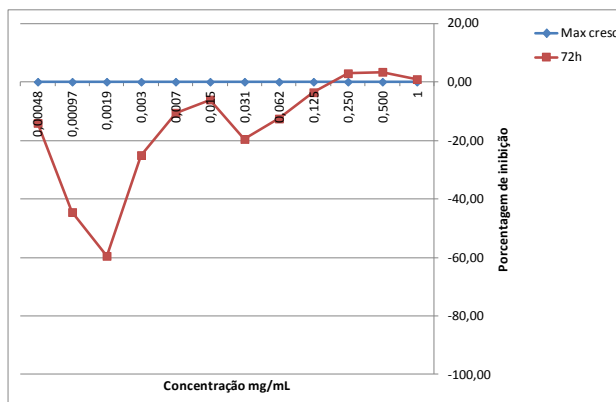
Curva de crescimento planctônico de *S. mitis* ATCC 903 na presença do óleo essencial de *C. sativum* no período de 0,24,48 h.



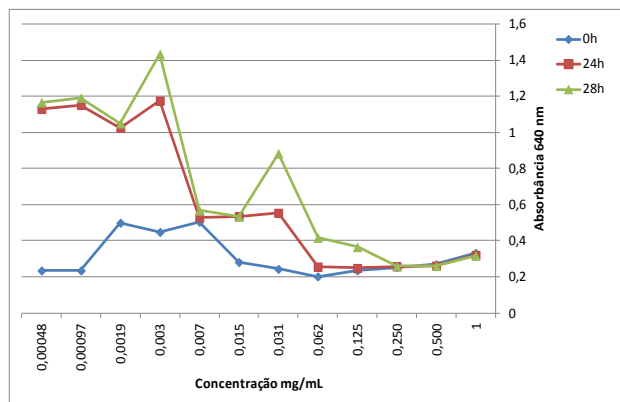
Efeito do óleo essencial de *C. sativum* sobre o biofilme formado de *S. mitis* ATCC 903 após o período de 72 h.



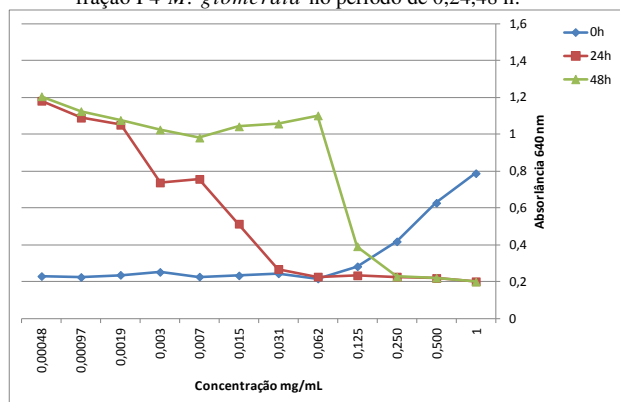
Curva de crescimento planctônico de *S. mitis* ATCC 903 na presença do óleo essencial de *M. glomerata* no período de 0,24,48 h.



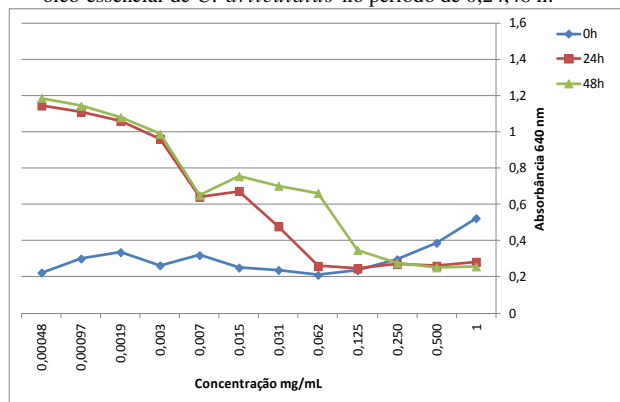
Efeito do óleo essencial de *M. glomerata* sobre o biofilme formado de *S. mitis* ATCC 903 após o período de 72 h.



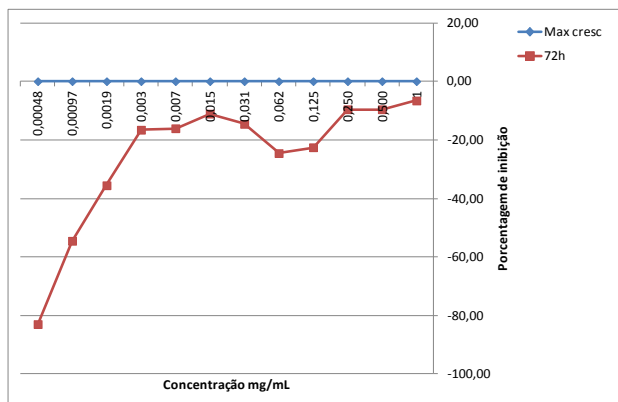
Curva de crescimento planctônico de *S. mitis* ATCC 903 na presença da fração F4 *M. glomerata* no período de 0,24,48 h.



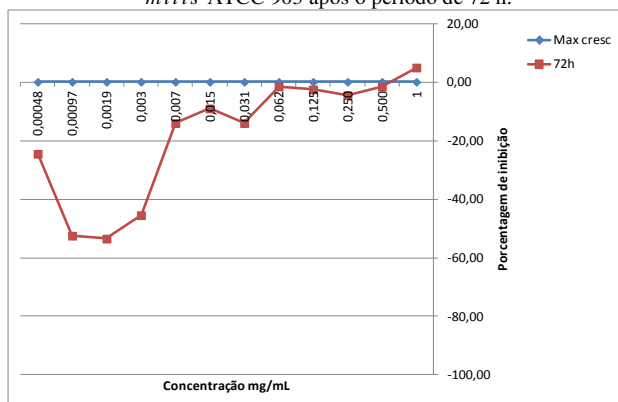
Curva de crescimento planctônico de *S. mitis* ATCC 903 na presença do óleo essencial de *C. articulatus* no período de 0,24,48 h.



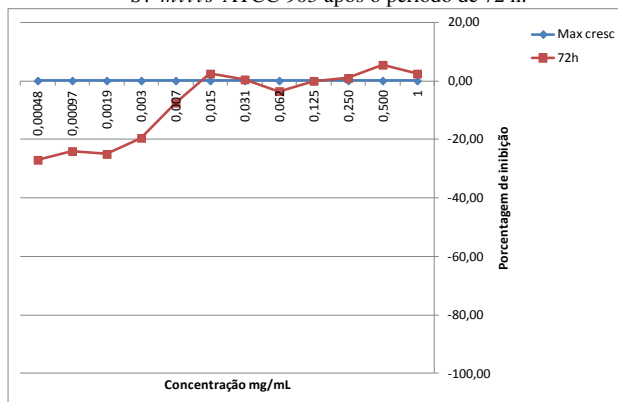
Curva de crescimento planctônico de *S. mitis* ATCC 903 na presença da fração F4 *C. articulatus* no período de 0,24,48 h.



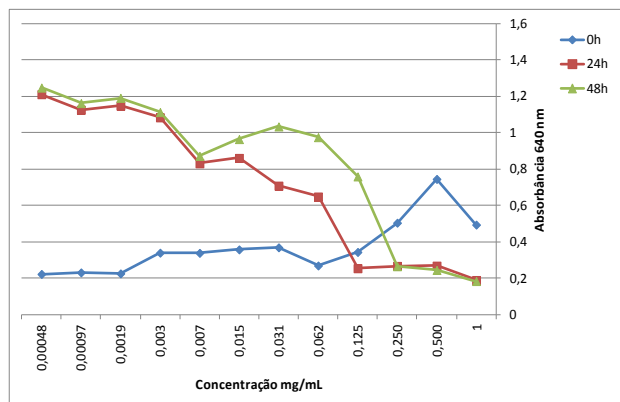
Efeito da fração F4 *M. glomerata* sobre o biofilme formado de *S. mitis* ATCC 903 após o período de 72 h.



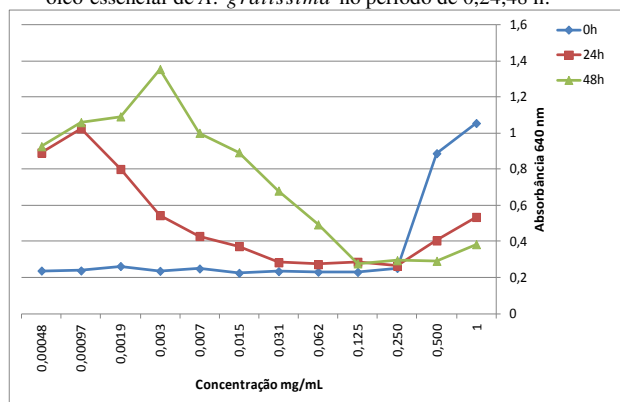
Efeito do óleo essencial de *C. articulatus* sobre o biofilme formado de *S. mitis* ATCC 903 após o período de 72 h.



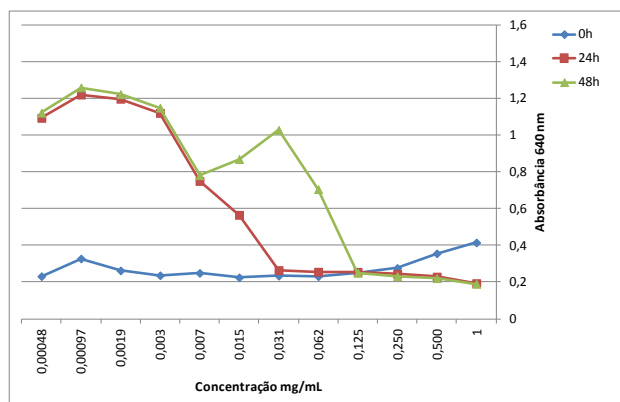
Efeito da fração F4 *C. articulatus* sobre o biofilme formado de *S. mitis* ATCC 903 após o período de 72 h.



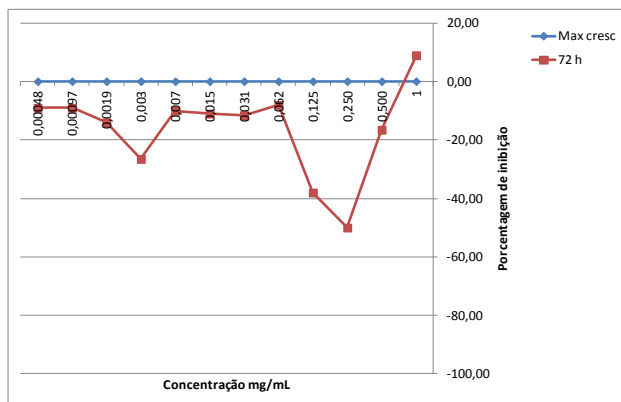
Curva de crescimento planctônico de *S. mitis* ATCC 903 na presença do óleo essencial de *A. gratissima* no período de 0,24,48 h.



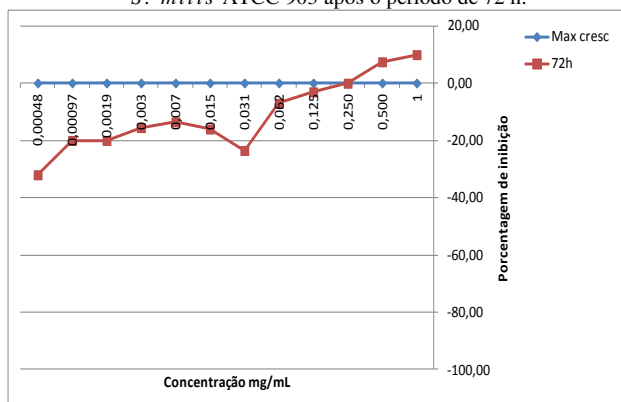
Curva de crescimento planctônico de *S. mitis* ATCC 903 na presença da fração F4 *A. gratissima* no período de 0,24,48 h.



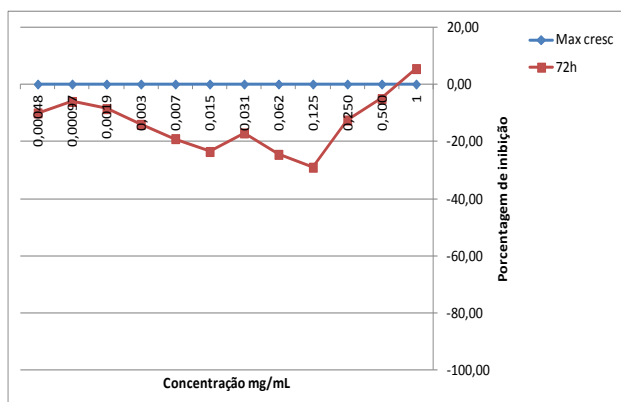
Curva de crescimento planctônico de *S. mitis* ATCC 903 na presença do óleo essencial de *L. sidoides* no período de 0,24,48 h.



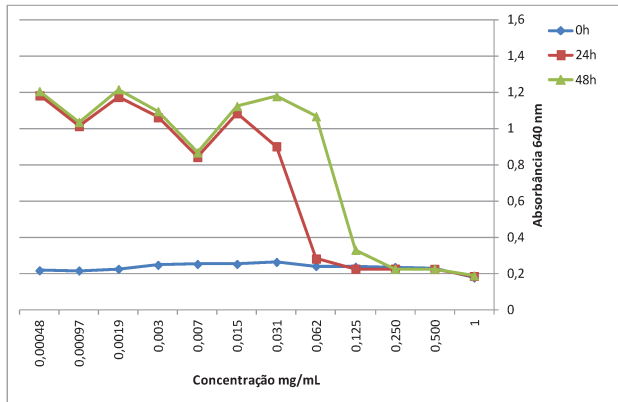
Efeito do óleo essencial de *A. gratissima* sobre o biofilme formado de *S. mitis* ATCC 903 após o período de 72 h.



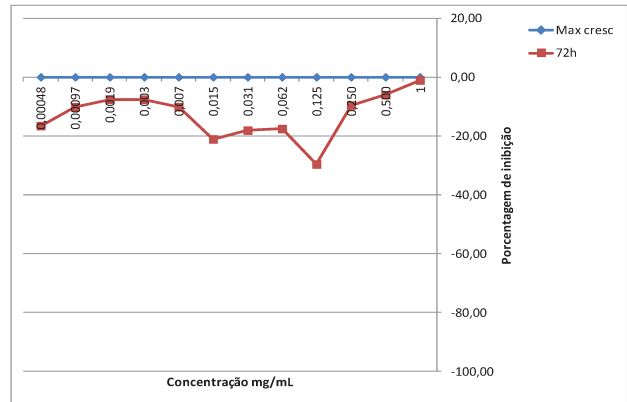
Efeito da fração F4 *A. gratissima* sobre o biofilme formado de *S. mitis* ATCC 903 após o período de 72 h.



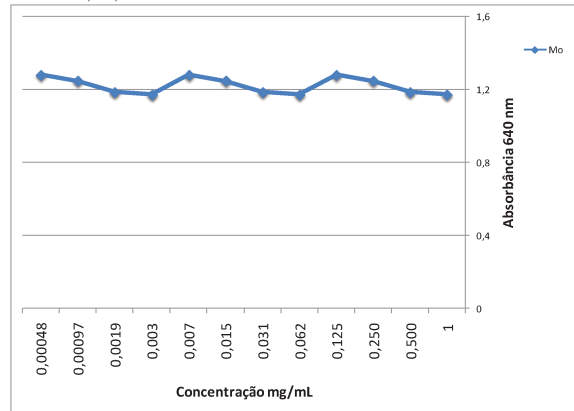
Efeito do óleo essencial de *L. sidoides* sobre o biofilme formado de *S. mitis* ATCC 903 após o período de 72 h.



Curva de crescimento plancônico de *S. mitis* ATCC 903 na presença da fração F2 *L. sidoides* no período de 0,24,48 h.

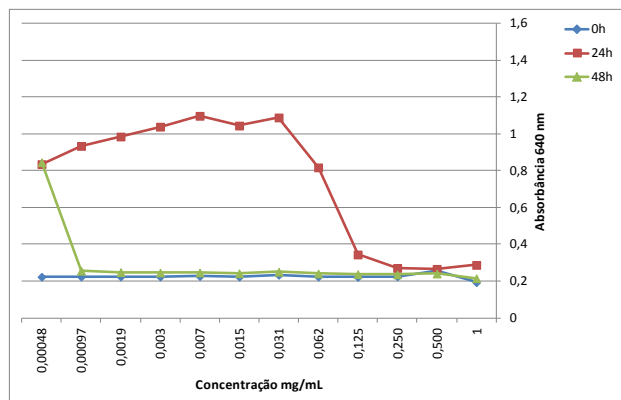


Efeito da fração F2 *L. sidoides* sobre o biofilme formado de *S. mitis* ATCC 903 após o período de 72 h.

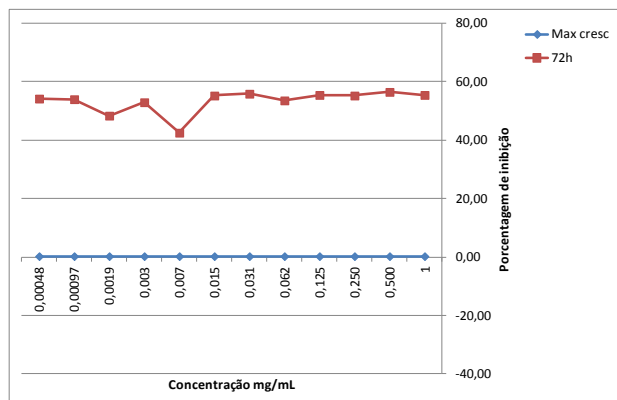


Curva de crescimento plancônico de *S. mitis* em 48 h.

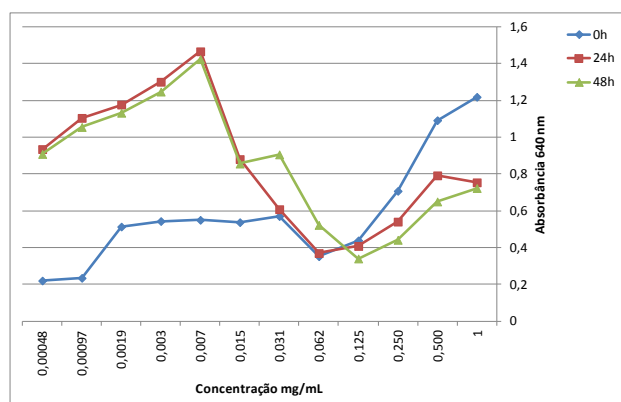
6.2 Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais frente as células planctônicas e biofilme de *F. nucleatum* ATCC 25586



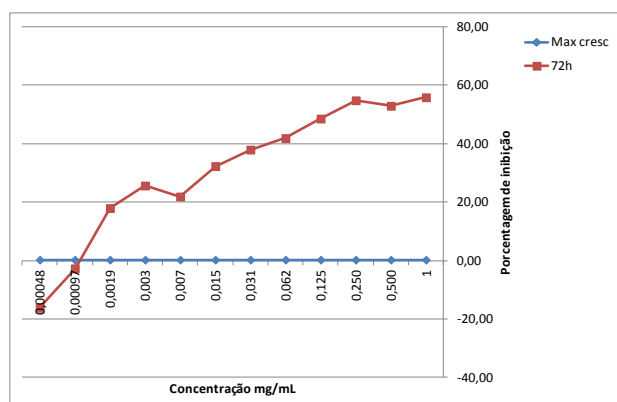
Curva de crescimento planctônico de *F. nucleatum* ATCC 25586 na presença de Gluconato de clorexidina 0,12% no período de 0,24,48 h.



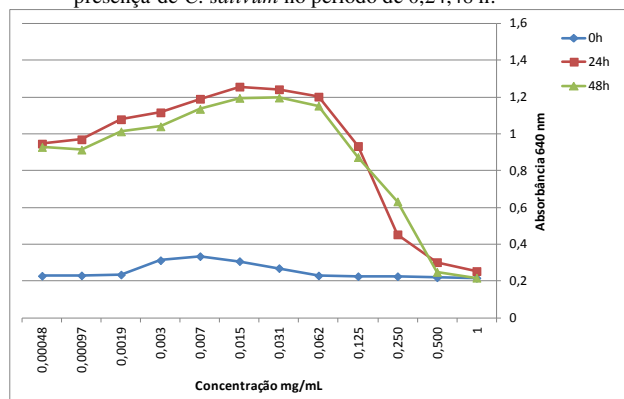
Efeito do Gluconato de clorexidina 0,12% sobre o biofilme formado de *F. nucleatum* ATCC 25586 após o período de 72 h.



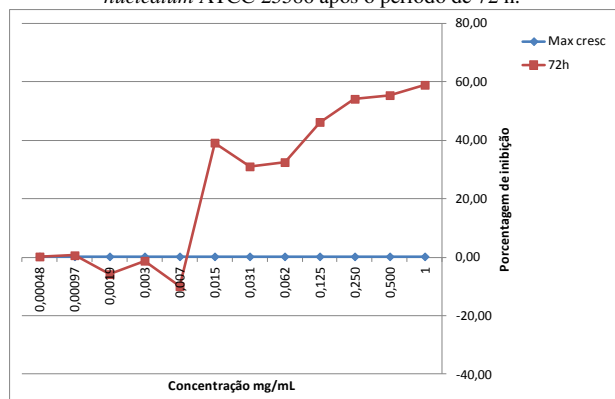
Curva de crescimento planctônico de *F. nucleatum* ATCC 25586 na presença de *C. sativum* no período de 0,24,48 h.



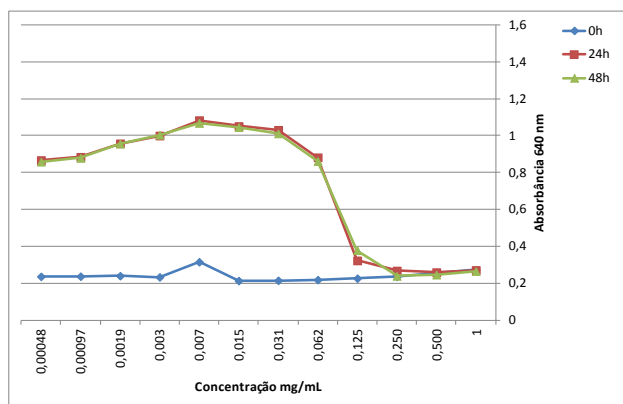
Efeito do óleo essencial de *C. sativum* sobre o biofilme formado de *F. nucleatum* ATCC 25586 após o período de 72 h.



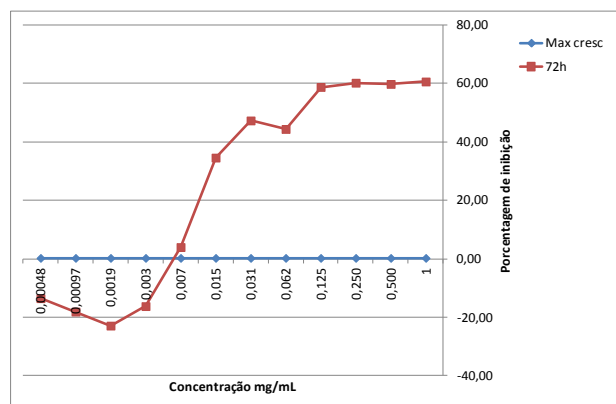
Curva de crescimento planctônico de *F. nucleatum* ATCC 25586 na presença do óleo essencial de *M. glomerata* no período de 0,24,48 h.



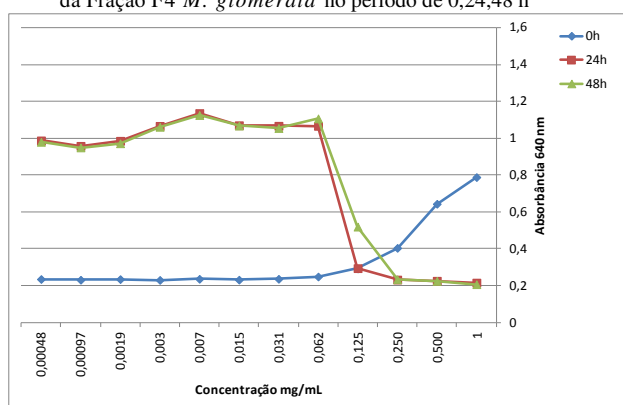
Efeito do óleo essencial de *M. glomerata* sobre o biofilme formado de *F. nucleatum* ATCC 25586 após o período de 72 h.



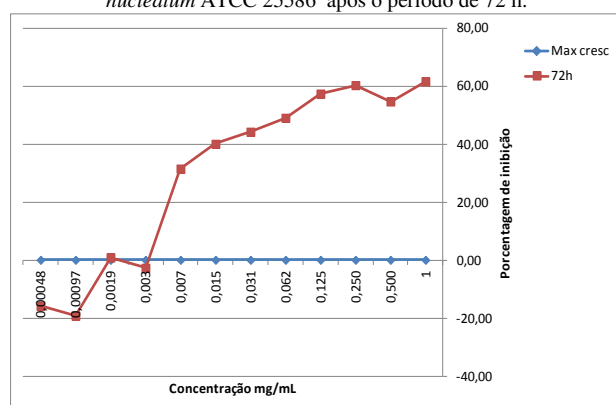
Curva de crescimento planctônico de *F. nucleatum* ATCC 25586 na presença da Fração F4 *M. glomerata* no período de 0,24,48 h



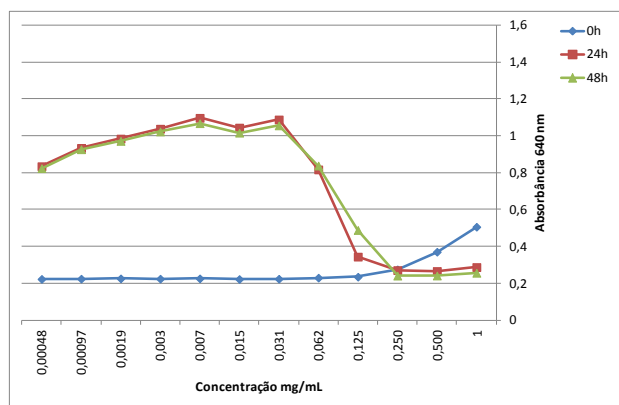
Efeito da Fração F4 *M. glomerata* sobre o biofilme formado de *F. nucleatum* ATCC 25586 após o período de 72 h.



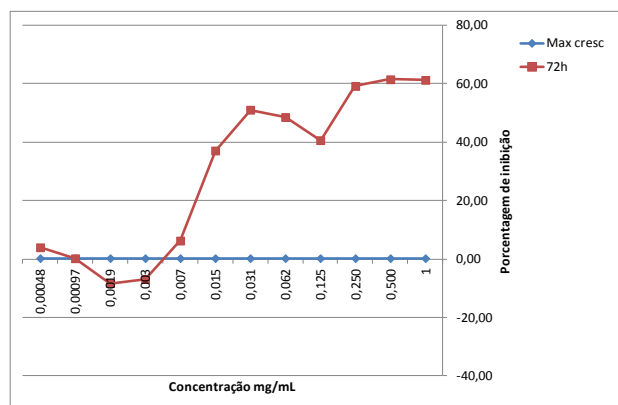
Curva de crescimento planctônico de *F. nucleatum* ATCC 25586 na presença do óleo essencial de *C. articulatus* no período de 0,24,48 horas



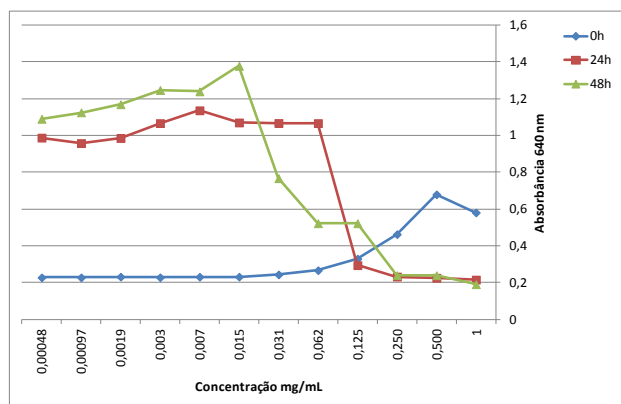
Efeito do óleo essencial de *C. articulatus* sobre o biofilme formado de *F. nucleatum* ATCC 25586 após o período de 72 h.



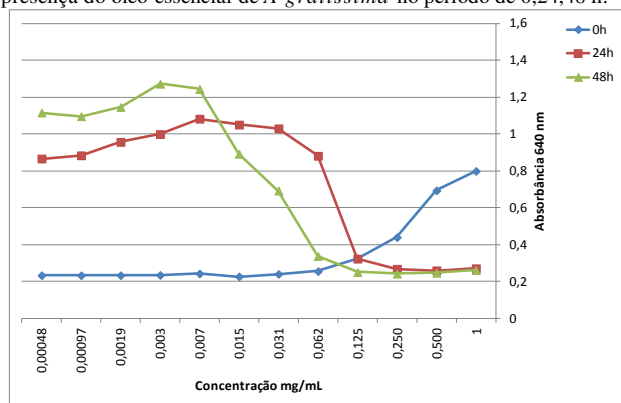
Curva de crescimento planctônico de *F. nucleatum* ATCC 25586 na presença da Fração de F4 *C. articulatus* no período de 0,24,48 h.



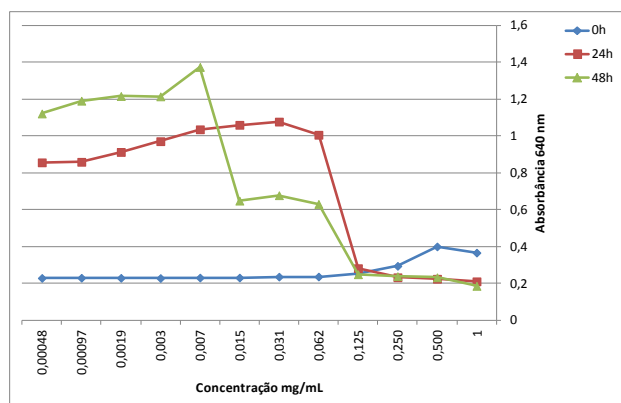
Efeito da fração de F4 *C. articulatus* sobre o biofilme formado de *F. nucleatum* ATCC 25586 após o período de 72 h.



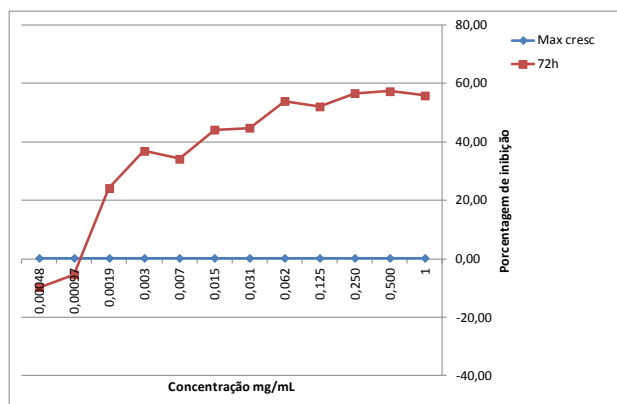
Curva de crescimento planctônico de *F. nucleatum* ATCC 25586 na presença do óleo essencial de *A. gratissima* no período de 0,24,48 h.



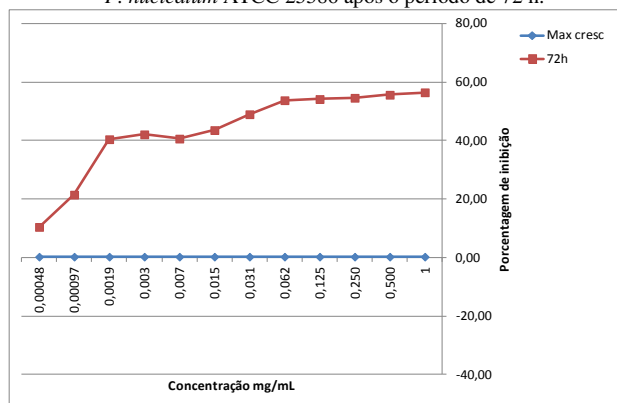
Curva de crescimento planctônico de *F. nucleatum* ATCC 25586 na presença da fração F4 *A. gratissima* no período de 0,24,48 h



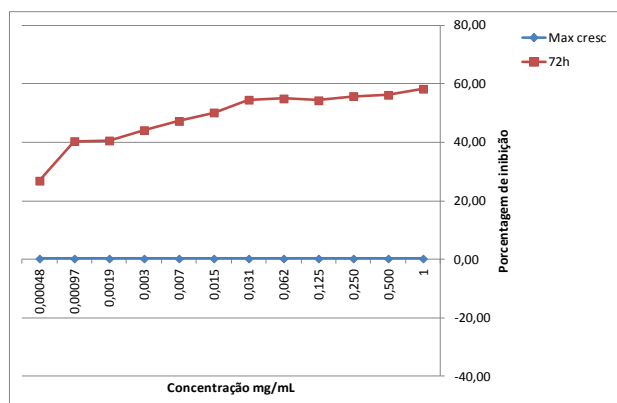
Curva de crescimento planctônico de *F. nucleatum* ATCC 25586 na presença do óleo essencial de *L. sidoides* no período de 0,24,48 h.



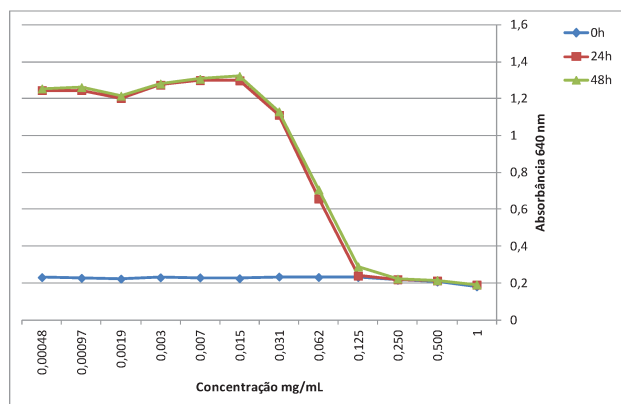
Efeito do óleo essencial de *A. gratissima* sobre o biofilme formado de *F. nucleatum* ATCC 25586 após o período de 72 h.



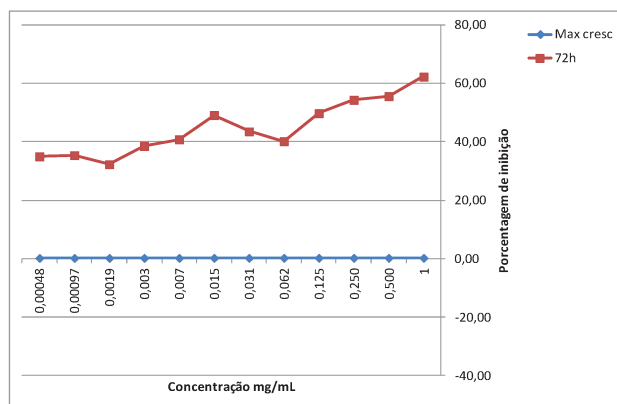
Efeito da fração F4 *A. gratissima* sobre o biofilme formado de *F. nucleatum* ATCC 25586 após o período de 72 h.



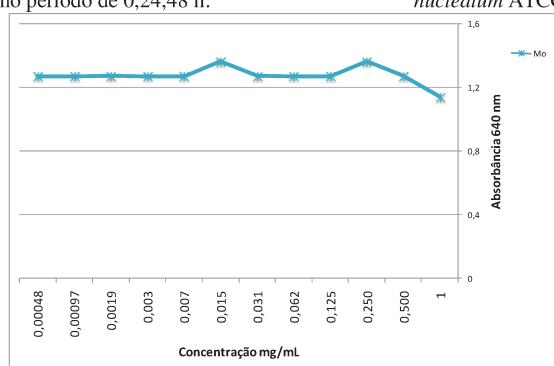
Efeito do óleo essencial de *L. sidoides* sobre o biofilme formado de *F. nucleatum* ATCC 25586 após o período de 72 h.



Curva de crescimento planctônico de *F. nucleatum* ATCC 25586 na presença da fração F2 *L. sidoides* no período de 0,24,48 h.

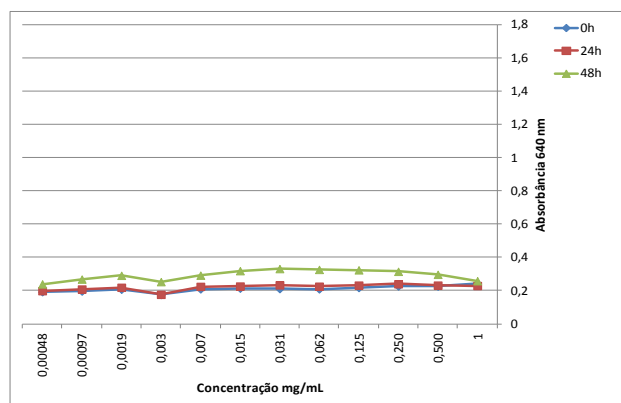


Efeito da fração F2 *L. sidoides* sobre o biofilme formado de *F. nucleatum* ATCC 25586 após o período de 72 h.

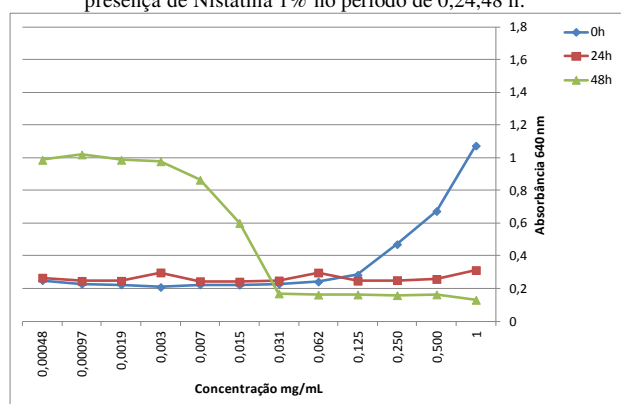


Curva de crescimento planctônico de *F. nucleatum* em 48 h.

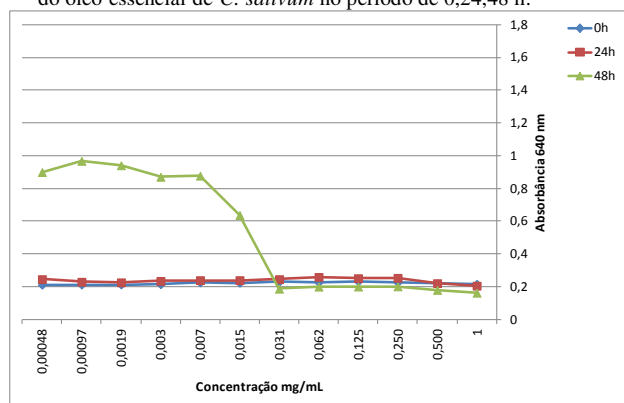
6.3. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais frente as células planctônicas e biofilme de *C. albicans* CBS 562



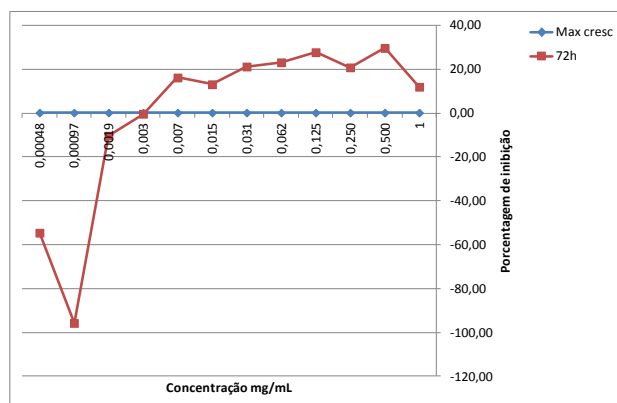
Curva de crescimento planctônico de *C. albicans* CBS 562 na presença de Nistatina 1% no período de 0,24,48 h.



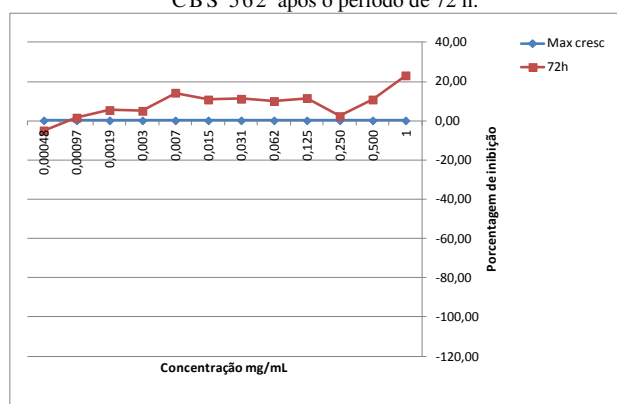
Curva de crescimento planctônico de *C. albicans* CBS 562 na presença do óleo essencial de *C. sativum* no período de 0,24,48 h.



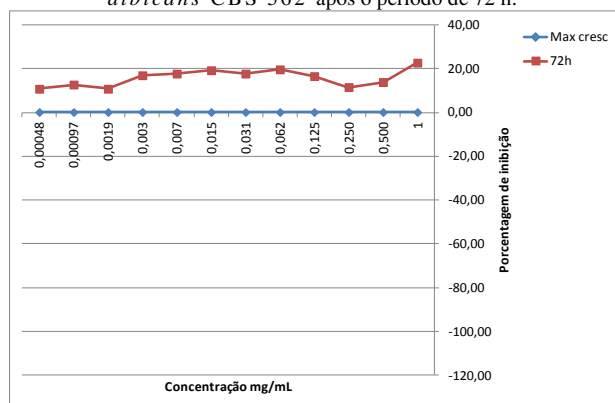
Curva de crescimento planctônico de *C. albicans* CBS 562 na presença do óleo essencial de *M. glomerata* no período de 0,24,48 h.



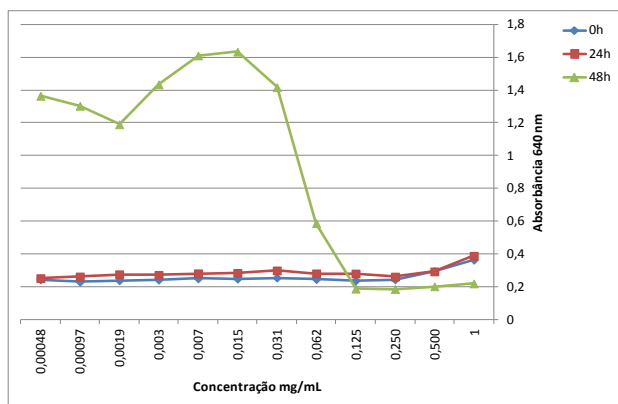
Efeito da Nistatina 1% sobre o biofilme formado de *C. albicans* CBS 562 após o período de 72 h.



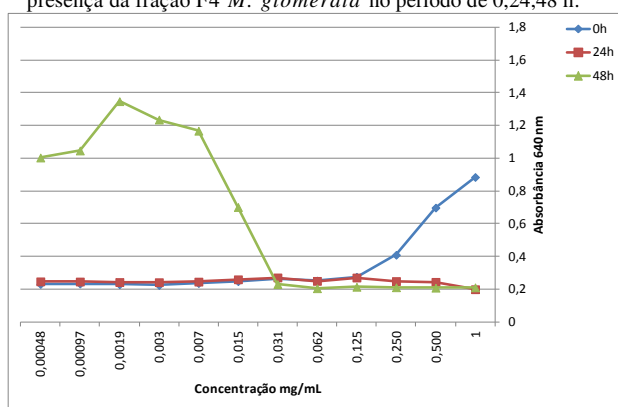
Efeito do óleo essencial de *C. sativum* sobre o biofilme formado de *C. albicans* CBS 562 após o período de 72 h.



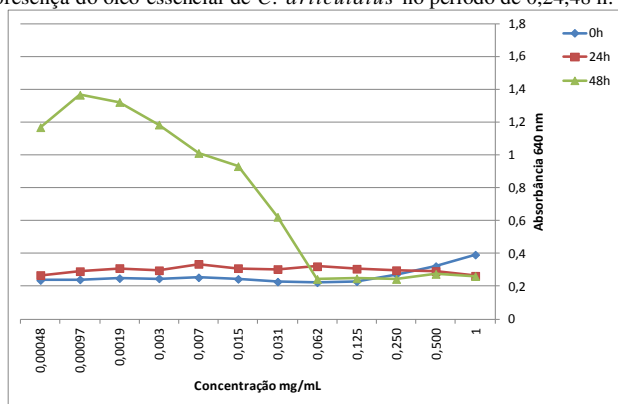
Efeito do óleo essencial de *M. glomerata* sobre o biofilme formado de *C. albicans* CBS 562 após o período de 72 h.



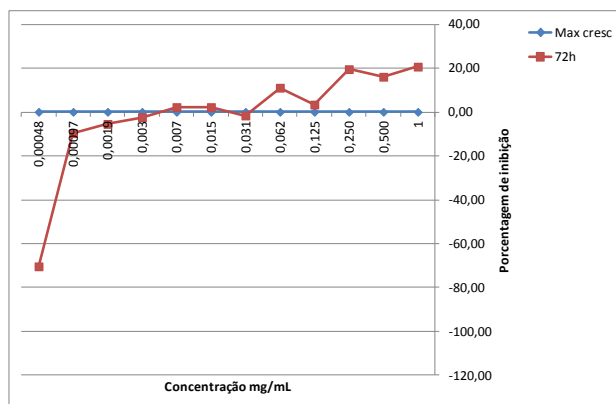
Curva de crescimento planctônico de *C. albicans* CBS 562 na presença da fração F4 *M. glomerata* no período de 0,24,48 h.



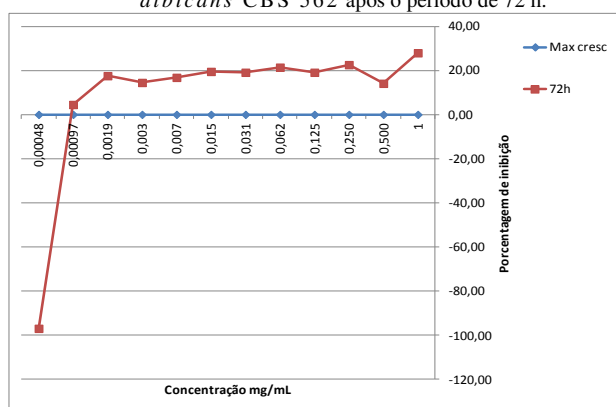
Curva de crescimento planctônico de *C. albicans* CBS 562 na presença do óleo essencial de *C. articulatus* no período de 0,24,48 h.



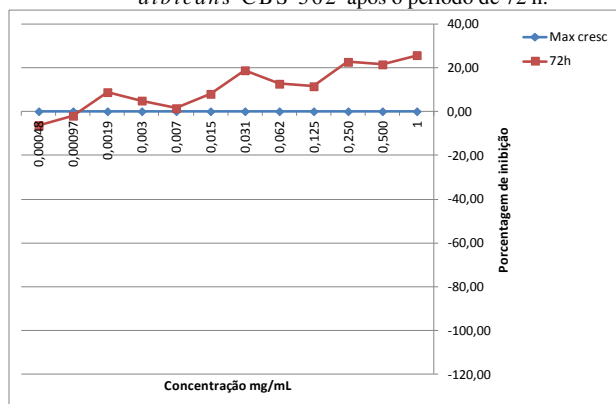
Curva de crescimento planctônico de *C. albicans* CBS 562 na presença da fração F4 *C. articulatus* no período de 0,24,48 h.



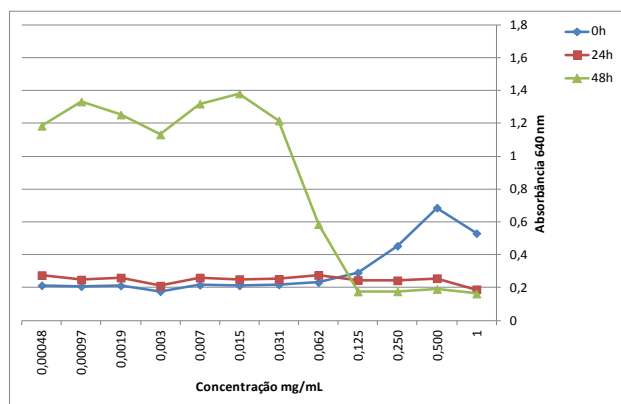
Efeito da fração F4 *M. glomerata* sobre o biofilme formado de *C. albicans* CBS 562 após o período de 72 h.



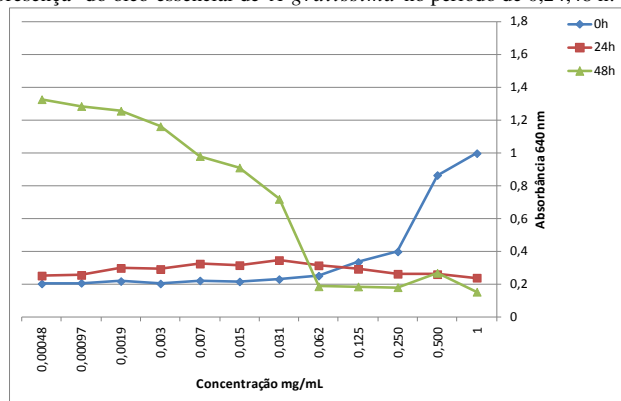
Efeito do óleo essencial de *C. articulatus* sobre o biofilme formado de *C. albicans* CBS 562 após o período de 72 h.



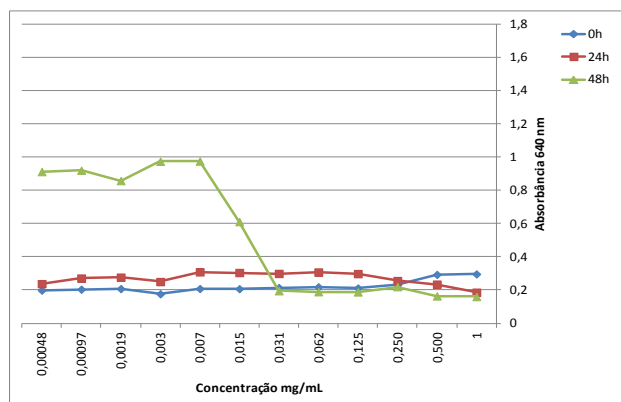
Efeito da fração F4 *C. articulatus* sobre o biofilme formado de *C. albicans* CBS 562 após o período de 72 h.



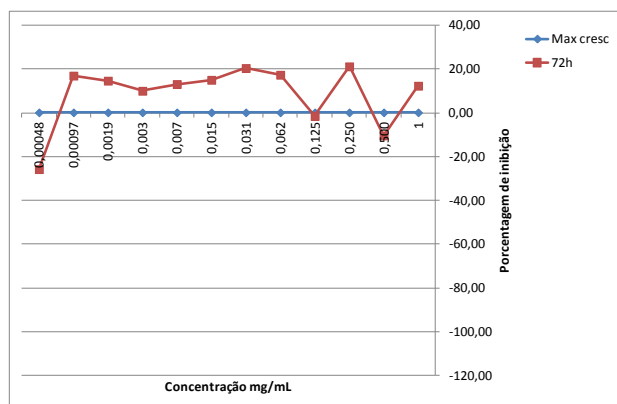
Curva de crescimento planctônico de *C. albicans* CBS 562 na presença do óleo essencial de *A. gratissima* no período de 0,24,48 h.



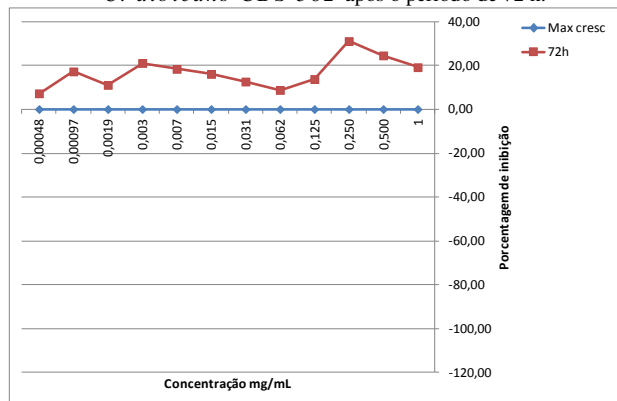
Curva de crescimento planctônico de *C. albicans* CBS 562 na presença da fração F4 *A. gratissima* no período de 0,24,48 h.



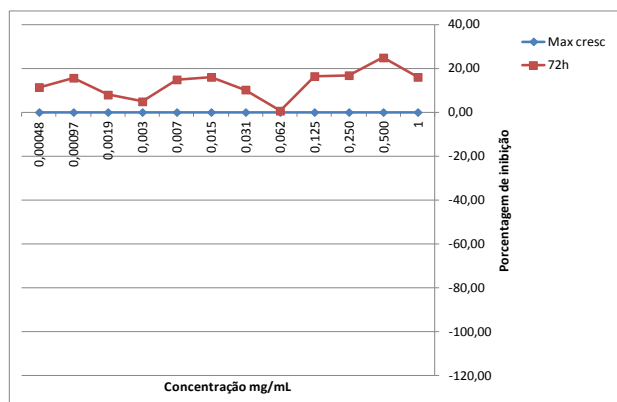
Curva de crescimento planctônico de *C. albicans* CBS 562 na presença do óleo essencial de *L. sidoides* no período de 0,24,48 h.



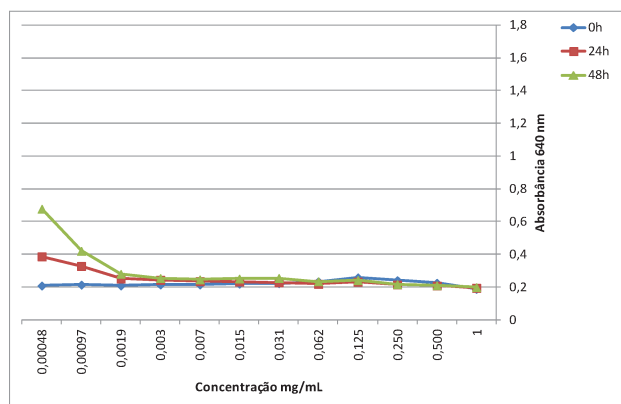
Efeito do óleo essencial de *A. gratissima* sobre o biofilme formado de *C. albicans* CBS 562 após o período de 72 h.



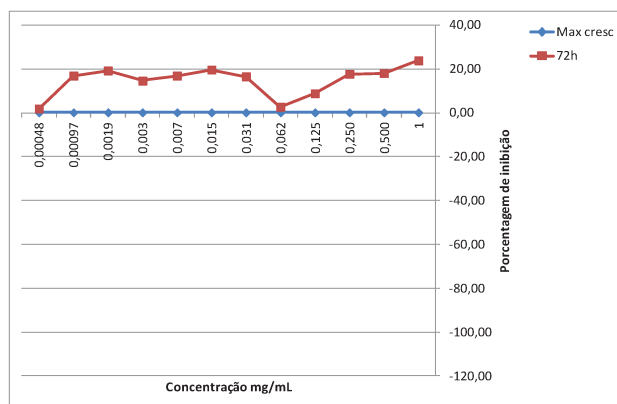
Efeito da fração F4 *A. gratissima* sobre o biofilme formado de *C. albicans* CBS 562 após o período de 72 h.



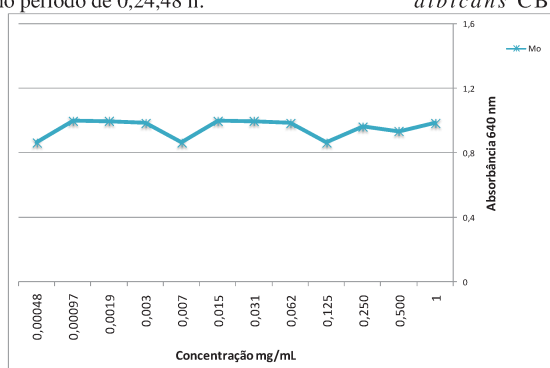
Efeito do óleo essencial de *L. sidoides* sobre o biofilme formado de *C. albicans* CBS 562 após o período de 72 h.



Curva de crescimento planctônico de *C. albicans* CBS 562 na presença da fração F2 *L. sidoides* no período de 0,24,48 h.

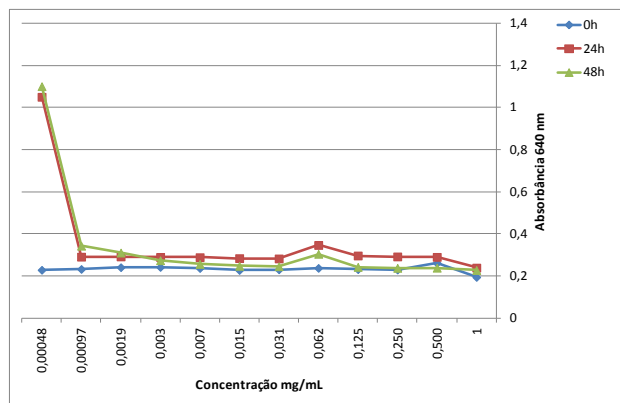


Efeito da fração F2 *L. sidoides* sobre o biofilme formado de *C. albicans* CBS 562 após o período de 72 h.

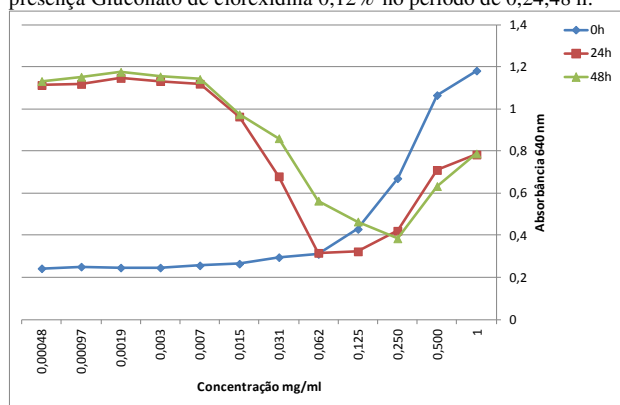


Curva de crescimento planctônico de *C. albicans* em 48 h.

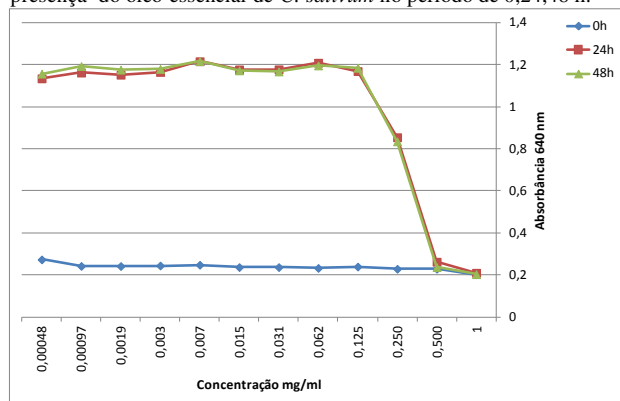
6.4. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais frente as células planctônicas e biofilme de *P. gingivalis* ATCC 33277



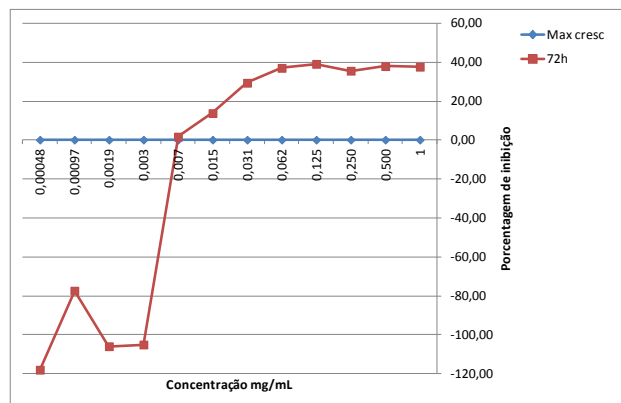
Curva de crescimento planctônico de *P. gingivalis* ATCC 33277 na presença de Gluconato de clorexidina 0,12% no período de 0,24,48 h.



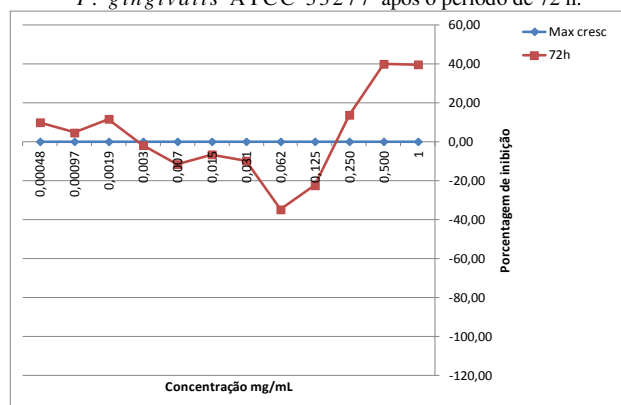
Curva de crescimento planctônico de *P. gingivalis* ATCC 33277 na presença do óleo essencial de *C. sativum* no período de 0,24,48 h.



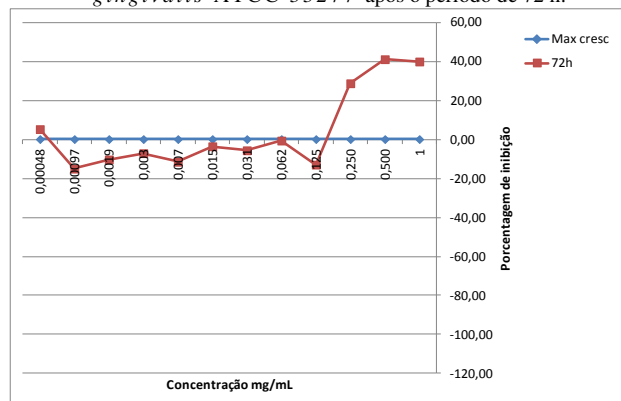
Curva de crescimento planctônico de *P. gingivalis* ATCC 33277 na presença do óleo essencial de *M. glomerata* no período de 0,24,48 h.



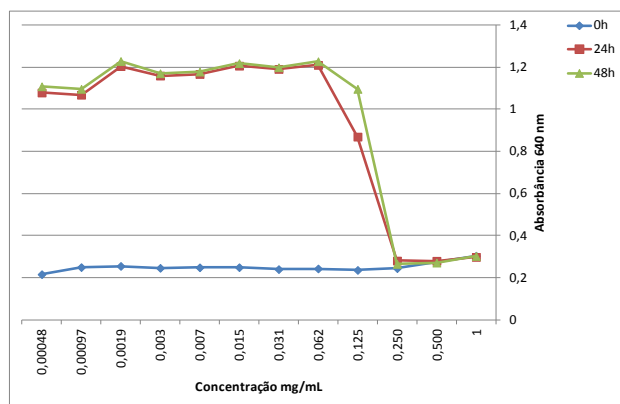
Efeito da Gluconato de clorexidina 0,12% sobre o biofilme formado de *P. gingivalis* ATCC 33277 após o período de 72 h.



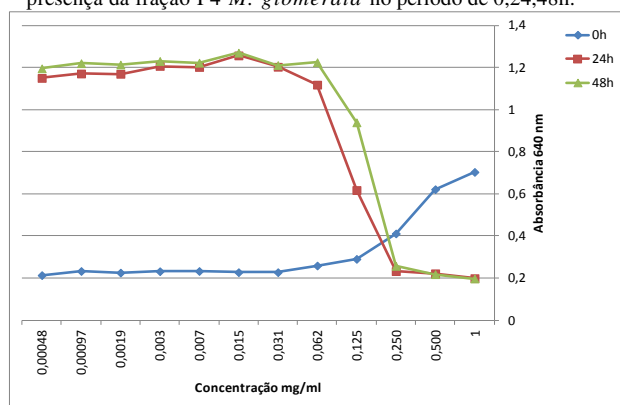
Efeito do óleo essencial de *C. sativum* sobre o biofilme formado de *P. gingivalis* ATCC 33277 após o período de 72 h.



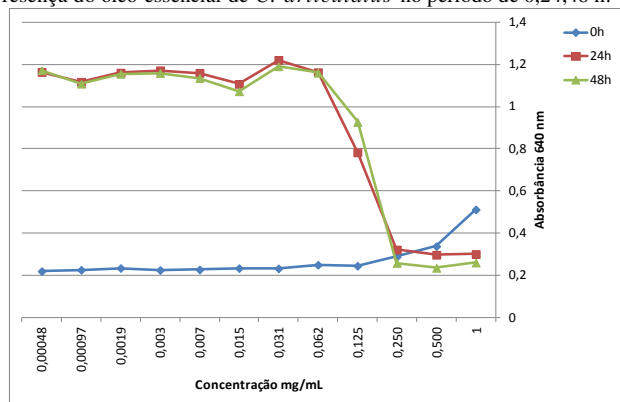
Efeito do óleo essencial de *M. glomerata* sobre o biofilme formado de *P. gingivalis* ATCC 33277 após o período de 72 h.



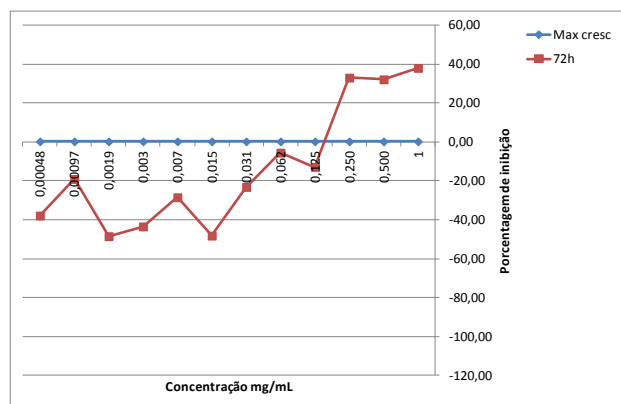
Curva de crescimento planctônico de *P. gingivalis* ATCC 33277 na presença da fração F4 *M. glomerata* no período de 0,24,48 h.



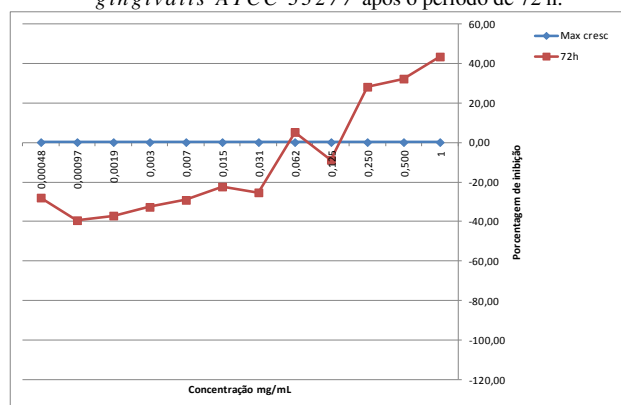
Curva de crescimento planctônico de *P. gingivalis* ATCC 33277 na presença do óleo essencial de *C. articulatus* no período de 0,24,48 h.



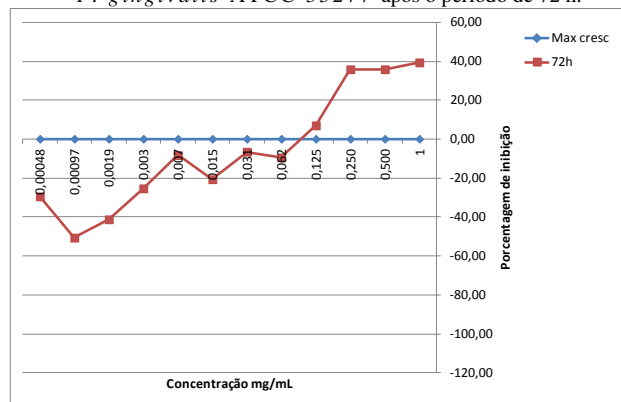
Curva de crescimento planctônico de *P. gingivalis* ATCC 33277 na presença da fração F4 *C. articulatus* no período de 0,24,48 h.



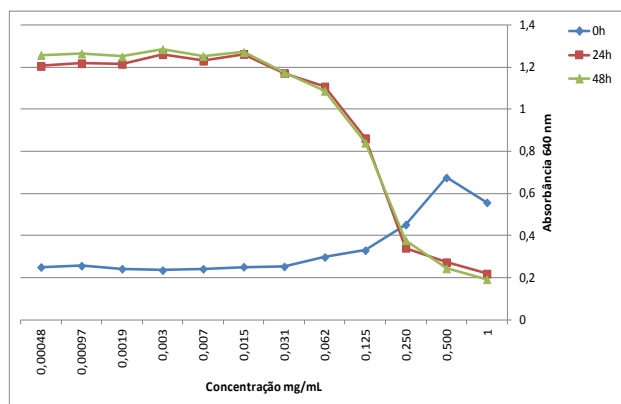
Efeito da fração F4 *M. glomerata* sobre o biofilme formado de *P. gingivalis* ATCC 33277 após o período de 72 h.



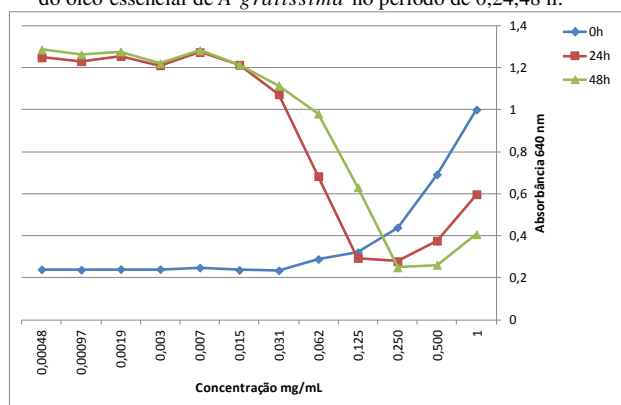
Efeito do óleo essencial de *C. articulatus* sobre o biofilme formado de *P. gingivalis* ATCC 33277 após o período de 72 h.



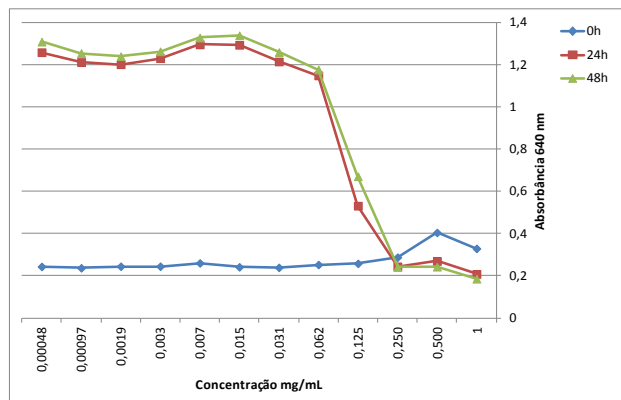
Efeito da fração F4 *C. articulatus* sobre o biofilme formado de *P. gingivalis* ATCC 33277 após o período de 72 h.



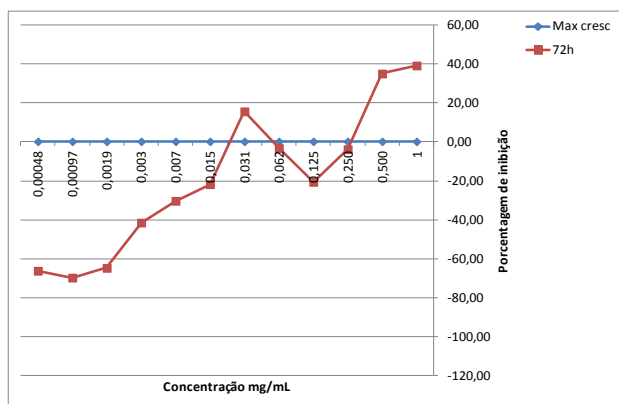
Curva de crescimento planctônico de *P. gingivalis* ATCC 33277 na presença do óleo essencial de *A. gratissima* no período de 0,24,48 h.



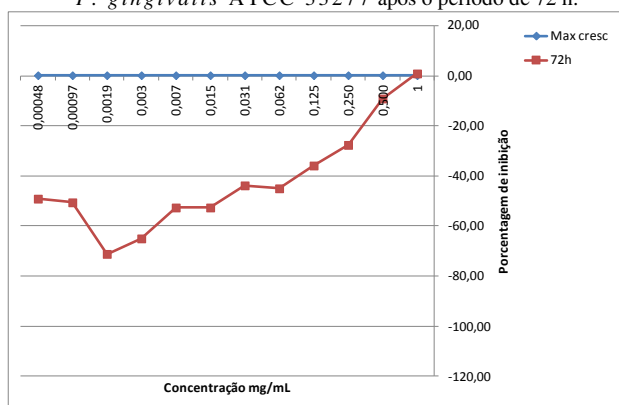
Curva de crescimento planctônico de *P. gingivalis* ATCC 33277 na presença da fração F4 *A. gratissima* no período de 0,24,48h.



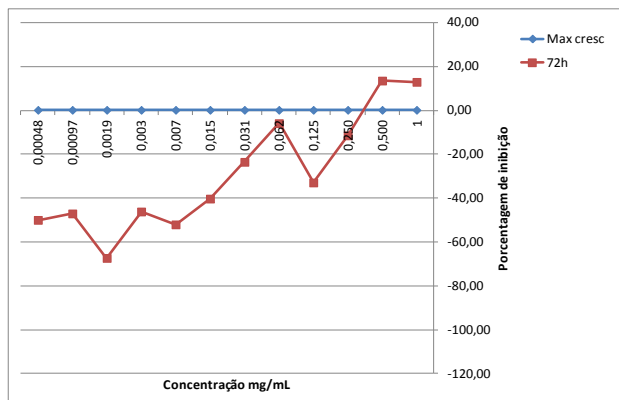
Curva de crescimento planctônico de *P. gingivalis* ATCC 33277 na presença do óleo essencial de *L. sidoides* no período de 0,24,48 h.



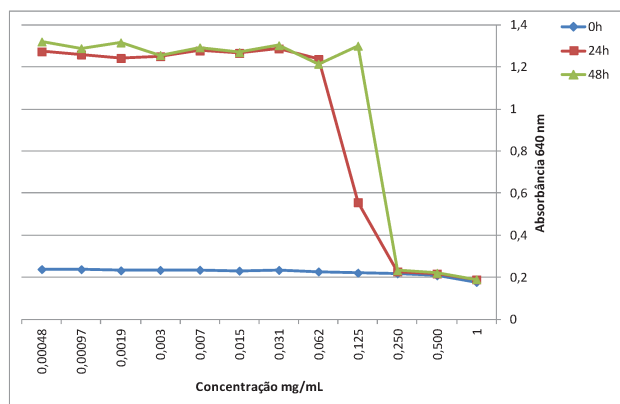
Efeito do óleo essencial de *A. gratissima* sobre o biofilme formado de *P. gingivalis* ATCC 33277 após o período de 72 h.



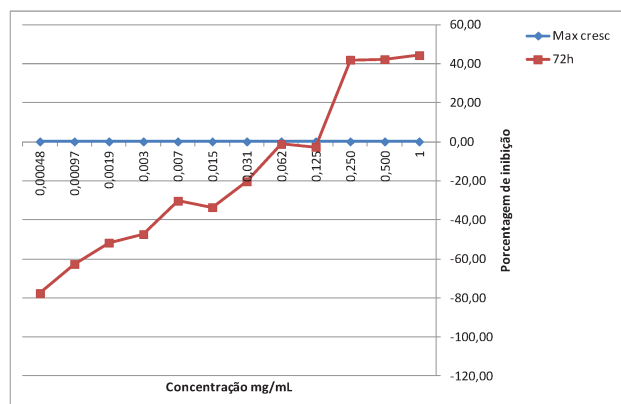
Efeito da fração F4 *A. gratissima* sobre o biofilme formado de *P. gingivalis* ATCC 33277 após o período de 72 h.



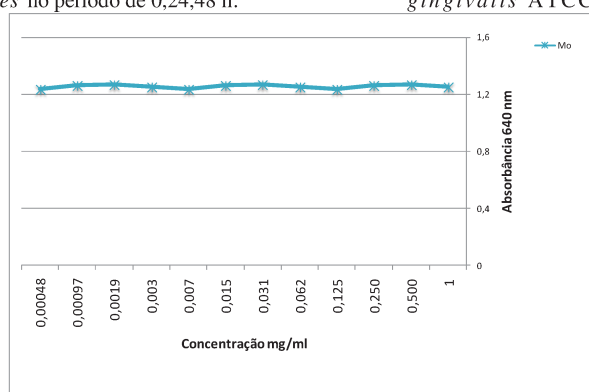
Efeito do óleo essencial de *L. sidoides* sobre o biofilme formado de *P. gingivalis* ATCC 33277 após o período de 72 h.



Curva de crescimento planctônico de *P. gingivalis* ATCC 33277 na presença da fração de F2 *L. sidoides* no período de 0,24,48 h.

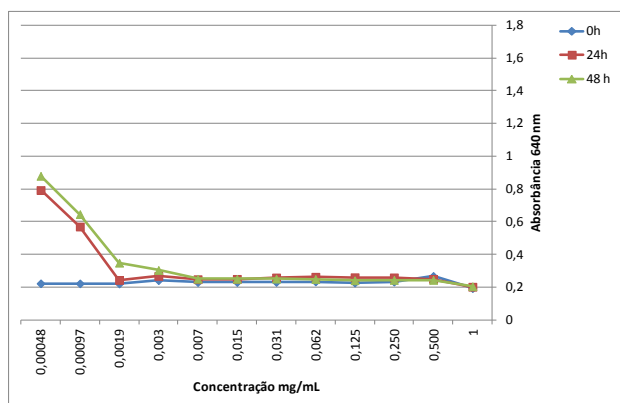


Efeito da fração F2 *L. sidoides* sobre o biofilme formado de *P. gingivalis* ATCC 33277 após o período de 72 h.

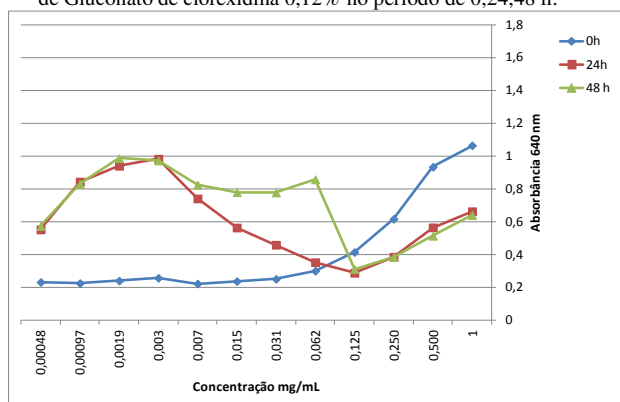


Curva de crescimento planctônico de *P. gingivalis* em 48 h.

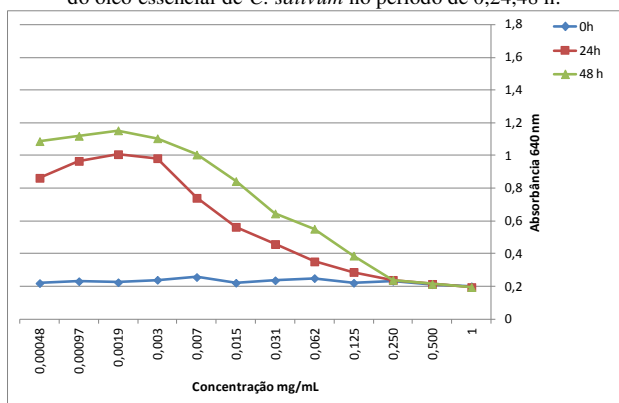
6.5. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais frente as células planctônicas e biofilme de *S. sanguis* ATCC 10556.



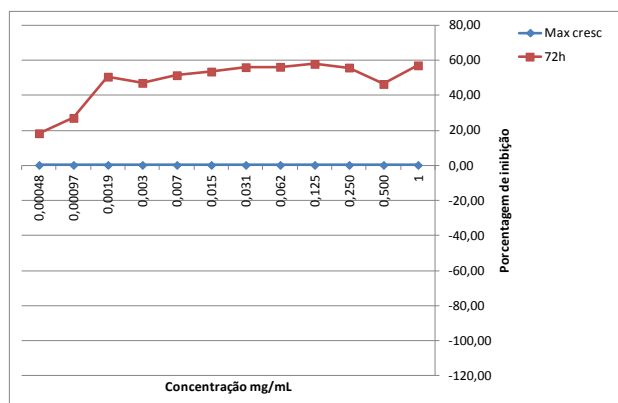
Curva de crescimento planctônico de *S. sanguis* ATCC 10556 na presença de Gluconato de clorexidina 0,12% no período de 0,24,48 h.



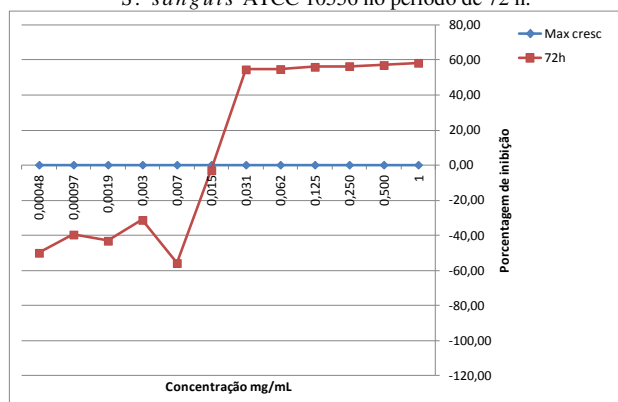
Curva de crescimento planctônico de *S. sanguis* ATCC 10556 na presença do óleo essencial de *C. sativum* no período de 0,24,48 h.



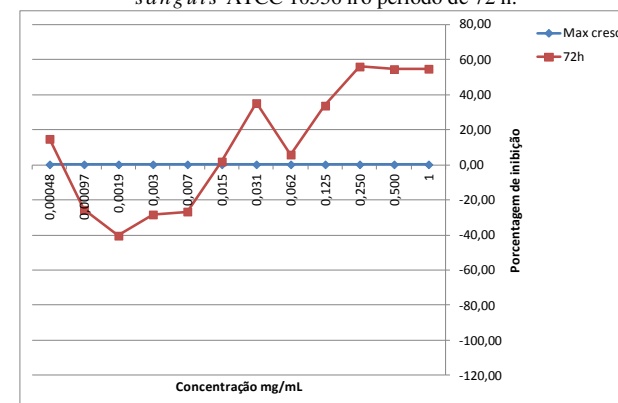
Curva de crescimento planctônico de *S. sanguis* ATCC 10556 na presença do óleo essencial de *M. glomerata* no período de 0,24,48 h.



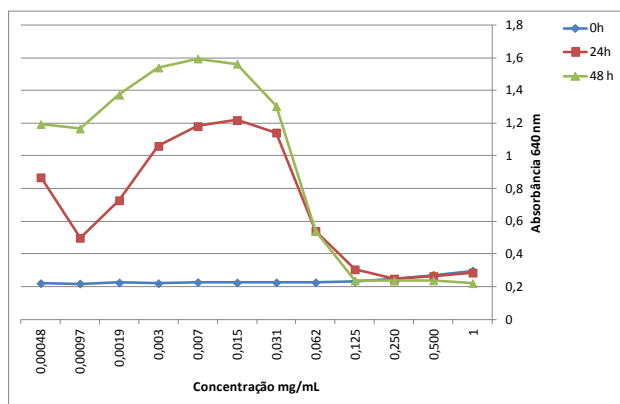
Efeito do gluconato de clorexidina a 0,12% sobre o biofilme formado de *S. sanguis* ATCC 10556 no período de 72 h.



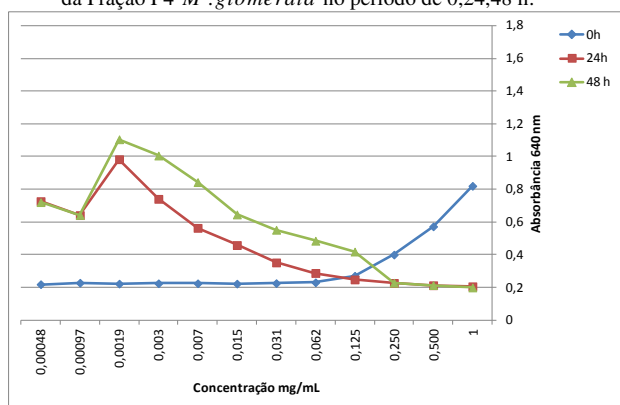
Efeito do óleo essencial de *C. sativum* sobre o biofilme formado de *S. sanguis* ATCC 10556 no período de 72 h.



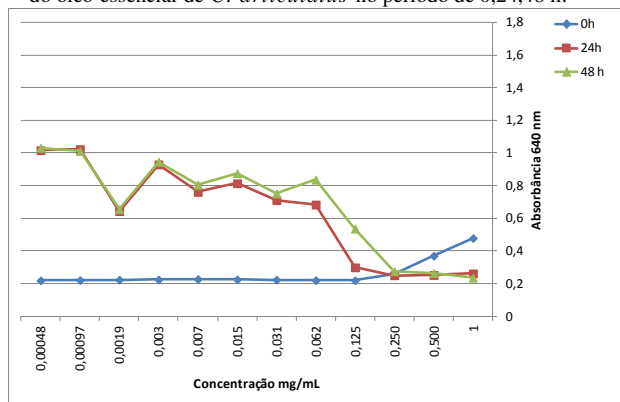
Efeito do óleo essencial de *M. glomerata* sobre o biofilme formado de *S. sanguis* ATCC 10556 no período de 72 h.



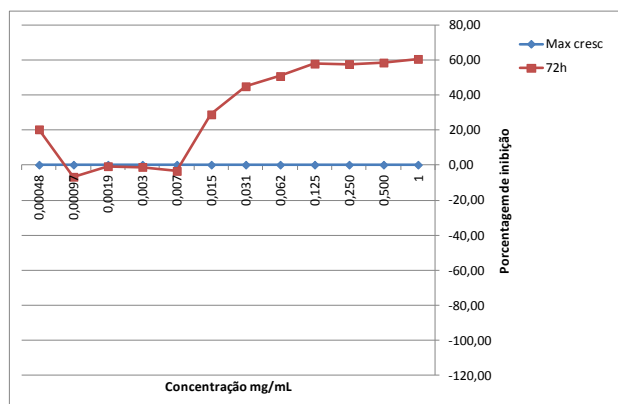
Curva de crescimento planctônico de *S. sanguis* ATCC 10556 na presença da Fração F4 *M. glomerata* no período de 0,24,48 h.



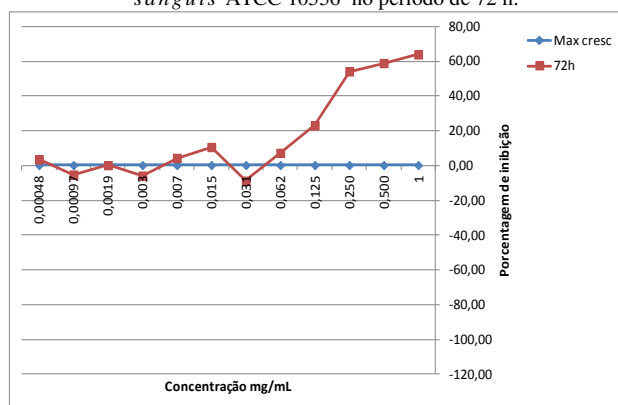
Curva de crescimento planctônico de *S. sanguis* ATCC 10556 na presença do óleo essencial de *C. articulatus* no período de 0,24,48 h.



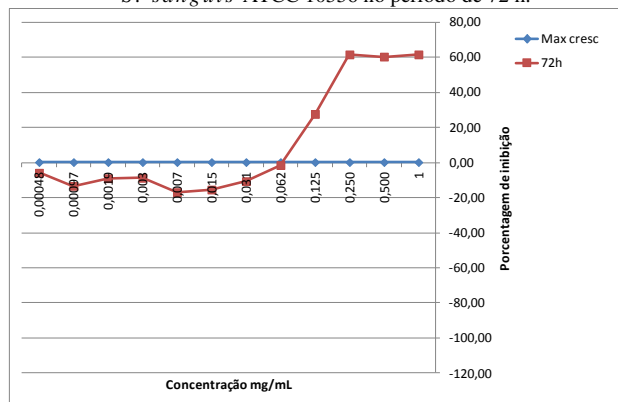
Curva de crescimento planctônico de *S. sanguis* ATCC 10556 na presença do óleo essencial de F4 *C. articulatus* no período de 0,24,48 h.



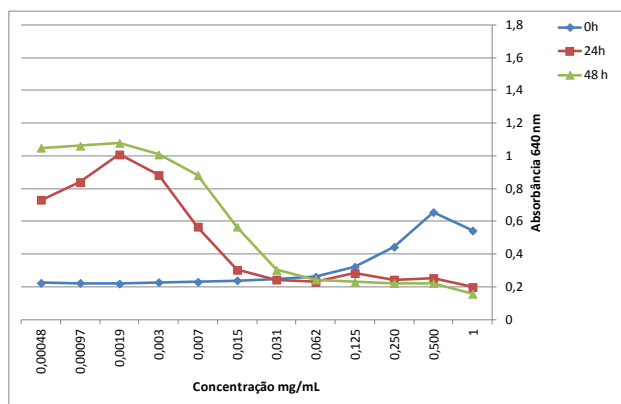
Efeito da Fração de F4 *M. glomerata* sobre o biofilme formado de *S. sanguis* ATCC 10556 no período de 72 h.



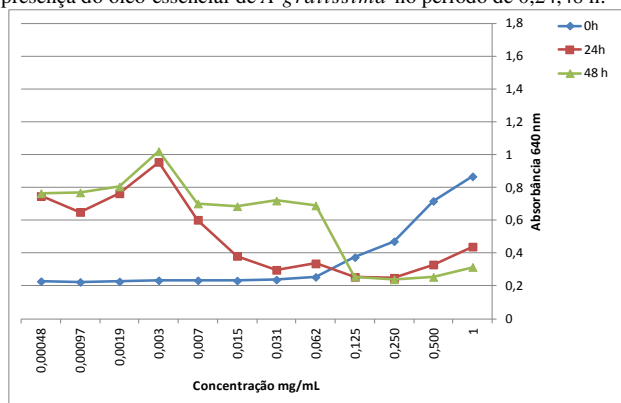
Efeito do óleo essencial de *C. articulatus* sobre o biofilme formado de *S. sanguis* ATCC 10556 no período de 72 h.



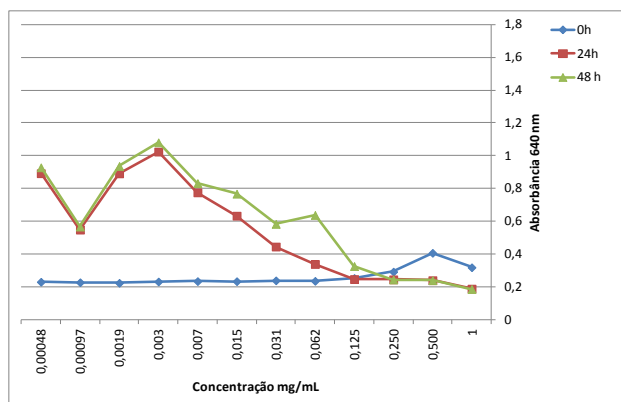
Efeito da Fração F4 *C. articulatus* sobre o biofilme formado de *S. sanguis* ATCC 10556 no período de 72 h.



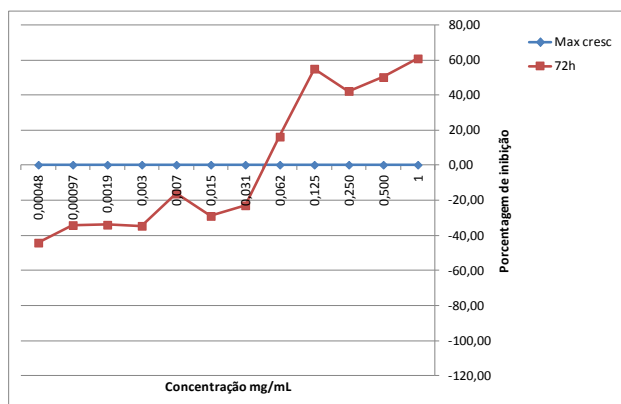
Curva de crescimento planctônico de *S. sanguis* ATCC 10556 na presença do óleo essencial de *A. gratissima* no período de 0,24,48 h.



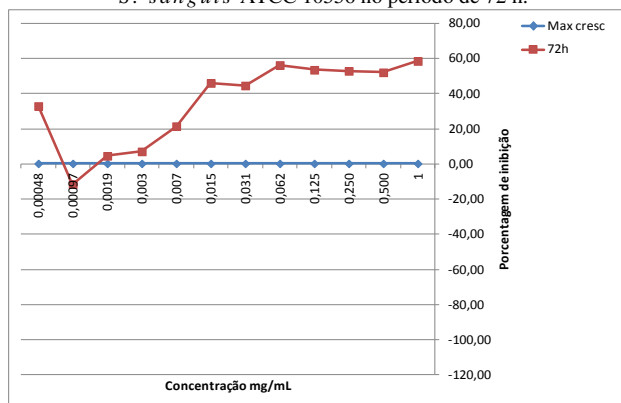
Curva de crescimento planctônico de *S. sanguis* ATCC 10556 na presença do óleo essencial de F4 *A. gratissima* no período de 0,24,48 h.



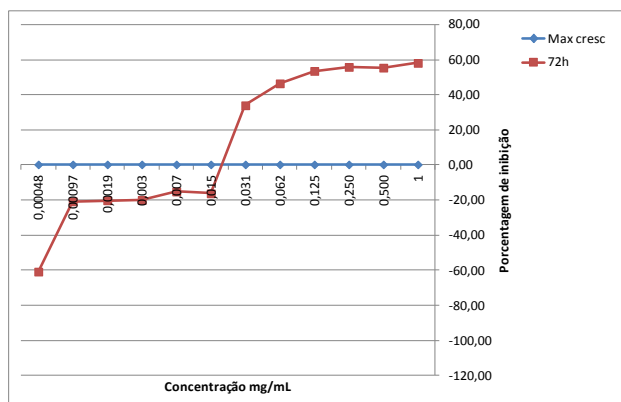
Curva de crescimento planctônico de *S. sanguis* ATCC 10556 na presença do óleo essencial de *L. sidoides* no período de 0,24,48 h.



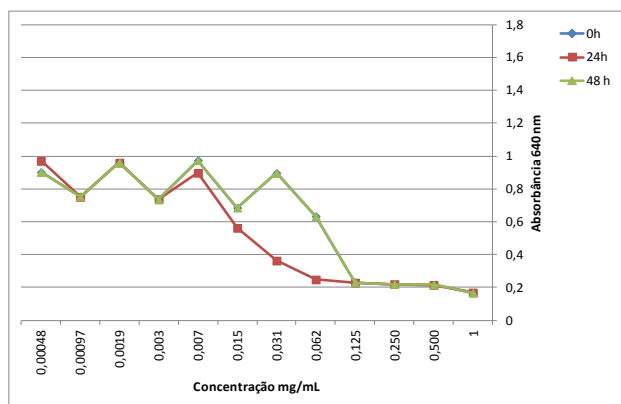
Efeito do óleo essencial de *A. gratissima* sobre o biofilme formado de *S. sanguis* ATCC 10556 no período de 72 h.



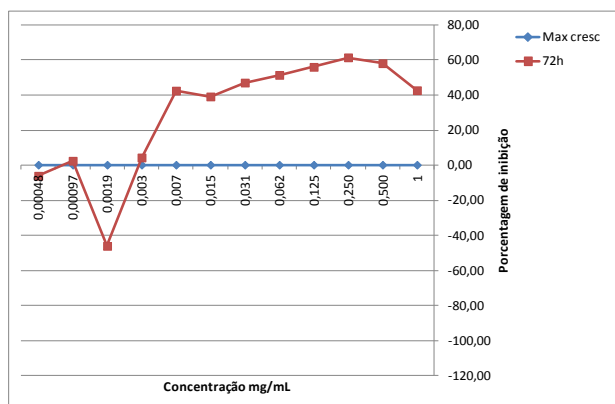
Efeito da Fração F4 *A. gratissima* sobre o biofilme formado de *S. sanguis* ATCC 10556 no período de 72 h.



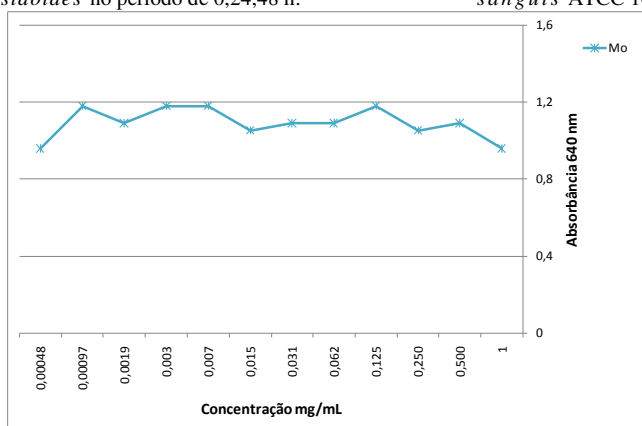
Efeito do óleo essencial de *L. sidoides* sobre o biofilme formado de *S. sanguis* ATCC 10556 no período de 72 h.



Curva de crescimento planctônico de *S. sanguis* ATCC 10556 na presença do óleo essencial de F2 *L. sidoides* no período de 0,24,48 h.



Efeito da Fração F2 *L. sidoides* sobre o biofilme formado de *S. sanguis* ATCC 10556 no período de 72 h.

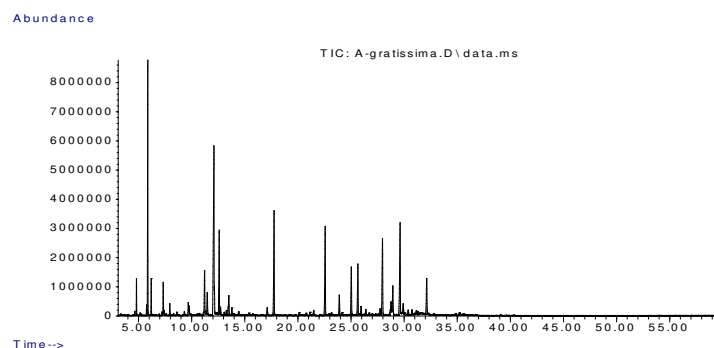


Curva de crescimento planctônico de *S. sanguis* em 48 h.

Apêndice 7: Composição química dos óleos essenciais e respectivas frações analisadas por CG-EM.

1- Identificação dos analitos do óleo essencial de *A. gratissima*

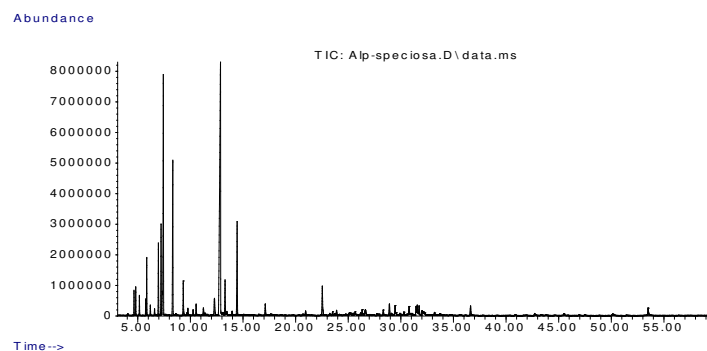
<i>A. gratissima</i>			
Composto	t _R (min)	IR	% rel.
alfa-pineno	4,81	933	1,35
sabineno	5,76	973	0,48
beta-pineno	5,87	977	12,01
beta-mirceno	6,20	991	1,57
limoneno	7,37	1029	1,51
trans-beta-ocimeno	7,94	1046	0,61
hidrato de trans-sabineno	9,69	1099	0,71
linalol	9,77	1101	0,49
trans-pinocarveol	11,22	1138	2,96
trans-verbenol	11,48	1145	1,59
trans-pinocanfona	12,10	1161	16,07
pinocarvona	12,15	1162	1,28
cis-pinocanfona	12,59	1173	6,04
terpin-4-ol	12,72	1177	0,54
mirtenol	13,50	1196	1,81
M = 154	13,78	1203	0,51
acetato de bornila	17,12	1284	0,59
acetato de trans-pinocarvila	17,76	1299	8,19
trans-cariofileno	22,57	1416	7,19
alfa-humuleno	23,91	1449	1,54
gama-muroleno	25,03	1477	3,79
biciclogermaceno	25,65	1493	4,20
germacreno A	25,95	1500	0,65
cubebol	26,39	1512	0,50
elemol	27,75	1547	0,48
M = 204	27,97	1553	6,44
espatulenol	28,77	1574	1,54
óxido de cariofileno	28,94	1578	2,60
guaíol	29,62	1596	8,53
M = 204	29,92	1604	1,09
bulnesol	32,13	1665	3,14



Cromatograma do óleo essencial de *A. gratissima*

2. Identificação dos analitos do óleo essencial de *A. speciosa*

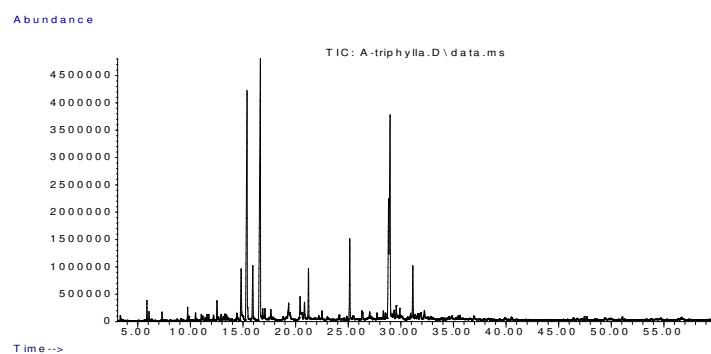
<i>A. speciosa</i>			
Identificação	t _R (min)	IR	% rel.
alfa-tujeno	4,65	926	0,95
alfa-pineno	4,81	933	1,14
canfeno	5,16	947	0,86
sabineno	5,76	972	0,74
beta-pineno	5,85	977	2,62
beta-mirceno	6,20	991	0,81
alfa-felandreno	6,60	1006	0,34
alfa-terpineno	6,97	1017	3,71
para-cimeno	7,22	1024	5,24
limoneno	7,35	1028	1,30
eucaliptol	7,43	1031	14,16
gama-terpineno	8,33	1058	9,43
terpinoleno	9,33	1088	2,18
linalol	9,76	1101	0,47
2-ciclohexen-1-ol	10,55	1121	0,79
M = 154	11,24	1139	0,58
borneol	12,29	1166	1,75
terpin-4-ol	12,86	1180	34,32
alfa-terpineol	13,30	1191	2,38
2-norbornanol	14,45	1219	6,92
acetato de bornila	17,12	1284	0,86
trans-cariofileno	22,54	1415	2,60
óxido de cariofileno	28,92	1578	0,99
carotol	29,45	1592	0,65
gama-eudesmol	30,79	1628	0,94
beta-eudesmol	31,45	1646	0,80
alfa-eudesmol	31,56	1649	1,07
M = 204	31,74	1654	0,88
M = 234	36,63	1792	0,87



Cromatograma do óleo essencial de *A. speciosa*

3. Identificação dos analitos do óleo essencial de *A. triphylla*

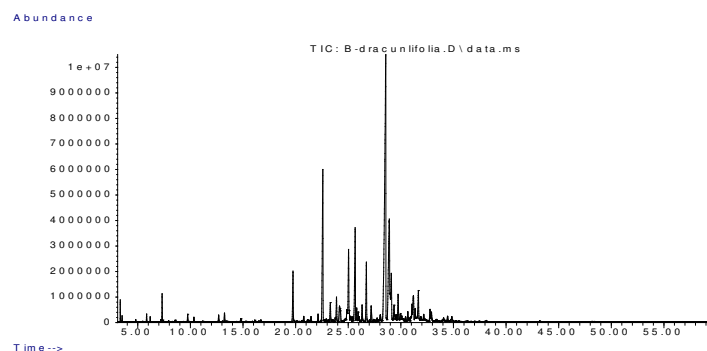
<i>A. triphylla</i>			
Identificação	t _R (min)	IR	% rel.
1-octen-3-ol	5,87	978	0,79
6-metil-5-hepten-2-ona	6,07	986	0,34
limoneno	7,31	1028	0,37
linalol	9,74	1101	0,58
mentol	12,53	1172	1,08
nerol	14,83	1229	4,31
neral	15,38	1242	18,97
geraniol	15,93	1255	3,58
geranial	16,65	1273	23,84
n.i.	16,88	1278	0,56
hidroxi citronelal	17,08	1283	0,60
carvacrol	17,64	1297	0,74
n.i.	19,34	1338	0,82
óxido de piperitenona	20,43	1364	1,95
n.i.	20,84	1374	1,34
acetato de geranila	21,23	1383	2,74
trans-cariofileno	22,51	1415	0,59
curcumeno	25,15	1480	4,83
gama-cadineno	26,31	1510	0,93
espatulenol	28,83	1576	8,51
óxido de cariofileno	28,97	1579	16,87
M = 218	29,57	1595	0,90
1,2-epoxi humuleno	29,90	1604	0,63
epi-alfa-cadinol	31,14	1638	3,36
14-hidroxi cariofileno	32,24	1668	0,76



Cromatograma do óleo essencial de *A. triphylla*

4. Identificação dos analitos do óleo essencial de *B. dracunculifolia*

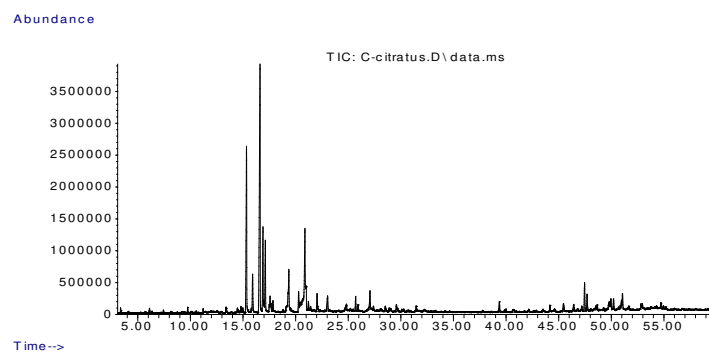
<i>B. dracunculifolia</i>			
Identificação	t _R (min)	IR	% rel.
3-hexen-1-ol	3,34	-----	0,52
beta-pineno	5,84	977	0,27
limoneno	7,32	1028	1,11
linalol	9,74	1101	0,34
alfa-terpineol	13,24	1190	0,48
éster etílico do ácido benzenopropanóico	19,75	1348	3,10
trans-cariofileno	22,58	1417	10,74
aromadendreno	23,30	1434	1,18
alfa-humuleno	23,89	1449	1,38
M = 204	24,17	1456	1,94
gama-muuroleno	24,88	1474	0,73
germacreno D	25,04	1478	4,92
biciclogermacreno	25,66	1493	6,78
alfa-muuroleno	25,81	1497	0,74
germacreno A	25,95	1500	0,52
gama-cadineno	26,32	1510	1,06
delta-cadineno	26,73	1521	3,65
M = 204	27,19	1533	1,09
trans-nerolidol	28,56	1568	31,68
espatulenol	28,90	1577	13,57
globulol	29,10	1582	3,57
viridiflorol	29,35	1589	1,21
M = 222	29,75	1599	1,73
1-epi-cubenol	30,66	1624	0,56
M = 220	31,06	1635	0,98
epi-alfa-muurolol	31,20	1639	2,15
alfa-muurolol	31,36	1643	0,57
alfa-cadinol	31,67	1652	2,03
M = 220	32,78	1683	0,84
chiobunol	32,91	1686	0,59



Cromatograma do óleo essencial de *B. dracunculifolia*

5. Identificação dos analitos do óleo essencial de *C. citratus*

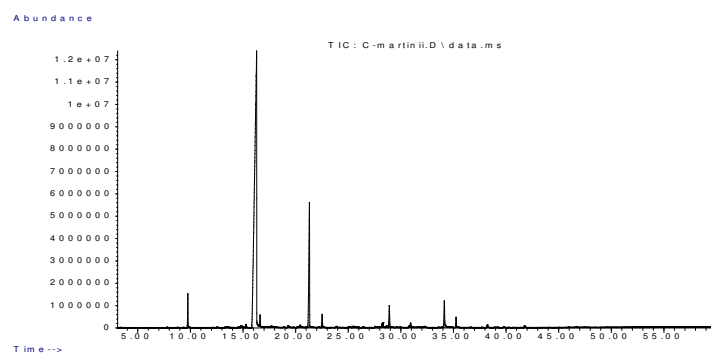
<i>C. citratus</i>			
Identificação	t _R (min)	IR	% rel.
neral	15,33	1241	16,46
geraniol	15,92	1255	3,68
geranial	16,62	1272	30,56
n.i.	16,90	1279	7,08
hidroxi citronelal	17,12	1284	6,28
M = 184	17,58	1295	0,71
M = 168	19,36	1338	6,11
n.i.	20,29	1361	1,27
n.i.	20,89	1375	11,41
M = 168	21,01	1378	2,70
M = 184	22,04	1403	2,06
M = 212	23,04	1428	1,94
M = 198	25,71	1494	1,29
n.i.	27,07	1530	2,39
n.i.	47,46	-----	2,71
n.i.	47,70	-----	1,79
n.i.	51,06	-----	1,55



Cromatograma do óleo essencial de *C. citratus*

6. Identificação dos analitos do óleo essencial de *C. martinii*

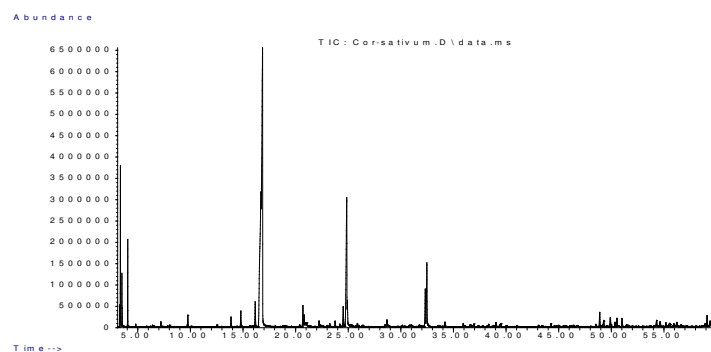
<i>C. martinii</i>			
Identificação	t _R (min)	IR	% rel.
linalol	9,76	1101	2,03
neral	15,29	1240	0,25
geraniol	16,27	1264	76,64
geranial	16,63	1272	0,98
n.i.	20,42	1364	0,27
acetato de geranila	21,30	1385	12,26
trans-cariofileno	22,53	1415	1,02
n-butirato de geranila	28,21	1559	0,27
trans-nerolidol	28,31	1562	0,39
óxido de cariofileno	28,91	1577	1,91
n.i.	30,93	1632	0,43
E,E-farnesol	34,14	1721	2,53
n.i.	35,26	1753	0,78
(2E,6E)-acetato de farnesila	38,23	1840	0,23



Cromatograma do óleo essencial de *C. martinii*

7. Identificação dos analitos do óleo essencial de *C. sativum*

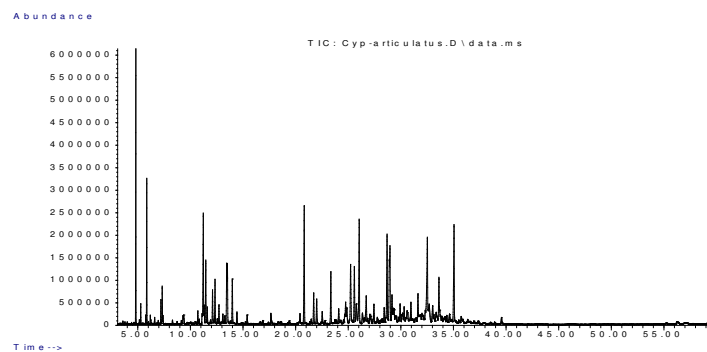
<i>C. sativum</i>			
Identificação	t _R (min)	IR	% rel.
3-hexen-1-ol <E>	3,28	-----	0,79
3-hexen-1-ol <Z>	3,35	-----	5,11
2-hexen-1-ol <E>	3,50	-----	2,17
nonano	4,05	901	2,70
linalol	9,76	1101	0,77
decanal	13,86	1205	0,66
n.i.	14,79	1228	1,07
trans-2-decenal	16,16	1261	1,77
2-decen-1-ol <E>	16,70	1271	23,59
1-decanol	16,86	1269	33,91
2-undecen-1-ol <E>	20,70	1370	1,44
M = 154	20,82	1373	0,71
trans-2-dodecanal	24,53	1465	1,67
2-dodecen-1-ol	24,86	1469	13,06
1-dodecanol	24,92	1475	1,71
M = 180	28,69	1572	0,49
tetradecanol	32,33	1670	2,92
2-tetradecen-1-ol <E>	32,47	1674	5,46



Cromatograma do óleo essencial de *C. sativum*

8. Identificação dos analitos do óleo essencial de *C. articulatus*

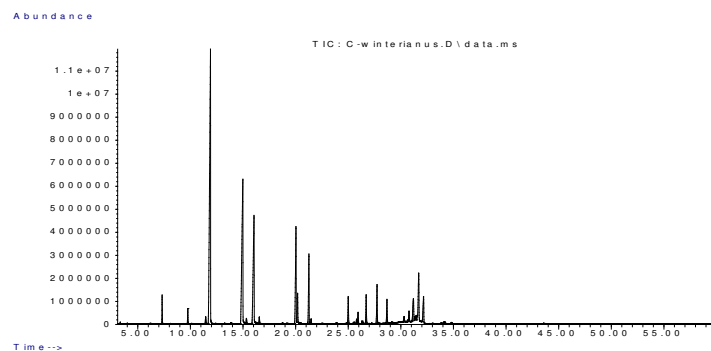
<i>C. articulatus</i>			
Identificação	t _R (min)	IR	% rel.
alfa-pineno	4,82	933	7,82
tuja-2,4-(10)-dieno	5,29	953	0,66
beta-pineno	5,86	977	4,81
para-cimeno	7,20	1024	0,94
limoneno	7,32	1028	1,36
trans-pinocarveol	11,23	1138	6,02
trans-verbenol	11,47	1144	3,08
pinocarvona	12,11	1161	1,67
alfa-felandren-8-ol	12,35	1167	2,25
mirtenal	13,46	1195	3,22
mirtenol	13,52	1197	2,89
verbenona	13,99	1208	2,28
alfa-copaeno	20,82	1373	6,79
cipereno	21,72	1395	1,79
n.i.	22,01	1402	1,51
alfa-guaieno	23,35	1436	2,98
M = 204	24,75	1471	0,83
beta-selineno	25,23	1482	4,50
alfa-selineno	25,59	1491	3,35
alfa-bulneseno	26,05	1503	6,87
cis-calameneno	26,72	1520	1,98
M = 220	28,69	1572	6,10
n.i.	28,91	1577	3,24
óxido de cariofileno	28,97	1579	4,36
n.i.	29,16	1584	1,45
pogostol	31,63	1651	1,48
mustacona	32,52	1675	6,06
cis-tujopsenal	33,62	1706	3,24
M = 218	35,06	1747	6,48



Cromatograma do óleo essencial de *C. articulatus*

9. Identificação dos analitos do óleo essencial de *C. winterianus*

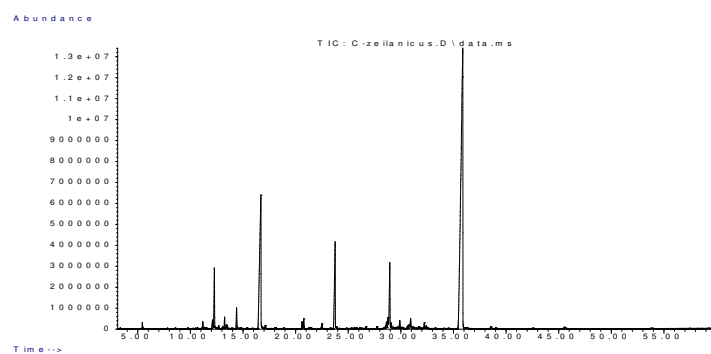
<i>C. winterianus</i>			
Identificação	t _R (min)	IR	% rel.
limoneno	7,32	1028	1,27
linalol	9,76	1101	0,81
isopulegol	11,45	1144	0,48
citronelal	11,90	1156	30,96
citronelol	14,98	1232	17,81
neral	15,33	1241	0,35
geraniol	16,05	1258	11,97
geranial	16,55	1270	0,37
acetato de citronelila	20,03	1354	7,79
eugenol	20,19	1358	2,08
acetato de geranila	21,26	1384	4,81
beta-elemeno	21,48	1389	0,33
germacreno D	25,00	1477	1,81
alfa-muroleno	25,80	1497	0,31
germacreno A	25,94	1500	0,78
delta-cadineno	26,70	1520	1,98
elemol	27,74	1547	2,77
germacreno D-4-ol	28,68	1572	1,64
M = 222	30,32	1615	0,45
gama-eudesmol	30,78	1628	0,77
epi-alfa-murolol	31,20	1639	2,47
alfa-murolol	31,35	1643	0,39
beta-eudesmol	31,45	1646	0,43
alfa-cadinol	31,70	1653	4,84
bulnesol	32,16	1666	2,34



Cromatograma do óleo essencial de *C. winterianus*

10. Identificação dos analitos do óleo essencial de *C. zeilanicus*

<i>C. zeilanicus</i>			
Identificação	t _R (min)	IR	% rel.
benzaldeído	5,44	960	0,27
trans-pinocarveol	11,17	1137	0,37
benzenopropanal	12,11	1161	0,63
borneol	12,28	1165	3,57
terpin-4-ol	12,69	1176	0,14
alfa-terpineol	13,25	1190	0,57
mirtenol	13,43	1195	0,35
cis-cinamaldeído	14,39	1218	1,20
trans-cinamaldeído	16,68	1274	18,73
acetato de isobornila	17,12	1284	0,21
acetato de hidrocinamila	20,62	1369	0,39
isoleveno	20,77	1372	0,62
trans-cariofileno	22,51	1415	0,35
acetato de trans-cinamila	23,74	1445	7,40
n.i.	28,64	1570	0,62
espatulenol	28,78	1574	0,76
óxido de cariofileno	28,95	1578	4,71
M = 222	29,10	1583	0,38
M = 220	29,90	1603	0,47
1-epi-cubenol	30,64	1624	0,20
M = 220	30,79	1628	0,25
n.i.	30,93	1632	0,72
14-hidroxi-9-epi-(E)-cariofileno	32,24	1668	0,40
M = 218	32,43	1673	0,21
benzoato de benzila	35,87	1770	56,47

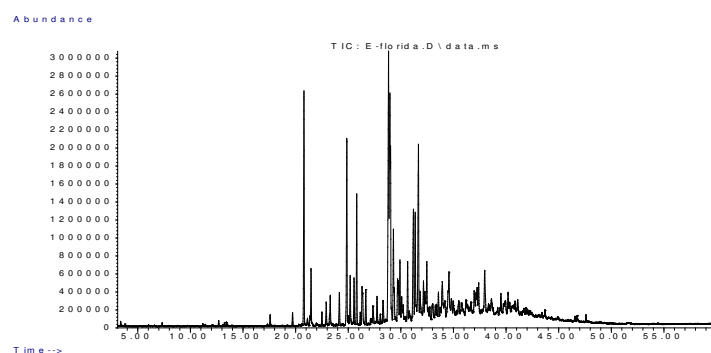


Cromatograma do óleo essencial de *C. zeilanicus*

11. Identificação dos analitos do óleo essencial de *E. florida*

E. florida

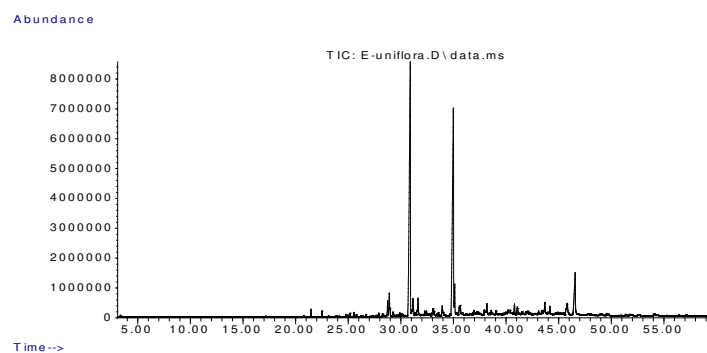
Identificação	t _R (min)	IR	% rel.
alfa-copaeno	20,79	1373	8,11
beta-elemeno	21,47	1389	2,20
aromadendreno	23,29	1434	1,34
dehidro aromadendreno	24,16	1456	1,25
gama-muuroleno	24,87	1473	6,82
beta-selineno	25,19	1481	1,90
epi-cubebol	25,55	1490	1,64
alfa-muuroleno	25,81	1497	4,52
gama-cadineno	26,32	1510	2,32
cis-calameneno	26,67	1519	1,25
espatulenol	28,83	1576	12,09
óxido de cariofileno	28,96	1579	17,26
globulol	29,30	1588	4,30
rosifoliol	29,69	1598	1,37
M = 222	29,77	1600	1,33
M = 220	29,92	1604	2,08
1-epi-cubenol	30,65	1624	2,15
epi-alfa-muurolol	31,20	1639	5,63
alfa-muurolol	31,37	1644	4,26
alfa-cadinol	31,67	1652	7,88
trans-calamenen-10-ol	32,16	1665	1,03
mustacona	32,47	1674	1,95
n.i.	33,94	1715	1,61
n.i.	34,58	1733	3,08
M = 234	37,97	1832	2,65



Cromatograma do óleo essencial de *E. florida*

12. Identificação dos analitos do óleo essencial de *E.uniflora*

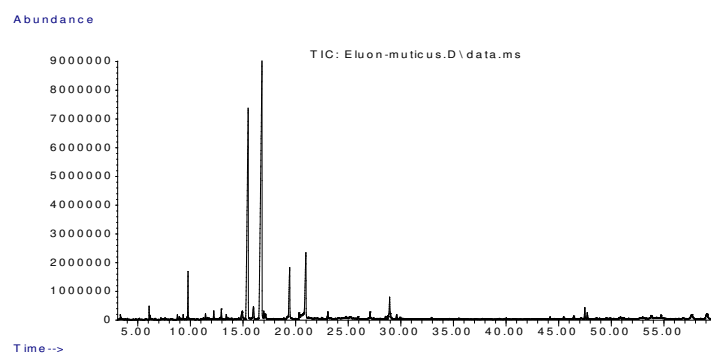
<i>E. uniflora</i>			
Identificação	t _R (min)	IR	% rel.
beta-elemeno	21,46	1389	0,58
espatulenol	28,75	1573	1,52
óxido de cariofileno	28,90	1577	2,68
selina-1,3,7(11)-trien-8-ona	30,90	1631	39,11
M = 234	31,16	1638	1,90
alfa-cadinol	31,63	1651	2,12
germacrona	33,05	1690	0,49
n.i.	33,94	1715	1,30
epóxido de selina-1,3,7(11)-trien-8-ona	34,99	1745	31,93
n.i.	35,12	1749	2,37
M = 230	35,55	1761	0,74
M = 230	35,65	1764	0,77
M = 248	38,18	1839	0,85
M = 230	40,80	1919	0,89
n.i.	41,08	1928	0,95
n.i.	43,69	----	1,45
n.i.	44,17	----	0,91
n.i.	45,81	----	2,52
n.i.	46,57	----	6,92



Cromatograma do óleo essencial de *E. uniflora*

13. Identificação dos analitos do óleo essencial de *E. muticus*

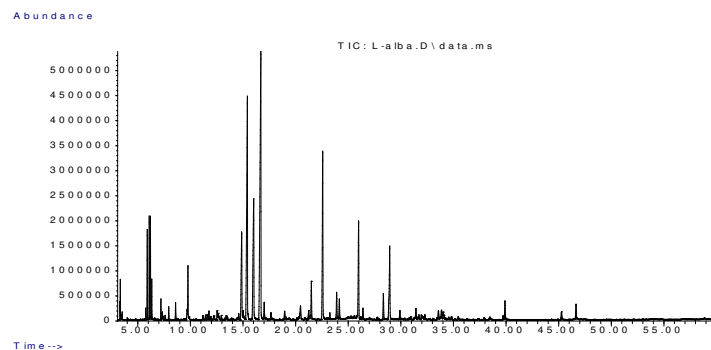
<i>E. muticus</i>			
Identificação	t _R (min)	IR	% rel.
6-metil-5-hepten-2-ona	6,08	986	0,55
linalol	9,78	1101	2,58
cis-crisantenol	12,22	1164	0,52
iso-citral	12,95	1182	0,67
citronelol	14,94	1231	1,25
beta-citral (ou neral)	15,49	1245	29,50
geraniol	16,00	1257	1,61
alfa-citral (ou geranial)	16,80	1276	43,78
n.i.	16,98	1280	0,30
n.i.	19,44	1340	5,69
n.i.	20,32	1361	0,34
n.i.	20,97	1377	8,08
M = 184	23,07	1429	0,70
n.i.	27,08	1530	0,62
óxido de cariofileno	28,94	1578	2,41
n.i.	47,49	-----	0,88
n.i.	47,72	-----	0,51



Cromatograma do óleo essencial de *E. muticus*

14. Identificação dos analitos do óleo essencial de *L. alba*

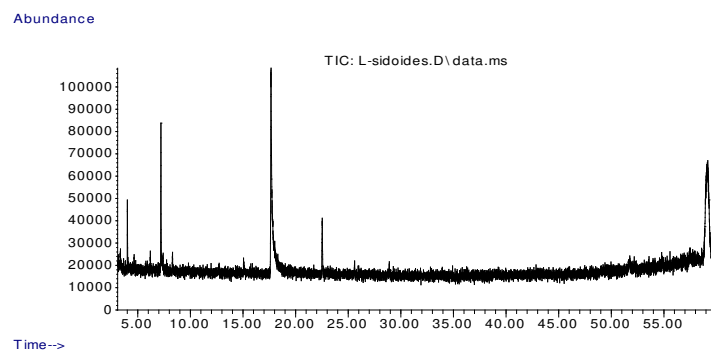
<i>L. alba</i>			
Identificação	t _R (min)	IR	% rel.
3-hexen-1-ol <E>	3,30	-----	0,34
3-hexen-1-ol <Z>	3,34	-----	0,89
sabineno	5,76	972	0,33
1-octen-3-ol	5,90	979	2,88
6-metil-5-hepten-2-ona	6,09	987	3,07
beta-mirceno	6,20	991	2,94
3-octanol	6,33	997	1,20
para-cimeno	7,20	1024	0,67
trans-ocimeno	7,94	1046	0,47
hidrato de cis-sabineno	8,60	1066	0,64
linalol	9,77	1101	1,99
nerol (ou cis-geraniol)	14,87	1230	5,81
neral (ou beta-citral)	15,41	1243	16,01
geraniol	16,02	1257	9,48
geranial	16,69	1274	22,58
M = 152	17,02	1281	0,79
óxido de piperitenona	20,47	1365	1,12
beta-elemeno	21,50	1390	1,93
trans-cariofileno	22,58	1416	9,25
alfa-humuleno	23,90	1449	1,37
trans-beta-farneseno	24,16	1456	0,96
germacreno A	25,99	1501	5,61
cubebol	26,40	1512	0,63
trans-nerolidol	28,34	1563	1,29
óxido de cariofileno	28,94	1578	4,95
M = 220	31,43	1645	0,85
n.i.	39,90	1891	1,05
n.i.	46,65	-----	0,90



Cromatograma do óleo essencial de *L. alba*

15. Identificação dos analitos do óleo essencial de *L. sidoides*

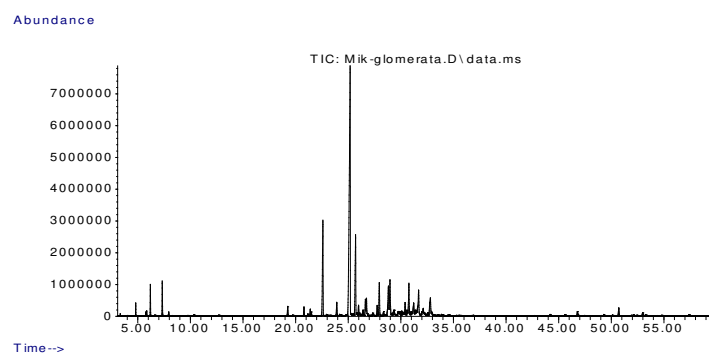
<i>L. sidoides</i>			
Identificação	t _R (min)	IR	% rel.
ciclohexanona	4,02	899	6,50
para-cimeno	7,20	1024	17,28
timol	17,67	1297	65,76
trans-cariofileno	22,53	1415	10,46



Cromatograma do óleo essencial de *L. sidoides*

16. Identificação dos analitos do óleo essencial de *M. glomerata*

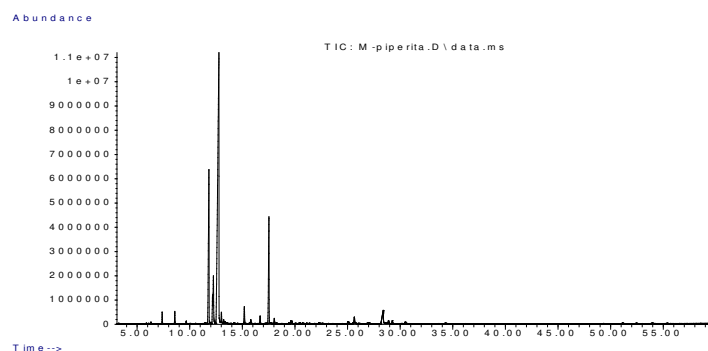
<i>M. glomerata</i>			
Identificação	t _R (min)	IR	% rel.
alfa-pineno	4,81	932	0,61
beta-mirceno	6,20	991	1,72
limoneno	7,33	1027	2,24
delta-elemeneno	19,25	1335	0,89
alfa-copaeno	20,80	1373	0,82
beta-cubebeno	21,40	1387	0,45
trans-cariofileno	22,59	1416	10,30
alfa-humuleno	23,91	1449	1,33
germacreno D	25,18	1481	41,57
biciclogermacreno	25,70	1494	8,69
germacreno A	25,98	1501	0,83
M = 204	26,64	1518	1,55
delta-cadineno	26,74	1521	1,74
elemol	27,75	1547	1,03
germacreno B	27,96	1552	3,64
espatulenol	28,82	1575	3,86
óxido de cariofileno	28,97	1579	4,52
n.i.	30,41	1617	1,26
M = 220	30,77	1627	3,79
epi-alfa-murolol	31,22	1639	1,36
alfa-cadinol	31,69	1652	3,62
n.i.	32,13	1664	0,68
M = 220	32,81	1683	2,64
n.i.	50,71	-----	0,88



Cromatograma do óleo essencial de *M. glomerata*

17. Identificação dos analitos do óleo essencial de *M.piperita*

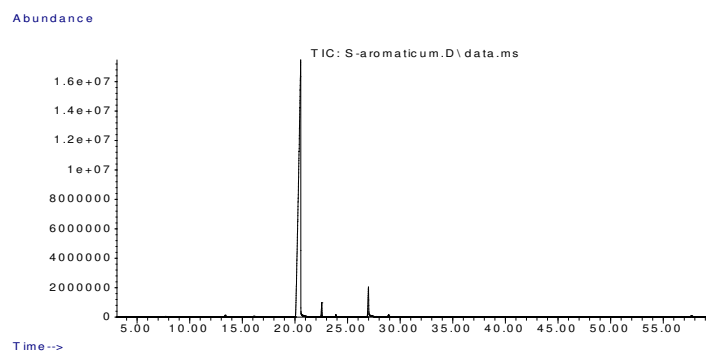
<i>M. piperita</i>			
Identificação	t _R (min)	IR	% rel.
1,8-cineol	7,39	1030	0,74
hidrato de cis-sabineno	8,58	1066	0,83
hidrato de trans-sabineno	9,67	1099	0,26
mentona	11,82	1154	16,28
iso-mentona	12,17	1163	2,16
neo-mentol	12,25	1165	4,57
iso-mentol	12,77	1178	55,66
neo-iso-mentol	13,02	1184	0,93
M = 138	13,22	1190	0,45
pulegona	15,19	1238	1,47
piperitona	15,80	1252	0,43
acetato de neo-mentila	16,69	1274	0,72
acetato de mentila	17,53	1294	10,40
acetato de iso-mentila	18,05	1306	0,41
M = 166	19,60	1344	0,19
n.i.	25,65	1493	0,94
n.i.	28,39	1564	2,90
n.i.	28,89	1577	0,35
M = 222	29,25	1586	0,30



Cromatograma do óleo essencial de *M. piperita*

18. Identificação dos analitos do óleo essencial de *S. aromaticum*

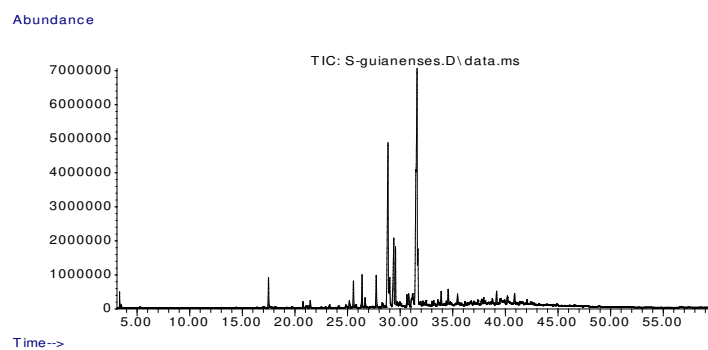
<i>S. aromaticum</i>			
Identificação	t _R (min)	IR	% rel.
eugenol	20,52	1366	94,32
trans-cariofileno	22,55	1416	1,38
alfa-humuleno	23,88	1449	0,22
acetato de eugenol	26,98	1527	3,84
óxido de cariofileno	28,90	1577	0,24



Cromatograma do óleo essencial de *S. aromaticum*

19. Identificação dos analitos do óleo essencial de *S. guianensis*

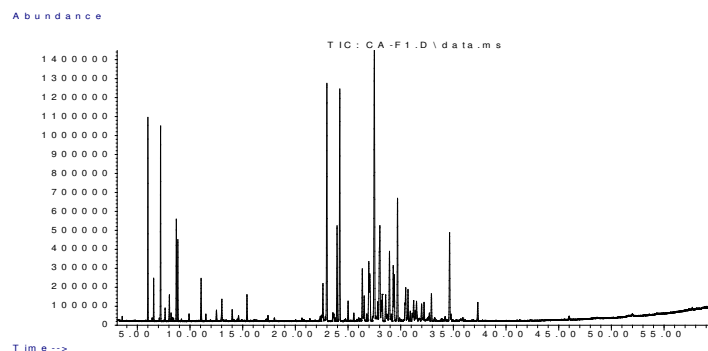
<i>S. guianensis</i>			
Identificação	t _R (min)	IR	% rel.
3-hexen-1-ol	3,34	-----	0,70
2-undecanona	17,49	1293	2,29
epi-cubebol	25,56	1491	2,03
cubebol	26,38	1512	2,73
elemol	27,73	1547	2,92
espatulenol	28,84	1576	20,82
M = 222	29,01	1580	2,22
M = 218	29,39	1590	7,64
M = 216	29,56	1594	4,43
1-epi-cubenol	30,64	1624	1,12
M = 222	30,80	1628	1,70
M = 220	31,18	1639	2,88
beta-eudesmol	31,60	1650	39,38
alfa-cadinol	31,69	1653	4,29
M = 220	33,90	1714	1,18
M = 238	34,56	1733	1,39
n.i.	35,46	1758	1,02
n.i.	39,17	1869	1,26



Cromatograma do óleo essencial de *S. guianensis*

20. Analitos identificados na amostra F1 de *C. articulatus*

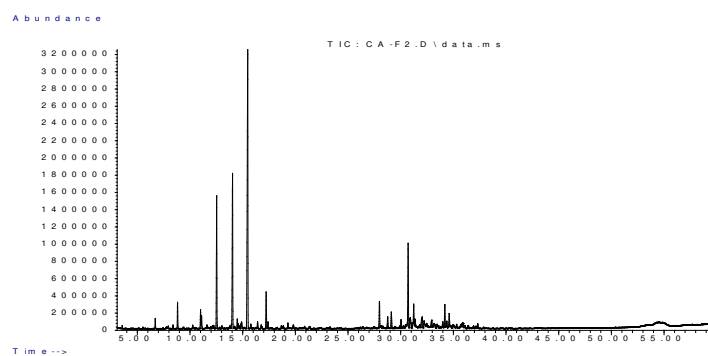
F1 de <i>C. articulatus</i>			
Identificação	t_R (min)	IR	% rel.
alfa-pineno	6,00	934	4,80
tuja-2,4(10)-dieno	6,56	954	1,10
beta-pineno	7,21	978	5,15
M = 134	8,05	1006	0,83
para-cimeno	8,71	1024	2,94
limoneno	8,85	1028	2,40
para-cimeneno	11,06	1089	1,64
trans-pinocarveol	13,02	1138	0,84
mirtenol	15,41	1196	1,01
ciclosativeno	22,62	1367	1,54
alfa-copaeno	23,00	1376	9,90
cipereno	23,96	1399	3,96
M = 202	24,22	1405	9,54
M = 202	25,01	1425	0,80
rotundeno	26,36	1458	2,18
M = 202	26,54	1463	1,16
M = 204	26,97	1473	2,55
gama-muroleno	27,06	1476	3,18
beta-selineno	27,50	1486	14,56
n.i.	28,02	1499	6,46
alfa-bulneseno	28,26	1505	1,13
nootcateno	28,57	1514	1,23
cis-calameneno	28,94	1523	3,29
gama-cupreneno	29,30	1532	2,31
M = 204	29,39	1535	1,85
alfa-calacoreno	29,70	1543	5,30
beta-calacoreno	30,48	1563	2,01
M = 220	30,70	1569	1,31
M = 200	32,92	1627	1,15
cadaleno	34,65	1674	3,90



Cromatograma da amostra F1 de *C. articulatus*

21. Analitos identificados na amostra F2 de *C. articulatus*

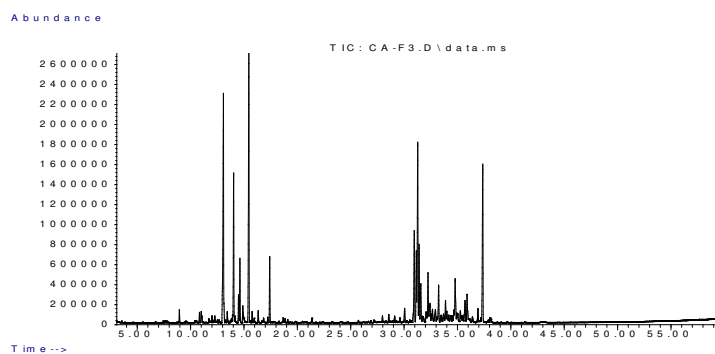
F2 de <i>C. articulatus</i>			
Identificação	t _R (min)	IR	% rel.
benzaldeído	6,71	959	0,62
1-para-menteno	8,82	1028	1,82
M = 152	11,01	1088	1,44
M = 152	11,10	1090	1,13
alfa-canfolenal	12,54	1127	11,35
pinocarvona	14,04	1163	14,67
cis-pinocanfona	14,50	1174	0,82
M = 152	14,90	1184	1,05
mirtenal	15,40	1196	33,03
aldeído cumínico (cuminal)	17,23	1239	3,42
carvotanacetona	17,41	1244	0,59
M = 220	27,98	1498	2,51
M = 220	28,77	1519	1,17
M = 220	29,11	1528	1,76
M = 220	30,04	1551	1,04
M = 220	30,71	1569	9,39
n.i.	30,92	1574	2,16
óxido de cariofileno	31,24	1583	2,87
M = 232	31,36	1586	1,10
M = 232	31,99	1602	0,92
beta-oplopenona	32,05	1604	1,09
M = 220	32,23	1609	0,60
M = 220	32,94	1628	0,93
M = 218	34,19	1662	2,41
M = 220	34,38	1667	0,80
M = 222	34,61	1674	1,33



Cromatograma da amostra F2 de *C. articulatus*

22. Analitos identificados na amostra F3 de *C. articulatus*

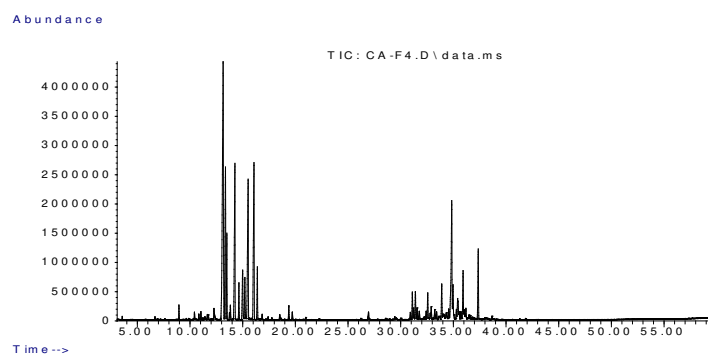
Identificação	F3 de <i>C. articulatus</i>		
	t _R (min)	IR	% rel.
1,8-cineol	8,95	1031	0,47
M = 152	11,00	1088	0,26
trans-pinocarveol	13,08	1140	14,20
n.i.	13,44	1149	0,56
pinocarvona	14,04	1163	6,98
cis-pinocanfona	14,50	1174	1,29
terpinen-4-ol	14,63	1177	2,98
M = 152	14,90	1184	1,25
mirtenal	15,46	1198	14,87
trans-dihidro carvona	15,77	1205	0,57
trans-carveol	16,34	1219	0,55
carvotanacetona	17,42	1244	3,13
M = 220	30,05	1552	0,82
M = 220	30,96	1575	5,75
M = 220	31,15	1580	3,74
óxido de cariofileno	31,28	1584	10,54
M = 220	31,41	1587	4,17
beta-copaen-4-alfa-ol	31,57	1591	2,40
epóxido humuleno II	32,24	1609	2,49
M = 220	32,44	1614	1,35
M = 218	32,66	1620	0,63
1-epi-cubenol	32,94	1628	1,00
M = 220	33,24	1636	2,17
n.i.	33,88	1654	1,13
M = 220	34,67	1675	0,52
mustacona	34,79	1678	2,75
M = 218	35,72	1704	1,57
cis-tujopsenal	35,90	1709	1,73
M = 234	36,92	1738	0,81
M = 218	37,37	1751	9,34



Cromatograma da amostra F3 de *C. articulatus*

23. Analitos identificados na amostra F4 de *C. articulatus*

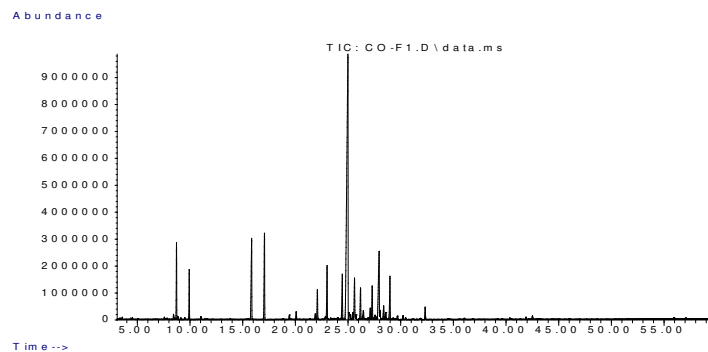
Identificação	F4 de <i>C. articulatus</i>		
	t _R (min)	IR	% rel.
1,8-cineol	8,95	1031	0,49
dehidro sabino cetona	12,28	1120	0,74
trans-pinocarveol	13,15	1141	21,97
trans-verbenol	13,37	1147	8,43
M = 152	13,50	1150	3,30
sabino cetona	13,84	1158	0,57
para-menta-1,5-dien-8-ol	14,26	1169	8,97
terpin-4-ol	14,65	1178	1,50
para-cimen-8-ol	15,00	1186	2,97
alfa-terpineol	15,21	1192	2,17
mirtenal	15,52	1199	9,18
verbenona	16,07	1212	9,73
trans-carveol	16,40	1220	2,29
timol	19,38	1290	0,60
M = 220	31,11	1579	1,22
óxido de cariofileno	31,23	1582	0,55
M = 220	31,39	1587	1,34
beta-copaen-4-alfa-ol	31,56	1591	0,69
M = 220	32,57	1618	1,17
n.i.	32,90	1627	0,64
M = 220	33,24	1636	0,54
pogostol	33,90	1654	1,81
n.i.	34,56	1672	0,61
ishwarona	34,85	1680	8,80
M = 220	34,97	1683	2,04
n.i.	35,29	1692	0,47
ciperotundona	35,41	1695	1,59
cis-tujopsenal	35,93	1710	2,08
M = 218	37,36	1751	3,56



Cromatograma da amostra F4 de *C. articulatus*

24. Analitos identificados na amostra F1 de *C. sativum*

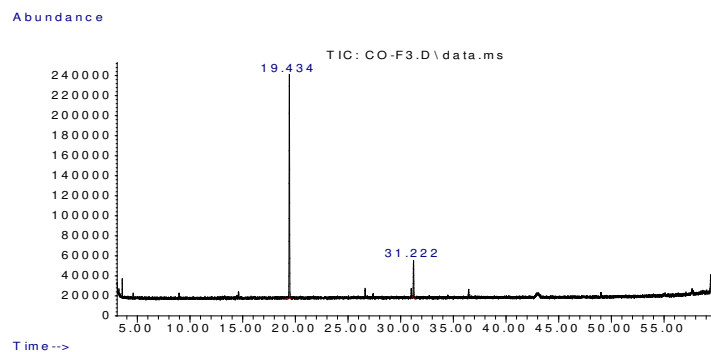
F1 de <i>C. sativum</i>			
Identificação	t _R (min)	IR	% rel.
alfa-terpineno	8,44	1017	0,32
para-cimeno	8,72	1025	3,95
gama-terpineno	9,93	1058	2,66
decanal	15,85	1207	6,68
éter metílico de timol	17,07	1236	6,20
timol	19,44	1291	0,30
undecanal	20,09	1307	0,48
alfa-cubebeno	21,91	1350	0,43
acetato de timol	22,10	1355	2,05
alfa-copaeno	23,02	1376	3,94
dodecanal	24,46	1411	3,42
trans-cariofileno	24,99	1424	42,74
alfa-(E)-ionona	25,12	1428	0,48
beta-gurjuneno	25,19	1429	0,37
alfa-trans-bergamoteno	25,46	1436	0,61
aromadendreno	25,62	1440	3,26
M = 204	25,76	1444	0,32
alfa-humuleno	26,19	1454	2,28
ALLO-aromadendreno	26,46	1461	0,79
gama-muroleno	27,12	1477	0,86
germacreno D	27,30	1481	2,56
M = 204	27,57	1488	0,30
biciclogermacreno	27,95	1498	8,00
alfa-muroleno	28,05	1500	0,58
beta-bisaboleno	28,38	1509	1,11
gama-cadineno	28,58	1514	0,51
delta-cadineno	28,98	1524	3,25
M = 204	29,69	1543	0,23
germacreno B	30,23	1557	0,27
tetradecanal	32,33	1611	0,84
n.i.	42,52	1904	0,24



Cromatograma da amostra F1 de *C. sativum*

25. Analitos identificados na amostra F3 de *C. sativum*

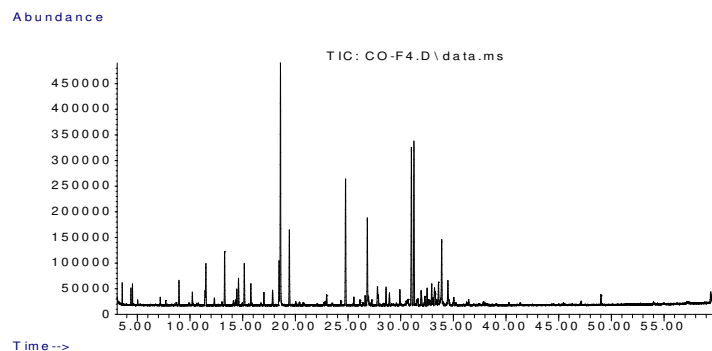
F3 de <i>C. sativum</i>			
Identificação	t _R (min)	IR	% rel.
timol	19,43	1291	85,78
óxido de cariofileno	31,22	1582	14,22



Cromatograma da amostra F3 de *C. sativum*

26. Analitos identificados na amostra F4 de *C. sativum*

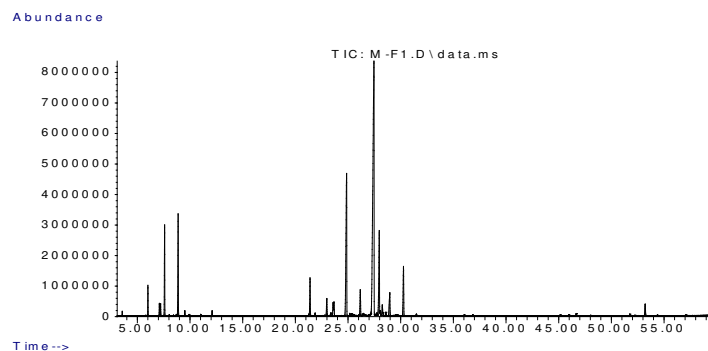
F4 de <i>C. sativum</i>			
Identificação	t _R (min)	IR	% rel.
1,8-cineol	8,95	1031	1,34
linalol	11,44	1100	1,09
n.i.	11,51	1102	2,52
ipsdienol	13,29	1145	3,33
umbelulona	14,44	1173	1,03
terpin-4-ol	14,61	1177	1,78
alfa-terpineol	15,16	1190	2,91
decanal	15,78	1205	1,32
piperitona	17,84	1254	1,12
(2E)-decen-1-ol	18,46	1268	3,06
n-decanol	18,59	1271	16,93
timol	19,43	1291	5,17
trans-cariofileno	24,77	1419	9,45
(2E)-dodecen-1-ol	26,83	1470	5,75
n.i.	27,80	1494	0,20
gama-cadineno	28,62	1515	1,27
elemol	29,92	1549	1,25
espatulenol	31,02	1577	12,39
globulol	31,26	1583	12,66
rosifoliol	31,94	1601	1,58
n.i.	32,51	1616	1,34
muurola-4,10-dien-1-beta-ol	32,95	1628	1,60
n.i.	33,21	1635	1,33
alfa-muurolol	33,59	1646	1,63
alfa-cadinol	33,89	1654	5,43
n.i.	34,48	1670	2,54



Cromatograma da amostra F4 de *C. sativum*

27. Analitos identificados na amostra F1 de *M. Glomerata*

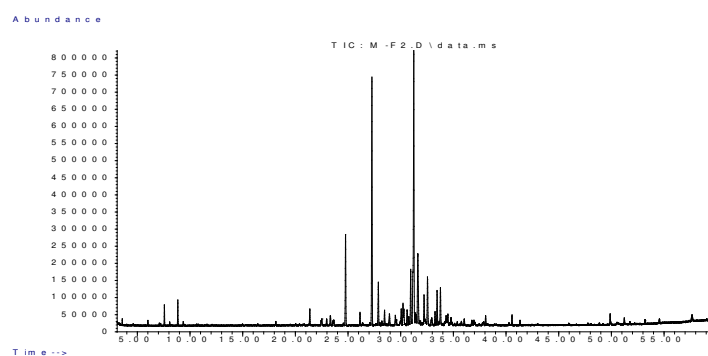
F1 de <i>M. Glomerata</i>			
Identificação	t _R (min)	IR	% rel.
alfa-pineno	6,00	934	1,34
sabineno	7,10	974	0,62
beta-pineno	7,21	978	0,62
beta-mirceno	7,59	992	4,80
limoneno	8,87	1029	6,41
trans-ocimeno	9,50	1046	0,29
M = 150	12,11	1116	0,32
delta-elemeno	21,39	1338	2,99
alfa-copaeno	22,99	1376	1,33
iso-longifoleno	23,59	1390	1,04
beta-elemeno	23,67	1392	1,06
trans-cariofileno	24,86	1421	15,87
alfa-humuleno	26,17	1454	2,14
germacreno D	27,46	1485	43,97
biciclogermacreno	27,96	1498	7,83
alfa-muuroleno	28,06	1500	0,35
germacreno A	28,26	1505	1,05
gama-cadineno	28,59	1514	0,27
delta-cadineno	28,96	1524	2,45
germacreno B	30,26	1557	4,21
M = 286	53,21	----	1,03



Cromatograma da amostra F1 de *M. Glomerata*

28. Analitos identificados na amostra F2 de *M. glomerata*

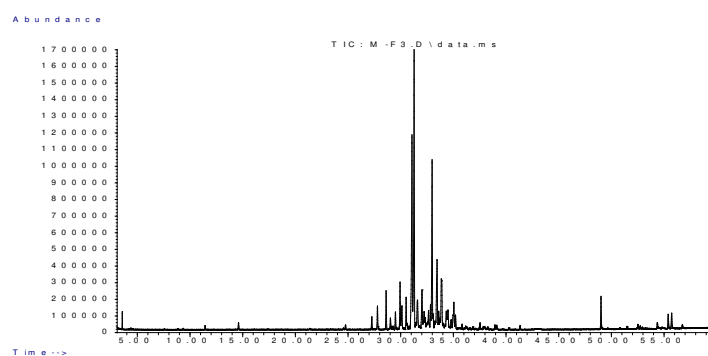
F2 de <i>M. glomerata</i>			
Identificação	t _R (min)	IR	% rel.
beta-mirceno	7,57	991	1,03
limoneno	8,85	1028	1,43
delta-elemeneno	21,38	1337	1,31
trans-cariofileno	24,77	1419	7,07
alfa-humuleno	26,14	1453	1,01
gama-muuroleno	27,27	1481	19,65
M = 204	27,88	1496	3,40
n.i.	28,47	1511	0,95
delta-cadineno	28,94	1523	1,11
n.i.	30,06	1552	1,83
germacreno B	30,22	1556	1,63
M = 220	30,30	1558	1,22
M = 220	30,61	1566	1,48
germacreno D-4-ol	30,95	1575	4,66
óxido de cariofileno	31,25	1583	26,64
M = 220	31,42	1587	0,84
salvial-4(14)-en-1-ona	31,63	1593	8,48
epóxido humuleno II	32,22	1608	2,14
M = 222	32,55	1617	3,96
M = 218	33,26	1637	1,09
M = 220	33,46	1642	2,99
M = 218	33,78	1651	3,11
n.i.	34,48	1670	1,26
n.i.	40,57	1845	0,77
n.i.	49,89	-----	0,94



Cromatograma da amostra F2 de *M. glomerata*

29 . Analitos identificados na amostra F3 de *M. glomerata*

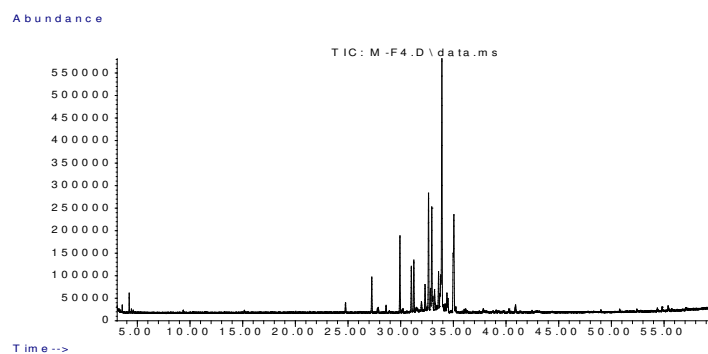
F3 de <i>M. glomerata</i>			
Identificação	t _R (min)	IR	% rel.
gama-muuroleno	27,26	1480	0,82
epi-cubebol	27,80	1494	1,70
M = 222	28,62	1515	2,55
n.i.	29,50	1538	1,09
elemol	29,95	1549	3,35
M = 220	30,11	1553	2,26
(E) nerolidol	30,52	1564	1,62
espatulenol	31,07	1578	18,36
óxido de cariofileno	31,27	1583	22,25
viridiflorol	31,60	1592	3,00
M = 222	32,03	1603	3,60
epóxido humuleno II	32,23	1609	1,62
isolongifolan-7-alfa-ol	32,65	1620	1,40
n.i.	32,83	1625	1,50
muurolo-4,10-dien-1-beta-ol	32,99	1629	13,17
epi-alfa-muurolol	33,46	1642	6,89
alfa-muurolol	33,61	1646	1,05
M = 220	33,87	1653	3,13
alfa-cadinol	33,90	1654	2,68
n.i.	34,33	1666	0,58
germacra-4(15),5,10(14)-trien-1-alfa-ol	34,99	1684	0,74
eudesma-4(15),7-dien-1-beta-ol	35,05	1685	1,99
fitol	49,02	-----	2,33
M = 288	55,40	-----	1,10
M = 288	55,72	-----	1,23



Cromatograma da amostra F3 de *M. glomerata*

30. Analitos identificados na amostra F4 de *M. glomerata*

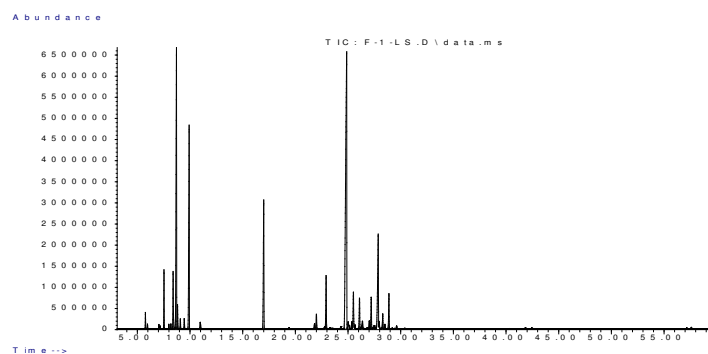
F4 de <i>M. glomerata</i>			
Identificação	t _R (min)	IR	% rel.
(E) 3-hexen-1-ol	4,23	851	0,84
gama-muuroleno	27,26	1480	3,39
elemol	29,93	1549	7,39
espatulenol	31,01	1577	4,31
óxido de cariofileno	31,25	1583	5,63
M = 220	32,32	1611	2,93
isolongifolan-7-alfa-ol	32,65	1620	11,58
n.i.	32,83	1625	2,19
muurola-4,10-dien-1-beta-ol	32,95	1628	10,42
n.i.	33,22	1636	2,68
alfa-muurolol	33,60	1646	3,45
n.i.	33,80	1651	3,01
alfa-cadinol	33,91	1654	25,85
n.i.	34,39	1667	1,35
germacra-4(15),5,10(14)-trien-1-alfa-ol	34,99	1684	5,13
eudesma-4(15),7-dien-1-beta-ol	35,05	1685	9,85



Cromatograma da amostra F4 de *M. glomerata*

31. Analitos identificados na amostra F1 de *L. sidoides*

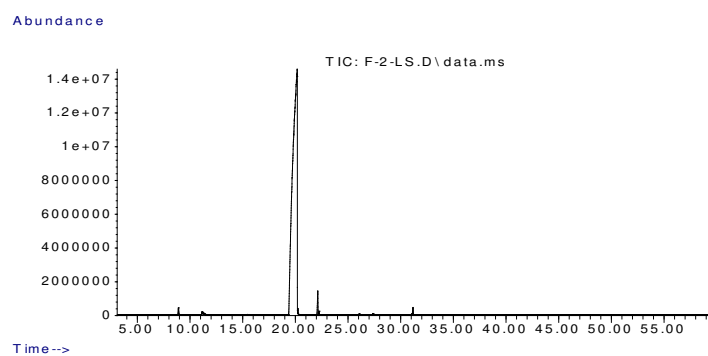
F1 de <i>L. sidoides</i>			
Identificação	t _R (min)	IR	% rel.
alfa-pineno	5,77	926	0,53
beta-pineno	7,53	990	2,22
alfa-terpineno	8,40	1017	2,86
para-cimeno	8,72	1025	16,56
limoneno	8,82	1028	1,03
cis-ocimeno	9,09	1036	0,39
trans-ocimeno	9,46	1046	0,43
gama-terpineno	9,92	1059	11,96
terpinoleno	10,98	1088	0,40
metil timol éter (ou anisol)	17,00	1235	7,60
acetato de timol	22,00	1353	0,75
alfa-copaeno	22,92	1375	3,05
trans-cariofileno	24,87	1422	33,16
M = 204	25,01	1426	0,65
gama-elemeno	25,37	1434	0,49
aromadendreno	25,52	1438	2,19
alfa-humuleno	26,09	1452	1,73
ALLO-aromadendreno	26,37	1459	0,55
gama-muuroleno	27,02	1475	0,44
germacreno D	27,20	1480	1,85
biciclogermacreno	27,87	1496	7,84
alfa-muuroleno	27,96	1498	0,37
beta-bisaboleno	28,30	1507	0,90
delta-cadineno	28,89	1522	2,02



Cromatograma da amostra F1 de *L. sidoides*

32. Analitos identificados na amostra F2 de *L. sidoides*

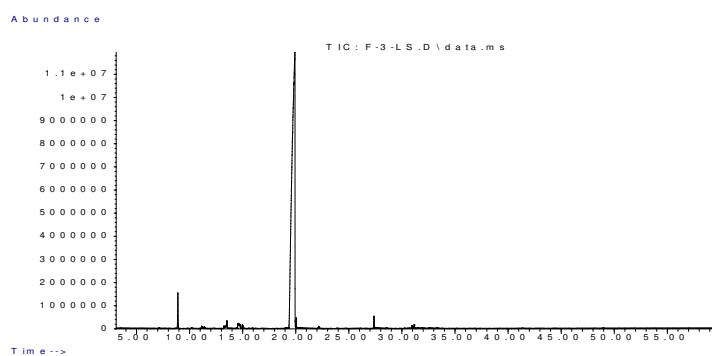
F2 de <i>L. sidoides</i>			
Identificação	t _R (min)	IR	% rel.
1,8-cineol	8,91	1031	0,37
M = 152	11,16	1093	0,56
timol	20,16	1309	97,20
acetato de timol	22,12	1356	1,21
eugenol	22,25	1359	0,17
óxido de carofileno	31,17	1581	0,50



Cromatograma da amostra F2 de *L. sidoides*

33. Analitos identificados na amostra F3 de *L. sidoides*

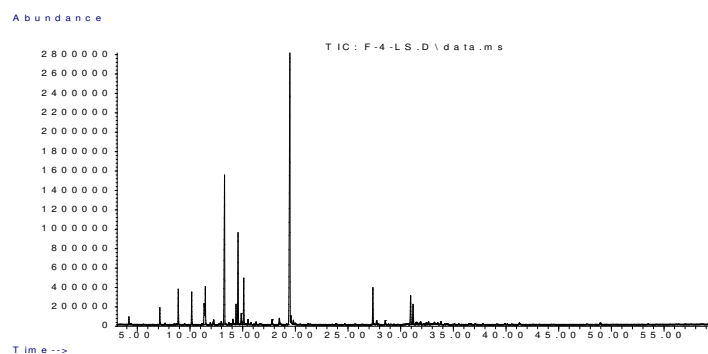
F3 de <i>L. sidoides</i>			
Identificação	t _R (min)	IR	% rel.
1,8-cineol	8,90	1031	1,92
M = 152	13,52	1151	0,90
terpin-4-ol	14,57	1177	1,09
M = 150	14,99	1187	0,34
timol	19,90	1303	93,98
carvacrol	20,05	1306	0,51
M = 180	27,37	1484	0,80
espatulenol	30,95	1576	0,18
óxido de cariofileno	31,16	1581	0,28



Cromatograma da amostra F3 de *L. sidoides*

34. Analitos identificados na amostra F4 de *L. sidoides*

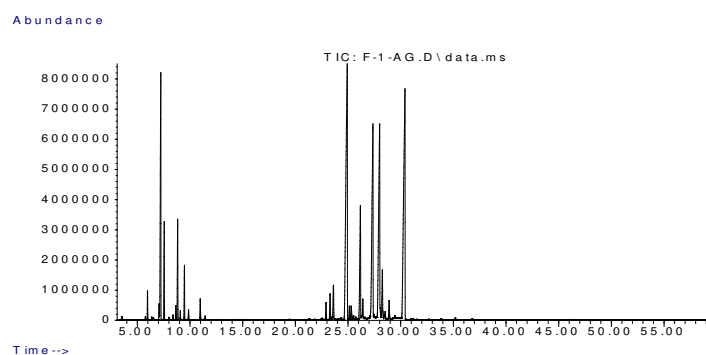
F4 de <i>L. sidoides</i>			
Identificação	t _R (min)	IR	% rel.
3-hexen-1-ol	4,20	850	0,45
1-octen-3-ol	7,14	976	1,23
1,8-cineol	8,89	1030	2,96
gama-terpineno	10,16	1065	2,81
M = 154	11,34	1098	1,85
linalol	11,38	1099	1,72
n.i.	11,46	1101	3,40
ipsdienol	13,28	1145	18,07
umbelulona	14,37	1172	2,32
terpin-4-ol	14,57	1177	9,90
M = 150	14,87	1184	1,40
alfa-terpineol	15,11	1190	4,78
timol	19,48	1293	38,31
carvacrol	19,58	1295	0,77
M = 180	27,36	1484	3,99
espatulenol	30,95	1576	3,39
óxido de cariofileno	31,18	1582	2,67



Cromatograma da amostra F4 de *L. sidoides*

35. Analitos identificados na amostra F1 *A. gratissima*

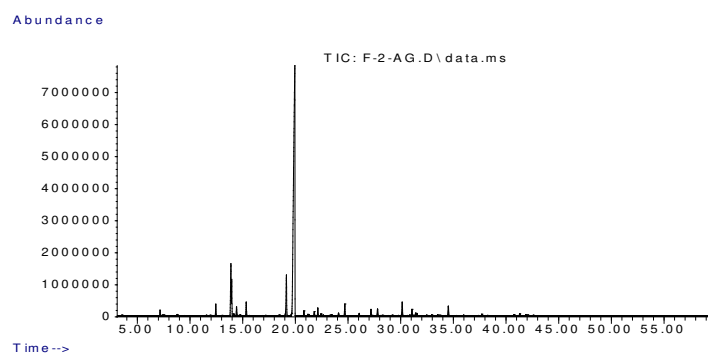
F1 <i>A. gratissima</i>			
Identificação	t _R (min)	IR	% rel.
alfa-pineno	5,97	933	0,60
sabineno	7,07	973	0,52
beta-pineno	7,23	979	8,98
beta-mirceno	7,55	991	2,34
para-cimeno	8,66	1024	0,37
limoneno	8,83	1029	2,94
beta-ocimeno	9,08	1036	0,21
para-cimeno	9,47	1046	1,36
gama-terpineno	9,87	1057	0,25
terpinoleno	10,97	1088	0,59
alfa-copaeno	22,92	1375	0,60
beta-bourboneno	23,30	1384	0,98
beta-elemeno	23,62	1392	1,45
trans-cariofileno	24,93	1424	22,08
M = 204	25,14	1429	0,42
gama-elemeno	25,31	1433	0,58
alfa-humuleno	26,18	1454	5,32
ALLO aromadendreno	26,40	1460	0,68
germacreno D	27,36	1484	12,82
biciclogermacreno	28,01	1499	13,74
M = 204	28,27	1506	2,04
gama-cadineno	28,53	1513	0,24
delta-cadineno	28,91	1523	0,74
germacreno B	30,41	1562	20,15



Cromatograma da amostra F1 *A. gratissima*

36. Analitos identificados na amostra F2 *A. gratissima*

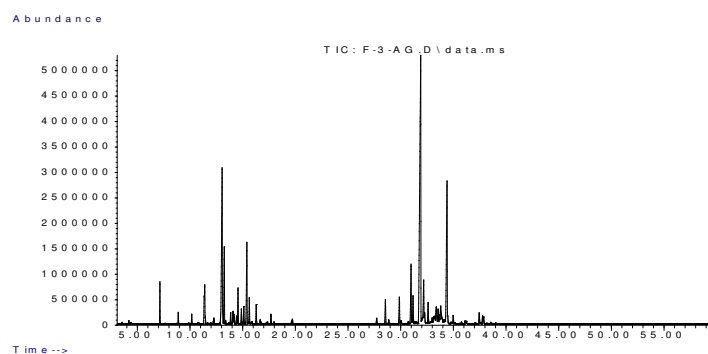
F2 <i>A. gratissima</i>			
Identificação	t _R (min)	IR	% rel.
sabineno	7,16	977	0,45
alfa-canfonelal	12,45	1125	1,15
trans-pinocanfona	13,89	1160	6,41
M = 150	13,96	1162	3,35
cis-pinocanfona	14,42	1173	0,86
mirtenal	15,34	1195	1,54
acetato de isobornila	19,15	1285	5,16
acetato de trans-pinocarvila	19,95	1304	72,09
M = 152	20,82	1325	0,61
acetato de alfa-terpenila	21,81	1348	0,48
eugenol	22,13	1356	0,86
metil eugenol	24,11	1403	0,32
trans-cariofileno	24,70	1418	1,36
germacreno D	27,18	1479	0,79
biciclogermacreno	27,81	1495	0,87
germacreno B	30,15	1555	1,72
óxido de cariofileno	31,07	1579	0,84
M = 264	34,53	1672	1,15



Cromatograma da amostra F2 *A. gratissima*

37. Analitos identificados na amostra F3 *A. gratissima*

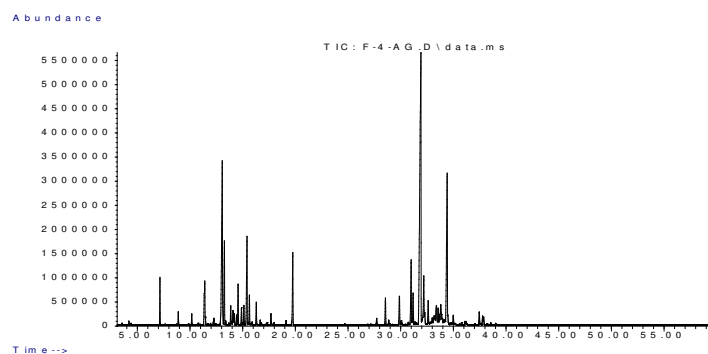
F3 <i>A. gratissima</i>			
Identificação	t _R (min)	IR	% rel.
1-octen-3-ol	7,14	976	1,69
1,8-cineol	8,89	1030	0,51
M = 154	11,36	1098	1,09
linalol	11,40	1100	1,74
trans-pinocarveol	13,05	1140	13,93
trans-sabinol	13,25	1145	4,55
trans-pinocanfona	13,86	1160	0,59
borneol	14,08	1165	0,87
terpin-4-ol	14,56	1176	2,07
para-cimen-8-ol	14,88	1184	0,98
alfa-terpineol	15,11	1190	1,00
mirtenol	15,40	1197	5,56
M = 154	15,63	1202	1,42
trans-carveol	16,29	1218	1,10
cubebol	28,55	1514	1,49
elemol	29,88	1548	1,73
espatulenol	30,98	1577	4,23
óxido de cariofileno	31,18	1582	1,93
guaiol	31,90	1600	32,06
M = 204	32,18	1608	2,55
M = 204	32,61	1620	1,32
hinesol	33,39	1641	1,46
alfa-muurolol	33,55	1645	0,78
M = 220	33,80	1652	1,90
bulnesol	34,40	1668	12,73
M = 220	37,46	1754	0,72



Cromatograma da amostra F3 *A. gratissima*

38. Analitos identificados na amostra F4 *A. gratissima*

F4 <i>A. gratissima</i>			
Identificação	t _R (min)	IR	% rel.
1-octen-3-ol	7,15	976	1,61
1,8-cineol	8,89	1030	0,49
M = 154	10,16	1065	0,44
linalol	11,41	1100	2,62
trans-pinocarveol	13,06	1140	13,16
trans-sabinol	13,27	1145	4,29
trans-pinocanfona	13,87	1160	0,84
borneol	14,09	1165	1,05
M = 152	14,22	1168	0,55
cis-pinocanfona	14,43	1173	0,46
terpin-4-ol	14,57	1177	1,96
para-cimen-8-ol	14,89	1184	0,93
alfa-terpineol	15,12	1190	0,95
mirtanol	15,41	1197	5,31
M = 154	15,64	1203	1,36
trans-carveol	16,30	1218	1,06
cis-mirtanol	17,69	1251	0,51
M = 152	19,76	1299	3,84
cubebol	28,55	1514	1,42
elemol	29,88	1548	1,64
espatulenol	30,99	1577	3,96
óxido de cariofileno	31,18	1582	1,85
guaíol	31,92	1601	29,63
M = 204	32,19	1608	2,30
M = 204	32,61	1620	1,23
hinesol	33,40	1641	1,47
alfa-murolol	33,56	1646	0,77
M = 220	33,80	1652	1,83
bulnesol	34,41	1669	11,79
M = 220	37,46	1754	0,70



Cromatograma da amostra F4 *A. gratissima*

ANEXO 1:

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:

Esta dissertação está de acordo com a Informação CCPG/002/06 – 13/09/2006, UNICAMP (Anexo I), que regulamenta o formato alternativo para dissertação e tese, permitindo a inserção de artigo(s) científico(s) de autoria ou co-autoria do candidato.

Assim sendo, este capítulo é composto por um estudo em fase de submissão na revista científica eCAM - **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine** (Fator de Impacto 2,96), conforme descrito no protocolo abaixo:

Dear Mrs. Salete Meiry Fernandes,

The Research Article titled "Evaluation of antimicrobial activity of essential oils against oral pathogens.," by Bersan Salete Meiry Fernandes, Livia camara Carvalho Galvão, Vivian Fernandes Furletti, Glyn Mara Figueira, Vera Lúcia Garcia Rehder, Adilson Sartoratto, Severino M. Alencar, Pedro luiz Rosalen and Marta Cristina Teixeira Duarte has been received and assigned the number 657920.

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

An editor will be assigned to handle the review process of your manuscript, and he/she will inform you as soon as a decision is reached.

All authors will receive a copy of all the correspondences regarding this manuscript. However, only the submitting author will be able to upload any revisions to the journal's Manuscript Tracking System.

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

Best regards,

Alaa Sobhi
Editorial Office
Hindawi Publishing Corporation
<http://www.hindawi.com>

ANEXO 3:



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

GERENCIAMENTO
DE RESÍDUOS
BIOLÓGICOS, QUÍMICOS
E RADIOATIVOS

Cidade Universitária "Zeferino Vaz" 11 de dezembro de 2009.

Of. CGU/Resíduos/ Comissão de Ética Ambiental 322/2009

À

Dr^a. Marta Cristina Teixeira Duarte
Centro de Pluridisciplinar de Pesquisas Química, Biológica e Agrícolas
Universidade Estadual de Campinas

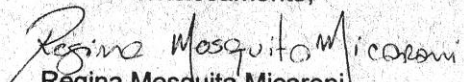
Referência: PARECER SOBRE RESÍDUO DE PROJETO FAPESP 2009 –
Avaliação de óleos essenciais de plantas medicinais como antisséptico em
procedimentos odontológicos.

Prezada Dr^a. Marta,

Segue, em anexo, o parecer sobre a destinação final dos resíduos a serem
gerados no projeto: Avaliação de óleos essenciais de plantas medicinais como
antisséptico em procedimentos odontológicos, conforme informações enviadas à
Comissão de Ética Ambiental da UNICAMP em 18/11/09.

Recomendamos a aprovação da destinação dada ao resíduo: incineração
de solventes orgânicos contendo diclorometano e acetato de etila.

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: 82/2009

IDENTIFICAÇÃO

- 1.Unidade: Centro de Pluridisciplinar de Pesquisas Química, Biológica e Agrícolas.
- 2.Pesquisador responsável: Dr^a. Marta Cristina Teixeira Duarte.
- 3.Título do Projeto: Avaliação de óleos essenciais de plantas medicinais como antisséptico em procedimentos odontológicos.
- 4.Agência de Fomento: FAPESP.

PARECER DO ASSESSOR

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

Sim, pois o projeto visa avaliar a atividade antimicrobiana e antisséptica de óleos essenciais de 20 espécies medicinais pertencentes à CPMA – Coleção de Plantas Medicinais e Aromáticas do CPQBA/UNICAMP. Desta forma, está prevista a geração de resíduo contendo solventes orgânicos (diclorometano e acetato de etila) usados na extração dos óleos.

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

Sim, pois está prevista a geração de uma quantidade de 20 kg de resíduo, a qual é compatível com as atividades descritas no projeto.

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

Sim, pois o resíduo contendo solventes e produtos orgânicos pode ser incinerado.

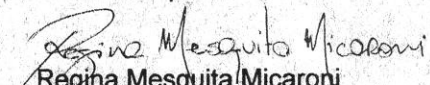
Comentários, críticas e sugestões.

Recomendamos que os resíduos cujas gerações sejam preestabelecidas devido ao emprego de reagentes específicos sejam descritos e as metodologias de tratamento indicadas. Lembramos, ainda, que caso venha a ser gerado resíduo com contaminação biológica o mesmo deverá ser tratado de acordo com as diretrizes do Programa de Gerenciamento de Resíduos da UNICAMP.

Recomendamos a aprovação da destinação proposta para os resíduos gerados.

Local: Campinas

Data: 11/12/2009


Regina Mesquita Micaroni
Comissão de Ética Ambiental
Universidade Estadual de Campinas