

UNIVERSIDADE DE LISBOA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA VEGETAL



**Ciências  
ULisboa**

**Avaliação da capacidade de formação de biofilme por  
microrganismos da microbiota oral e do potencial antimicrobiano  
de óleos essenciais**

Andreia Sofia Roque Aires

**Mestrado em Microbiologia Aplicada**

Dissertação orientada por:  
Doutora Teresa Maria Semedo Lemsaddek  
Professora Doutora Maria Manuela Carolino

2018

## **Agradecimentos**

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer à Doutora Teresa Semedo Lemsaddek, por toda a disponibilidade, paciência, motivação e partilha de conhecimento na orientação deste trabalho. Por me ter inculcido um pensamento mais crítico e uma maior autonomia na realização deste trabalho.

À Professora Doutora Maria Manuela Carolino, pela disponibilidade em ajudar e pelo incentivo na realização deste trabalho.

Queria agradecer pelo acolhimento no Departamento de Produção Animal e Segurança Alimentar, Secção de Tecnologia dos Produtos Animais. Aos laboratórios de Microbiologia e de Bioquímica pela utilização de alguns dos seus equipamentos. À Dona Zé e à D. Lena pela ajuda no laboratório. À Eva, à Diana e à Rita pela total disponibilidade. À Margarida por toda ajuda, apoio e descontração nos dias mais complicados. E a todas as pessoas da Faculdade de Medicina Veterinária que me ajudaram neste projeto.

Agradeço à minha família, que sempre acreditaram em mim, especialmente à minha mãe e à minha irmã, que fizeram o esforço de estar sempre perto, nesta correria entre duas cidades, e nunca me deixaram desistir.

Não me posso esquecer de agradecer à minha colega de casa e grande amiga, Inês Godinho, pelo apoio, por estar sempre pronta a ouvir os meus desabafos, por todas as palavras de motivação, por todos os conselhos e por todos os momentos de descontração e motivação. À Sofia Rato, à Beatriz e à Carina, por todos os conselhos e palavras amigas. A todos os meus amigos, que compreenderam as ausências, que me deram motivação e apoio nesta etapa.

Um grande obrigada a todos.

## Resumo

A microbiota oral é constituída por uma comunidade microbiana muito diversa incluindo espécies de bactérias pertencentes a *Enterococcus*, *Streptococcus* e *Actinomyces*. Estas bactérias, são conhecidas por formarem comunidades dinâmicas de células sésseis que interagem e aderem irreversivelmente a um substrato sólido e umas às outras. Ao mesmo tempo, uma construção de substâncias extracelulares poliméricas (SEP) vão embeber e proteger as estirpes produtoras, conferindo proteção contra agentes exteriores. Estes biofilmes são uma grave questão de saúde pública devido à sua contribuição para infeções e eventual falha terapêutica, bem como por facilitarem as trocas genéticas entre as diferentes bactérias.

Nos dias de hoje, os compostos naturais, como os óleos essenciais -OEs-, estão a ser estudados como alternativas para penetrarem no biofilme e eliminarem as bactérias presentes, contribuindo para a erradicação destas estruturas. Os OEs são metabolitos secundários produzidos por plantas cada vez mais utilizados como agentes antimicrobianos; os OEs de cravo, oregão e tomilho estão entre os mais promissores.

Este trabalho teve como objetivo avaliar bactérias presentes na microbiota oral na respetiva capacidade de produzir biofilmes, em culturas puras e mistas. Foram testadas diferentes condições experimentais (composição do meio, diferentes temperaturas e diferentes tempos de incubação). Os resultados mostraram que o meio *Brain Heart Infusion* suplementado com mucina (uma simulação *in vitro* do ambiente oral), 48 h de incubação à temperatura ambiente favoreceram a formação de biofilme em culturas puras e polimicrobianas.

Posteriormente, fez-se um *screening* dos OEs de cravo, oregão e tomilho procurando avaliar a sua capacidade de controlar o crescimento bacteriano. Os ensaios usando o método da microdiluição permitiram a determinação da concentração mínima inibitória (CMI), concentração mínima bactericida (CMB) e concentração mínima de erradicação de biofilme (CMEB). Os OEs do cravo e tomilho mostraram os resultados mais promissores podendo ser considerados boas alternativas antimicrobianas. Para confirmar esta afirmação foi desenvolvido um modelo de “escova-de-dentes”.

Para simular uma escova-de-dentes contaminada com microrganismos, foram inoculadas fibras de nylon com as bactérias orais em estudo. Após a formação de biofilme, foram testados os óleos essenciais de tomilho, de óregão e de cravo a diferentes concentrações na capacidade de provocar a disrupção da matriz e eliminar as bactérias. Os resultados demonstraram o potencial antimicrobiano dos óleos essenciais de tomilho e de cravo confirmando a possibilidade da utilização destes compostos naturais como alternativas válidas aos desinfetantes tradicionais e outros agentes antimicrobianos até agora utilizados na microbiota oral.

**Palavras-chave:** Microbiota oral; biofilme; actividade antimicrobiana; óleos essenciais.

## **Abstract**

Oral microbiota is composed by *Enterococcus*, *Streptococcus* and *Actinomyces*, among other microorganisms. These bacteria are known for forming dynamic communities of sessile cells, interact and adhere irreversibly to solid surfaces and each other. Concurrently, the construction of extracellular polymeric substances (EPS) will cover and protect the producing strains, conferring protection against exterior agents. These biofilms are a major public health concern due to their contribution to infection and therapeutical failure, as well as for facilitating genetic exchanges.

Nowadays, natural compounds, such as essential oils -EOs-, are being analysed as alternatives to penetrate the biofilm and eliminate the bacteria present, contributing to the eradication of these structures. EOs are secondary metabolites produced by plants increasingly used as antimicrobial agents; clove, oregano and thyme EOs being among the most promising products.

The present work aimed to evaluate bacteria present in the oral microbiota for their capacity to produce biofilms, both in pure and mixed cultures. Distinct growth media, temperatures and times of incubation were tested. Results showed that Brain Heart Infusion medium supplemented with mucin (an *in vitro* simulation of the oral environment), 48h of incubation and room temperature favoured biofilm formation for pure and polymicrobial bacterial cultures.

Subsequently, clove, oregano and thyme EOs for screened for their capacity to control the growth and/or eliminate the oral bacteria. Assays using the microdilution methodology allowed the determination of Minimum Inhibitory Concentrations (MIC), Minimum Bactericidal Concentrations (MBC) and Minimum Biofilm Eradicating Concentrations (MBEC). Clove and thyme showed the most promising results and can be considered good antimicrobial alternatives. To further confirm such an assumption a toothbrush-model was developed.

To simulate a toothbrush contaminated with microorganisms, as usually occurs in a common bathroom, sterilized nylon fibers inoculated with the oral bacteria under study were used. After allowing biofilm formation, essential oils at different concentrations were tested for their ability of disrupt the matrix and eliminate the bacteria. Results demonstrated the antimicrobial potential of thyme and clove essential oils, as occurred in the screening assays. Thus, the present study verified that EOs can be considered to be valid alternatives to traditional disinfectants and other antimicrobial agents.

**Keywords:** Oral microbiota; biofilm; antimicrobial activity; essential oils.

# Índice

1. Introdução.....	1
1.1. Microbiota oral.....	1
1.1.1. <i>Actinomyces viscosus</i> .....	2
1.1.2. <i>Enterococcus spp.</i> .....	3
1.1.3. <i>Streptococcus spp.</i> .....	4
1.2. Biofilmes.....	5
1.2.1. Definição de biofilme.....	5
1.2.2. Formação de biofilme.....	6
1.2.3. Importância e problemática dos biofilmes.....	7
1.3. Óleos essenciais com actividade antimicrobiana.....	7
1.3.1. <i>Thymus vulgaris</i> .....	9
1.3.2. <i>Oreganum vulgare</i> .....	10
1.3.3. <i>Eugenia caryophyllata Thunb.</i> .....	10
1.4. Objetivos.....	11
1.4.1. Avaliação da capacidade de produção de biofilme.....	11
1.4.2. Avaliação da actividade antimicrobiana dos óleos essenciais.....	11
1.4.3. Modelo escova de dentes com fibras de nylon.....	11
2. Materiais e Métodos.....	12
2.1. Microrganismos em estudo e manutenção das culturas.....	12
2.2. Avaliação da capacidade de produção de biofilme.....	13
2.2.1. Avaliação da formação de biofilme em meio com corante Vermelho do Congo....	13
2.2.2. Avaliação da capacidade de produção de biofilme em microplacas de polistireno	13
2.3. Avaliação da capacidade antimicrobiana dos óleos essenciais.....	15
2.3.1. Método de difusão em meio sólido: <i>screening</i> inicial.....	15
2.3.2. Método da microdiluição: Determinação das concentrações mínimas inibitórias (CMI), concentrações mínimas bactericidas (CMB) e concentrações mínimas inibitórias de formação de biofilme (CMIB).....	16
2.3.3. Determinação da concentração mínima de erradicação de biofilme (CMEB).....	17
2.4. Escova de dentes: Modelo de estudo.....	18
2.5. Análise de dados.....	19
3. Resultados e Discussão.....	20
3.1. Avaliação da capacidade de formação de biofilme.....	20
3.1.1. Avaliação da formação de biofilme em meio com corante Vermelho do Congo.....	20
3.1.2. Avaliação da capacidade de produção de biofilme em microplacas de polistireno.....	21
3.2. Avaliação da capacidade antimicrobiana dos óleos essenciais.....	26

<b>3.2.1. Método da microdiluição: Determinação das concentrações mínimas inibitórias (CMI), concentrações mínimas bactericidas (CMB) e concentrações mínimas inibitórias de biofilme (CMIB). Determinação da concentração mínima de erradicação do biofilme (CMEB) .....</b>	<b>28</b>
<b>4. Conclusões.....</b>	<b>37</b>
<b>5. Referências bibliográficas.....</b>	<b>39</b>

## Índice de Figuras

<b>Figura 1.</b> Esquema das etapas de formação do biofilme (Meneses ML, 2011).....	6
<b>Figura 2.</b> Esquema representativo da microplaca de 96 poços com três tempos de incubação diferentes .....	14
<b>Figura 3.</b> Esquema representativo da microplaca de 96 poços para a determinação da CMI, CMB e da CMIB para culturas mistas .....	16
<b>Figura 4.</b> Produção de biofilme nas culturas puras .....	22
<b>Figura 5.</b> Produção de biofilme nas culturas mistas .....	24
<b>Figura 6.</b> Diâmetros dos halos de inibição formados pelos óleos essenciais em estudo .....	26
<b>Figura 7.</b> Formação de biofilme em fibras de nylon, quando em contacto com diferentes concentrações do óleo essencial de oregão.....	35
<b>Figura 8.</b> Formação de biofilme na base da placa de polistireno e nas fibras de <i>nylon</i> .....	36

## Índice de Tabelas

<b>Tabela 1.</b> Microrganismos usados neste estudo.....	12
<b>Tabela 2.</b> Resultados obtidos no ensaio com o corante Vermelho do Congo.....	20
<b>Tabela 3.</b> Resultados das CMIs, CMBs, CMIBs e CMEBs para os três óleos essenciais em estudo em culturas mistas .....	29
<b>Tabela 4.</b> Resultados das CMIs, CMBs e CMIBs para os três óleos essenciais em culturas mistas no modelo da escova de dentes .....	32

## Lista de abreviaturas

3L1.2 – *Enterococcus faecalis*

7C1.4 – *Enterococcus faecalis*

A3 – *Aeromonas hydrophila*

A259 – *Aeromonas hydrophila*

APT – Água peptonada tamponada

ATCC – *American Type Culture Collection*

BAL – Bactérias ácido lácticas

BHI – *Brain heart infusion*

CECT – *Collección Española de Cultivos Tipo*

CLSI – *Clinical and Laboratory Standards Institute*

CMB – Concentração mínima bactericida

CMEB – Concentração mínima de erradicação de biofilme

CMI – Concentração mínima inibitória

CMIB – Concentração mínima inibitória de biofilme

DNA – Ácido desoxirribonucleico

DSMZ – *Deustshe Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen* (Coleção alemã de microrganismos e culturas celulares)

DO – Densidade ótica

DS16 – *Enterococcus faecalis*

EPS – *Extracellular Polymeric Substance*

ETAR – Estação de tratamento de águas residuais

EUA - Estados Unidos da América

OE – Óleo essencial

OG1-10 – *Enterococcus faecalis*

PAO1 – *Pseudomonas aeruginosa*

PBS – *Phosphate buffer saline* (Tampão fosfato salino)

pH – Potencial hidrogeniônico

p/v – Peso por volume

R5 – *Aeromonas hydrophila*

<sup>T</sup> – Estirpe-tipo



UA – Unidade de Absorvância

UFC – Unidades formadoras de colónias

V583 - *Enterococcus faecalis*

v/v – Volume por volume

# 1. Introdução

## 1.1. Microbiota oral

A cavidade oral é um dos ambientes do corpo humano mais habitado por microrganismos (Roberts e Mullany, 2010). A diversidade microbiana nesta cavidade humana deve-se à variedade de microhabitats existentes neste espaço, como as superfícies mucosas (lábios, bochechas, palato e língua) ou as superfícies duras como os dentes (Faran Ali e Tanwir, 2012; Roberts e Mullany, 2010). Com o passar do tempo, estes habitats também vão sofrer alterações provocadas pela erupção de dentes, a sua extração, colocação de próteses e outros procedimentos dentários. Na cavidade oral humana, é mantida uma temperatura vital para o crescimento de uma vasta gama de microrganismos, permanecendo entre 35 – 36 °C (Faran Ali e Tanwir, 2012). A manutenção do pH e do oxigénio são da responsabilidade da saliva. O pH vai ser diferente nas distintas zonas, o que só é possível devido ao fluxo de saliva. Esta também vai conter a maioria do oxigénio usado pelos microrganismos. A saliva tem também um papel importante na manutenção da higiene oral, uma vez que esta pode limpar a cavidade e o facto de conter substâncias antimicrobianas ajuda a manter um equilíbrio de microrganismos saudável (Faran Ali e Tanwir, 2012).

Os nutrientes necessários para o crescimento dos microrganismos podem ser fornecidos de forma endógena, através da saliva (aminoácidos, proteínas, glicoproteínas, vitaminas e gases), ou exógena, através da ingestão de alimentos (Faran Ali e Tanwir, 2012).

A antibioterapia ao longo da vida também desempenha um papel importante nas alterações ao nível da microbiota oral (Faran Ali e Tanwir, 2012).

A microbiota oral normal, como já foi referido, é muito diversa, sendo constituída por mais de 700 espécies de bactérias, ainda que algumas permaneçam incultiváveis (Faran Ali e Tanwir, 2012), por fungos, arqueas e vírus (Zaura *et al.*, 2014). Definir de forma precisa a composição do microbiota oral normal não é fácil, uma vez que a boca é um sistema aberto, que está frequentemente exposto a bactérias exógenas provenientes dos alimentos, da água, do ar e até através do contacto com outros humanos. No entanto, a maioria dos microrganismos não orais, não são frequentemente isolados da boca, ainda não se sabe a justificação, mas a hipótese é que lhes faltam adesinas e recetores que lhes permitiriam ligar-se às superfícies orais ou co-agregar-se a outros microrganismos. Outra hipótese é serem excluídas pela acção do sistema imunitário (Wade, 2013). Devido às limitações na determinação das espécies pertencentes à microbiota oral normal, começou-se a determinar os microrganismos com maior representação em comunidades de bocas saudáveis, sendo estes pertencentes aos géneros: *Actinomyces*, *Capnocytophaga*, *Eikenella*, *Fusobacterium*, *Haemophilus*, *Leptotrichia*, *Neisseria*, *Peptostreptococcus*, *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Propionibacterium*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Treponema* e *Veillonella* (Avila *et al.*, 2009). A maioria dos microrganismos referidos, existe na cavidade oral em simbiose com o hospedeiro, mantendo uma relação de mútuo benefício (Avila *et al.*, 2009), estes vão também exibir propriedades que permitem agregarem-se entre si, mas muitas vezes são interações específicas de um determinado microhabitat existente neste local (Kolenbrander J., 1993).

Na microbiota oral, podemos utilizar a classificação como “core” (nuclear) ou variável. A microbiota “core” vai ser semelhante entre os indivíduos, compreendendo as espécies predominantes em indivíduos saudáveis, já a microbiota variável, vai ser distinta de indivíduo para indivíduo, pois vai responder aos diferentes estilos de vida e aos determinantes genotípicos e fenotípicos (Jia *et al.*, 2018).

Uma vez que existem vários factores que vão interferir com a manutenção da microbiota oral, é importante manter o equilíbrio bacteriano neste habitat, pois um desequilíbrio pode levar ao aparecimento de doença. Os factores que vão contribuir para a ocorrência de alterações na microbiota oral são a dieta, o tabagismo, o consumo de bebidas alcoólicas, o uso de antibióticos, o estado da saúde oral, o estatuto socioeconómico e outros factores determinantes que não podem ser alterados, como o género e a idade. Uma dieta rica em alimentos açucarados e gordos vai promover o aparecimento de *Streptococcus mutans* e *Fusobacterium nucleatum*, microrganismos associados ao aparecimento de cáries dentárias. O recomendado para manter um bom balanço é a diminuição dos produtos ricos em açúcares e um aumento dos produtos lácteos (Jia *et al.*, 2018). O tabagismo vai promover a acidificação da saliva e a depleção de oxigénio, vai alterar a aderência às mucosas e vai enfraquecer a imunidade do hospedeiro (Jia *et al.*, 2018). O consumo de bebidas alcoólicas contribui para a alteração da microbiota oral, por exemplo, o consumo de licores aumenta o número de bactérias Gram positivas como o *S. mutans*. A microbiota oral vai ainda converter o etanol em acetaldeído, que é uma toxina e pode ser carcinogénica para o Homem. No entanto, o consumo diário moderado de vinho tinto não vai alterar a diversidade e a estabilidade dos grupos representativos da saliva (Jia *et al.*, 2018). O uso indiscriminado de antibióticos vai interferir no balanço da microbiota oral, matando não só as prejudiciais, como também as benéficas, desprovendo o hospedeiro do seu efeito benigno (Jia *et al.*, 2018).

Há estudos sobre a influência do estatuto socioeconómico na composição da microbiota oral, que revelam nos perfis bacterianos da saliva, as diferenças nestes estatutos. O estatuto socioeconómico vai determinar as escolhas dos membros da família na realização educacional, nos conceitos de saúde, hábitos de higiene, hábitos alimentares e serviços médicos (Jia *et al.*, 2018). Também vão ocorrer alterações na cavidade oral durante a gravidez, isto é, o número de microrganismos cultiváveis vai aumentar significativamente, sofrendo uma diminuição no pós-parto (Jia *et al.*, 2018).

Tendo em conta os factores mencionados, é importante tê-los em conta no dia-a-dia, porque para além da microbiota oral poder causar patologias graves relacionadas com o foro oral, como cáries, periodontites e gengivites, já foi estabelecida relação com uma grande variedade de doenças como cancro do esófago, colorretal, do pâncreas, podendo ativar genes de crescimento de células cancerígenas. Estão também ligados a doenças cardiovasculares, artrite reumatoide e hemorragias cerebrais (Jia *et al.*, 2018).

### 1.1.1. *Actinomyces viscosus*

O género *Actinomyces* pertence à família *Actinomycetaceae*, sub-ordem *Actinomycineae*, à ordem *Actinomycetales*, à classe *Actinobacteria* e ao Filo *Actinobacteria*, sendo até à data conhecidas 50 espécies e 2 sub-espécies [<http://www.bacterio.net/actinomyces.html>, data de consulta 24/09/2018].

A bactéria *Actinomyces viscosus* é um organismo filamentosos Gram e catalase positivo, anteriormente denominado de *Odontomyces viscosus* uma vez que o género *Actinomyces* ainda não tinha incluído organismos catalase positivos, mudando de designação após esta inclusão (Radford e Ryan, 1977), foi denominado “*viscosus*” devido ao carácter viscoso das colónias (Gerencser e Slack, 1969). Este microrganismo pode ser encontrado na placa sub-gengival, e nos dentes, aderindo à superfície destes através de proteínas ricas em prolina salivar. O microrganismo *A. viscosus* vai aparecer mais tarde na vida do hospedeiro em consequência do envelhecimento ou associado a patologias como cáries na dentina ou na superfície da raiz. (Ellen, 1976; Gerencser e Slack, 1969; Krishnan *et al.*, 2017; Patil, 2013; Rozen *et al.*, 2001) e periodontite (Cisar *et al.*, 1979).

### 1.1.2. *Enterococcus* spp.

O género *Enterococcus* pertence à família *Enterococcaceae*, ordem *Lactobacillales*, classe *Bacilli*, Filo *Firmicutes*, sendo até à data conhecidas 58 espécies e 2 subsespécies [<http://www.bacterio.net/enterococcus.html>, data de consulta 24/09/2018].

As bactérias do género *Enterococcus* são cocos Gram-positivos, catalase-negativos, comumente encontradas na natureza, como em frutas, vegetais, carne crua e produtos à base de leite (Giraffa, 2003; Veras *et al.*, 2014). Estes fazem parte do grupo das bactérias ácido lácticas (BAL), o terceiro maior grupo, sendo importantes nos processos de fermentação dos alimentos e na sua deterioração. Algumas espécies de *Enterococcus* são também utilizadas como probióticos, promovendo a saúde humana e animal. Por outro lado, outras estirpes são responsáveis por infeções associadas aos cuidados de saúde, provocando graves complicações como bacteremia, e algumas estirpes podem mesmo até possuir factores de virulência como adesinas, invasinas, hemolisinas e genes responsáveis pela multirresistência a antibióticos (Benbelaïd *et al.*, 2014; Franz, *et al.*, 2011).

Neste género, incluem-se bactérias comensais que podem ser encontradas no trato intestinal e vaginal, tanto de humanos como animais (Benbelaïd *et al.*, 2014). Na cavidade oral, no entanto, não fazem parte da comunidade bacteriana normal, sendo organismos transientes que podem provocar graves patologias, como caries dentárias, abscessos e infeções periodontais, o que é justificado pelo facto de, para além de serem multirresistentes à terapêutica, possuírem uma resistência endógena que lhes permite sobreviver a condições ambientais extremas, como as existentes na cavidade oral (Benbelaïd *et al.*, 2014). A sua habilidade em formar biofilmes vai contribuir para a dificuldade no tratamento destas infeções, pois o biofilme vai fornecer um ambiente protetor contra antibióticos e a acção de fagócitos, vai mediar a adesão e permitir a invasão de células do hospedeiro e a colonização de superfícies inertes (Veras *et al.*, 2014).

Estas bactérias possuem uma resistência intrínseca a alguns antibióticos, e também uma potente e perigosa capacidade de fazer trocas de material genético. O aumento das estirpes resistentes a ampicilina, tetraciclina, penicilina, cefalosporina, aminoglicosídeos e glicopéptidos, e o aumento da resistência aos antibióticos disponíveis para o tratamento, como a vancomicina, levanta assim um problema no tratamento clínico. A pressão seletiva exercida pela adição de antibióticos na alimentação dos animais como promotores de crescimento, criou reservatórios em vários ecossistemas de resistências a antibióticos. O alastramento da resistência e a transferência desta para estirpes patogénicas evidência a urgente necessidade de controlar o uso destes medicamentos (Giraffa, 2003).

Na cavidade oral, várias espécies de *Enterococcus* e respetivas enterocinas (bacteriocinas) podem ser encontradas no canal radicular (Duggan e Sedgley, 2007; Kayaoglu, 2004), e estar associadas a patologias como caries, infeções endodónticas, periodontite, peri-implantite (Komiya *et al.*, 2016) e a pulpas necrosadas (Patil, 2013). A sua associação à falha dos tratamentos endodónticos está frequentemente relacionada com a sua resistência aos antibióticos utilizados na terapêutica e à sua capacidade de formação de biofilmes nos canais radiculares (Komiya *et al.*, 2016).

### 1.1.3. *Streptococcus* spp.

O género *Streptococcus* pertence à família *Streptococceae*, ordem *Lactobacillales*, classe *Bacilli*, Filo *Firmicutes*, sendo até à data conhecidas 129 espécies e 23 subespécies [<http://www.bacterio.net/streptococcus.html>, data de consulta 22/03/2018].

As várias espécies de *Streptococcus* representam cerca de 20% da microbiota oral total normal (Kreth *et al.*, 2008). São bactérias Gram-positivas, catalase-negativas (White e Niven, 1946) e estão distribuídas por toda a cavidade oral, fazendo parte da microbiota do palato, da língua, da garganta, da mucosa oral, da gengiva, dos dentes, dos lábios e das amígdalas palatinas (Jia *et al.*, 2018). As espécies de *Streptococcus* são colonizadores primários (Rosan e Lamont, 2000), alguns delas são conhecidas por conterem recetores para os restantes microrganismos pertencentes à microbiota oral (Kolenbrander *et al.*, 2006).

A espécie *Streptococcus mutans* tem como preferência a colonização dos dentes, sendo o seu aparecimento adiado até à erupção destes (Ellen e Balcerzak-Raczkowski, 1975), mais tarde, também pode aparecer na saliva e conseqüentemente na língua (Danser, 2003). Estes microrganismos estão associados ao aparecimento de cáries dentárias (Danser, 2003; Faran Ali e Tanwir, 2012), pois vão produzir ácido láctico e conseguem crescer em ambiente com um pH baixo (Krishnan *et al.*, 2017). Têm ainda a propriedade de produzir bacteriocinas, chamadas de mutacinas (Kreth *et al.*, 2008).

O microrganismo *Streptococcus oralis* é também conhecido por ser um dos colonizadores primários, possuindo polissacarídeos associados à parede celular, que funcionam como recetores na co-agregação com outros microrganismos (Kolenbrander *et al.*, 2006). Está associado a doenças como endocardite e outras infeções, e pode também estar implicado na formação de cáries (Wilkins *et al.*, 2003). Pode ser encontrado na saliva (Alam *et al.*, 2000).

Ainda do género *Streptococcus*, *Streptococcus salivarius* pode ser encontrado na língua, na saliva (Ellen e Balcerzak-Raczkowski, 1975) e é ainda considerado um dos primeiros a colonizar a mucosa oral após o parto (Delorme *et al.*, 2015). Vários registos indicam que este microrganismo desempenha um papel importante na ecologia da microbiota oral, conferindo estabilidade à sua composição, na interação bacteriana e com o hospedeiro (Delorme *et al.*, 2015).

Sendo considerado também colonizador primário, *Streptococcus sanguinis*, tem como preferência a colonização dos dentes (Cisar *et al.*, 1979; Ellen e Balcerzak-Raczkowski, 1975). Apesar de ser considerado benéfico, está associado a várias patologias como caries, doença periodontal (Caufield *et al.*, 2000; Kreth *et al.*, 2008), bacteremias e endocardites (Cisar *et al.*, 1979). No entanto, é possível que compita com *S. mutans* pelo lugar de colonização, prevenindo as cáries dentárias. Já foi observado que a colonização por *S. sanguinis* ocorre primeiro do que por *S. mutans*, e que os valores de *S. sanguinis* baixam significativamente quando *S. mutans* coloniza, fomentando a hipótese de serem antagonistas. Vários investigadores sugerem que o rácio *S. mutans/S. sanguinis* pode ser um indicador do risco de contrair cáries, sendo que quanto menor for o rácio, menor será o risco (Caufield *et al.*, 2000). Esta espécie de *Streptococcus* possui ainda polissacarídeos associados à parede celular, prováveis recetores para a co-agregação com outras bactérias. (Kolenbrander J., 1993).

## 1.2. Biofilmes

A maioria dos microrganismos têm a capacidade de aderir a superfícies distintas, multiplicarem-se produzindo uma matriz complexa composta por polímeros, formando biofilmes. Neste estado fisiológico, os microrganismos vão tornar-se mais difíceis de detetar e erradicar (Chmit *et al.*, 2014), isto porque esta estrutura confere-lhes maior proteção em relação a mudanças que possam ocorrer no ambiente (Veras *et al.*, 2014). O estado de biofilme vai permitir a existência de canais para o transporte de substratos, de resíduos e de moléculas sinalizadoras que vão ajudar no seu desenvolvimento (Jhajharia *et al.*, 2015). O facto de serem estruturas altamente resistentes, ubíquas na natureza e altamente diversas faz com que os biofilmes sejam um problema, pois vão conferir proteção às bactérias contra mudanças ambientais que possam existir, como alterações de pH, acção de desinfetantes e antibióticos (Branda *et al.*, 2005; Veras *et al.*, 2014).

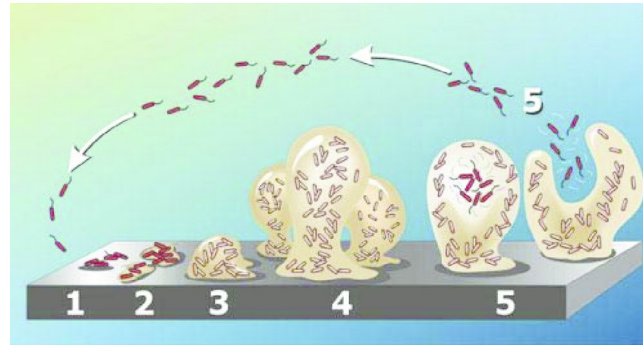
Um exemplo de biofilme é a placa bacteriana formada nos dentes, (Jhajharia *et al.*, 2015) e em outras estruturas artificiais como implantes dentários e dentaduras (Jakubovics, 2015). Estes vão ser responsáveis pela maioria das doenças orais comuns, como caries dentárias e periodontites (Jakubovics, 2015). Na escova-de-dentes também vai ocorrer a acumulação de microrganismos da microbiota oral, uma vez que é exposta todos os dias a este ambiente, podendo até vir a facilitar a dispersão de microrganismos patogénicos para locais não infetados (Svanberg, 1978).

### 1.2.1. Definição de biofilme

Biofilme é um modo de crescimento bacteriano, em que comunidades dinâmicas de células sésseis interagem e aderem irreversivelmente a um substrato sólido, assim como umas às outras, vão estar embebidas numa matriz de substâncias extracelulares poliméricas (EPS) produzidas por elas próprias (Duggan e Sedgley, 2007; Jhajharia *et al.*, 2015). A unidade estrutural básica é formada pelas células bacterianas aderentes à superfície. A sua matriz é composta por proteínas, polissacarídeos, ácidos nucleicos e sais, compondo assim 85% da matriz e apenas os restantes 15% vão ser células bacterianas. Sendo o biofilme uma estrutura dinâmica, vai sofrer modificações consoante as alterações do ambiente (condições de crescimento, natureza dos movimentos dos fluídos, propriedades físico-químicas do substrato, disponibilidade nutricional, entre outros). O biofilme confere assim proteção às bactérias residentes das alterações do meio ambiente, permite a acumulação de nutrientes, promove a cooperação metabólica entre as diferentes bactérias residentes e a sua estrutura compartimentalizada vai ajudar com os diferentes requisitos de crescimento das restantes bactérias. Para tornar a definição de biofilme mais fácil, foram destacadas quatro características que um biofilme tem de ter: A primeira é autopoiese, a habilidade de se auto-organizar; a segunda é homeostasia, a capacidade de resistir às perturbações do ambiente; a terceira é sinergia, as células têm que ser mais eficientes em associação do que sozinhas; por último, as respostas às mudanças ambientais têm que ser feitas em comunidade agindo como uma unidade, e não como células individuais (Jhajharia *et al.*, 2015).

### 1.2.2. Formação de biofilme

Para que ocorra a formação de biofilme, é necessária a reunião de três factores, a existência de células bacterianas, a presença de um meio fluido e de uma superfície sólida (Jhajharia *et al.*, 2015). Reunidas estas condições pode ocorrer a formação do biofilme que vai estar dividida em 5 etapas, como demonstrado na Figura 1 (Meneses ML, 2011).



**Figura 1.** Esquema das etapas de formação do biofilme (Meneses ML, 2011).

Na primeira etapa vai ocorrer a interação das células com a superfície e, também a interação entre elas (Branda *et al.*, 2005). A bactéria irá aderir ao substrato através de estruturas existentes na sua superfície como pili, fimbrias, flagelos e exopolissacarídeos (EPS). Os EPS são responsáveis por manter a adesão entre as células e outras partículas (co-adesão) e também por mantê-las agregadas à superfície (adesão). A matriz de EPS vai atuar como barreira, prevenindo ou atrasando os agentes antimicrobianos de alcançar o microrganismo alvo no biofilme. Na adesão entre o microrganismo e o substrato, vai ocorrer a formação de “pontes”, através de atração electrostática, ligações covalentes, pontes de hidrogénio, ligações dipolo-dipolo e interações hidrofóbicas. Existem ainda propriedades que vão promover a adesão, como o facto de a superfície ser rugosa ou mais hidrofóbica (Branda *et al.*, 2005; Meneses ML, 2011).

Para as células comunicarem entre si e formarem esta estrutura altamente complexa e organizada, vão precisar de uma forma de comunicação. *Quorum sensing* é baseado no processo de autoindução, e vai envolver um sistema sensor do ambiente envolvente que permite às bactérias monitorizar e responder às suas próprias densidades populacionais. As bactérias vão produzir um sinal orgânico difusível (molécula auto-indutora), que se vai acumular no ambiente envolvente durante o crescimento do biofilme. Uma elevada concentração de células vai resultar numa elevada concentração do sinal, que consequentemente vai induzir a expressão de genes e/ou mudanças fisiológicas nas células vizinhas. A resposta aos sinais químicos no processo de comunicação celular é um processo que depende da concentração, onde é necessário atingir um certo limiar para desencadear uma resposta (Branda *et al.*, 2005; Meneses ML, 2011).

Na segunda etapa da formação do biofilme, após agregação de células suficientes, vai ocorrer a produção de matriz extracelular, o que vai também contribuir para o arranjo da arquitetura da estrutura do biofilme. A matriz extracelular é composta por polissacarídeos, proteínas, DNA extracelular e ainda células mortas (Branda *et al.*, 2005; Meneses ML, 2011). Existe uma enorme diversidade na composição da matriz extracelular. A arquitetura do biofilme pode mudar consoante as mudanças do meio ambiente, por muito subtis que sejam, e estas modificações parecem refletir-se em alterações ao nível da composição da matriz extracelular (Branda *et al.*, 2005).

Na terceira etapa vai ocorrer a formação de microcolónias, que vão crescer e agrupar-se formando macrocolónias, correspondendo à quarta etapa de formação do biofilme. Estas macrocolónias correspondem a colunas longas, ou estruturas planas, com canais no meio para os fluídos circularem e ocorrer o transporte de nutrientes. Na última etapa da formação do biofilme, as bactérias do biofilme vão começar a sentir um “stress” planeado, resultando da exaustão de nutrientes e espaço, que na forma de biofilme são intensificados. Isto resulta na dispersão de células metabolicamente ativas (Branda *et al.*, 2005) para que haja nova formação de biofilme noutra zona com melhores condições nutricionais para a estabilização do biofilme (Jhajharia *et al.*, 2015; Meneses ML, 2011).

### **1.2.3. Importância e problemática dos biofilmes**

Está estimado que cerca de 65% das infeções bacterianas humanas são causadas por biofilmes. Eles têm-se tornado a principal causa das infeções, pois infiltram-se nos dispositivos médicos como cateteres ou válvulas cardíacas artificiais (Chmit *et al.*, 2014). Estes representam também um grave problema em estações de tratamento de água e em sectores da indústria alimentar como no processamento de carnes, lacticínios e produção de frescos (Chmit *et al.*, 2014; Simões *et al.*, 2010). Os biofilmes têm a particularidade de serem até 1000 vezes mais resistentes aos antibióticos do que na forma de células planctónicas (Chmit *et al.*, 2014). O aumento da resistência pode ser explicado pela conjugação de quatro mecanismos: a matriz exopolissacarida vai formar uma barreira física que limita a difusão dos desinfetantes dentro do biofilme, os mecanismos de resistência podem ser transferidos horizontalmente para outras células integrantes do biofilme, a diferenciação das células bacterianas em diferentes estados fisiológicos menos suscetíveis aos tratamentos e a modificação do meio ambiente tornando o desinfetante menos eficiente (Giaouris *et al.*, 2014).

No caso dos biofilme formados na microbiota oral, a placa bacteriana vai levar ao aparecimento de doenças da cavidade oral, que se permanecem sem serem tratadas podem desencadear patologias sistémicas mais graves como doenças cardiovasculares, diabetes tipo II, Alzheimer, artrite reumatoide e cancro do pâncreas, baixo peso e aborto (Krishnan *et al.*, 2017). Uma das dificuldades na erradicação dos biofilmes orais vai ser o acesso, pois a sua complexidade anatómica e geométrica muitas vezes não permite que a limpeza destas zonas seja realizada eficientemente (Jhajharia *et al.*, 2015). No entanto, o factor com mais influência neste tipo de infeções é a natureza polimicrobiana do biofilme, pois apesar das prescrições médicas incluírem combinações de antibióticos, é muito provável que algumas das bactérias presentes no biofilme sejam resistentes (Roberts e Mullany, 2010).

Do que foi descrito torna-se urgente controlar a formação de biofilmes nos vários setores de saúde pública, indústria alimentar e no ambiente de modo a evitar esta estratégia de sobrevivência dos microrganismos que representa uma verdadeira ameaça para os humanos (Chmit *et al.*, 2014; Da Silva e De Martinis, 2013; Giaouris *et al.*, 2014; Jhajharia *et al.*, 2015; Krishnan *et al.*, 2017).

## **1.3. Óleos essenciais com actividade antimicrobiana**

A medicina tradicional considera que para cada doença, a natureza fornece uma cura ou um tratamento (Chmit *et al.*, 2014). As plantas produzem naturalmente os seus próprios compostos medicinais (Huie, 2002). Os compostos medicinais das plantas inicialmente tomavam a forma de chás, pós e outras formas mais básicas. No entanto, o isolamento de compostos das plantas evoluiu, levando ao isolamento dos



primeiros compostos como a morfina, e tem evoluído até aos dias de hoje com a identificação e isolamento de novos compostos naturais (Balunas e Kinghorn, 2005).

Ao longo dos anos, tem surgido um interesse crescente em plantas medicinais e nas suas aplicações em várias áreas. A medicina moderna não fornece cura nem tratamento para todas as doenças, sendo necessário encontrar alternativas que sejam mais saudáveis e apresentam efeitos secundários mínimos, podendo a alternativa ser as plantas medicinais (Huie, 2002). Estas têm sido muito utilizadas, sendo frequentemente encontradas em medicamentos e suplementos alimentares (Chmit *et al.*, 2014). Na indústria alimentar também existe o desejo de optar pela utilização de produtos naturais para a preservação de alimentos, sendo as ervas aromáticas ou as especiarias uma opção, pois já demonstraram ter actividade antimicrobiana (Delaquis *et al.*, 2002).

A partir das plantas medicinais vão surgir os seus óleos essenciais (OEs), obtidos através da extração ou destilação das várias partes das plantas como flores, folhas, raízes ou frutos (Gracia-Valenzuela *et al.*, 2012). Os óleos essenciais são misturas complexas de compostos voláteis com um odor forte obtidas de uma determinada planta (Hyldgaard *et al.*, 2012; Teixeira *et al.*, 2013). Já foi demonstrado que os óleos essenciais apresentam actividade antimicrobiana, antiviral, antiparasitária, inseticida, antifúngica, estando estas provavelmente relacionadas com as funções que têm na planta (Gracia-Valenzuela *et al.*, 2012). Possuem ainda outras propriedades importantes na medicina, como actividade anticancerígena e antioxidante (Teixeira *et al.*, 2013). A vasta gama de propriedades dos óleos essenciais, vai resultar numa igual variedade de aplicações: Estes podem ser utilizados em tratamentos orais, tratamento de queimaduras e feridas (Ozogul *et al.*, 2015), como antissépticos, aditivos em suplementos de alimentação suína (Gracia-Valenzuela *et al.*, 2012), conservantes de alimentos e na cosmética (Hyldgaard *et al.*, 2012).

Apesar da bibliografia existente relacionada com óleos essenciais de diferentes espécies de plantas ser relevante, ainda é limitada a informação a cerca da respetiva actividade biológica (Ozogul *et al.*, 2015). Para explicar a acção antibacteriana destes compostos estão descritas três formas: interferência na dupla camada fosfolipídica da parede celular, aumento da permeabilidade e conseqüente perda dos constituintes celulares, alteração de sistemas enzimáticos envolvidos na produção de energia, na síntese de componentes estruturais e funcionais, ou na inativação ou destruição do material genético (Silvestri *et al.*, 2010).

Podem ainda existir vários factores que afetam a actividade antimicrobiana dos óleos essenciais, como a concentração (quanto maior a concentração maior a resposta antimicrobiana), o tempo de exposição (quanto maior ao tempo de exposição ao composto maior será a acção), o pH (a suscetibilidade das bactérias ao agente aumenta à medida que o pH desce), a disponibilidade de oxigénio (a anaerobiose parece promover o efeito antimicrobiano), o tipo de microrganismo (os óleos essenciais parecem ter mais efeito nas bactérias Gram positivas do que em Gram negativas, pois os microrganismos Gram negativos apresentam uma membrana exterior rica em lipopolissacarídeos que a torna quase impenetrável aos compostos lipofílicos prevenindo vários compostos como os óleos essenciais de passar a membrana). No entanto, existem bactérias Gram negativas com porinas na membrana que conseguem formar canais que permitem a passagem de pequenas moléculas (Seow *et al.*, 2014).

Ao longo dos anos tem crescido a preocupação com a utilização de desinfetantes e agentes antimicrobianos sintéticos, uma vez que estes podem ser prejudiciais para os humanos e para o ambiente, podendo ser tóxicos, e também pelo aumento das resistências (Isman, 2000). Por este motivo existe uma procura crescente de alternativas mais naturais. Uma das alternativas que tem ganho relevância, são os óleos essenciais e seus componentes, estes apresentam vantagens em relação aos métodos até agora utilizados, pois a sua toxicidade para mamíferos é reduzida (Isman, 2000; Sreenivasan e Gaffar, 2002)

e degradam-se facilmente e rapidamente na água (Sreenivasan e Gaffar, 2002). Muitos dos óleos essenciais e seus constituintes com actividade antimicrobiana já são conhecidos e são globalmente utilizados, estando disponíveis prontamente e a um custo moderado (Isman, 2000). Alguns dos óleos essenciais têm um largo espectro de atuação, e a informação disponível atualmente indica que são seguros para humanos e meio ambiente, o que faz deles uma boa aposta para a substituição dos agentes antimicrobianos sintéticos (Isman, 2000).

### 1.3.1. *Thymus vulgaris*

O Tomilho, *Thymus vulgaris*, é uma espécie de planta da família *Lamiaceae*, proveniente do sul da Europa (Hosseinzadeh *et al.*, 2015; Özcan e Chalchat, 2004), muito comum na Península ibérica (Jordán *et al.*, 2006). É um arbusto com pequenas folhas altamente aromáticas, verde-acinzentadas e cachos de flores roxas ou cor-de-rosa no início do verão (Hosseinzadeh *et al.*, 2015). O tomilho cresce bem num clima quente, seco e solarengo (Hosseinzadeh *et al.*, 2015), estando bem-adaptado a períodos alternados de secas e chuvadas (Jordán *et al.*, 2006). A espécie *Thymus vulgaris* é a mais utilizada na culinária e como planta medicinal (Bower *et al.*, 2016). Estudos indicam que esta planta tem propriedades antissépticas, antifatulentas, antimicrobianas e antioxidantes (Golmakani e Rezaei, 2008). Está documentado o uso medicinal desta planta no período em que apareceu a Peste negra, em que as pessoas utilizaram o tomilho para se protegerem da pandemia através do seu potencial antisséptico, usando adornos ao pescoço feitos de tomilho ou através da aplicação deste em bolhas provocadas pela doença (Ahmad *et al.*, 2014).

O óleo essencial de tomilho é produzido a partir das plantas floridas (Golmakani e Rezaei, 2008). Alguns benefícios no bem-estar humano e animal estão relacionados com o uso do óleo essencial de tomilho, pois existe também uma elevada procura por produtos mais naturais pela sociedade. Por este motivo, este produto pode ser considerado como um potencial impulso de novas tendências na indústria da alimentação, farmacêutica e da cosmética (Jordán *et al.*, 2006). O crescente interesse por produtos naturais pela sociedade levou à procura de propriedades benéficas deste óleo. Vários investigadores demonstraram que este apresenta actividade antifúngica, pesticida e antibacteriana (Jordán *et al.*, 2006). Foi também demonstrada actividade antioxidante, sendo esta aproveitada pela indústria alimentar no fabrico de suplementos dietéticos (Jordán *et al.*, 2006). O óleo essencial de tomilho é também muito utilizado em fitoterapia, mais especificamente para tratar e oferecer proteção contra o acne, hipertensão, infeções e cancro (Ahmad *et al.*, 2014).

A composição do óleo essencial de tomilho revelou que este é constituído por monoterpenos como o timol, o carvacrol e o linalool, sendo o principal componente o timol (Ahmad *et al.*, 2014). Mas esta composição pode mudar devido a vários factores como o local de extração, as condições nutricionais da planta e o estado de maturação da planta de quando foi colhida (Özcan e Chalchat, 2004). Os componentes do óleo essencial que mostraram ser os principais contribuidores para a sua actividade antimicrobiana foram o timol e o carvacrol, no entanto, um estudo demonstrou que o óleo concentrado tem uma actividade superior à dos seus componentes individuais (Ahmad *et al.*, 2014).

### 1.3.2. *Oreganum vulgare*

O género *Oreganum* pertence à família *Lamiaceae* (Azizi, 2010), engloba cerca de 38 espécies (Sahin *et al.*, 2004), entre elas o *Origanum vulgare*, comumente conhecido como Oregão (Azizi, 2010). Esta planta pode ser encontrada no Mediterrâneo e no Norte de África (Azizi, 2010; Sahin *et al.*, 2004). É uma planta anual, que cresce bem em terrenos montanhosos e a grandes altitudes (Sahin *et al.*, 2004). É muito utilizada na agricultura, na indústria farmacêutica e cosmética, e é utilizada em produtos alimentares, para dar sabor e em bebidas alcoólicas. É também usada como remédio tradicional para tratar doenças devido à sua actividade antifúngica (Azizi, 2010; Sahin *et al.*, 2004), antiinflamatória, antiespásmica e pode ainda tratar distúrbios digestivos, tosse convulsa e problemas menstruais (Sahin *et al.*, 2004). Apresenta ainda propriedades antioxidantes, inseticidas (Azizi, 2010), antidiabéticas, redutora dos marcadores de inflamação (Bower *et al.*, 2016), antimutagénica (Busatta *et al.*, 2007) e antimicrobiana (Azizi, 2010; Sahin *et al.*, 2004).

O óleo essencial de oregão é composto maioritariamente por timol e carvacrol (Azizi, 2010; Kuorwel *et al.*, 2011). Vários estudos indicam que a actividade antimicrobiana (Kuorwel *et al.*, 2011) e a actividade antioxidante estão relacionadas com estes dois compostos (Azizi, 2010). Outros dos componentes existentes no óleo essencial de oregão são o  $\gamma$ -terpineno, o p-cimeno, o linalool e o terpineno-4-ol (Azizi, 2010),  $\beta$ -mirceno,  $\beta$ -cariofileno e hidrato trans-sabineno (Leyva-López *et al.*, 2017). No entanto, esta composição pode mudar consoante o genótipo, condições ambientais e de cultivo (Azizi, 2010).

### 1.3.3. *Eugenia caryophyllata* Thunb

O cravo-da-índia (*Eugenia caryophyllata* Thunb.) é uma planta arbórea, nativa das Ilhas Molucas (Arquipélago da Insulíndia, Indonésia). Possui um odor fortemente aromático, um sabor ardente e característico (Silvestri *et al.*, 2010). Esta planta é muito utilizada na culinária, e como planta medicinal (Jiang *et al.*, 2010; Wei-Chun *et al.*, 2011).

A sua composição química é constituída principalmente por eugenol, acetato de eugenol, betacariofileno, ácido oleânico, e substâncias das classes: triterpeno, ceras vegetais, cetonas, resinas, taninos e esteróis (Silvestri *et al.*, 2010), sendo o componente maioritário o eugenol (Jiang *et al.*, 2010; Trajano *et al.*, 2010). No entanto, esta composição pode mudar devido à sua origem, estado vegetativo, época de crescimento e a parte da planta usada para o fabrico do óleo essencial (Trajano *et al.*, 2010). As propriedades antibacterianas são atribuídas ao eugenol (Silvestri *et al.*, 2010), este é ainda responsável pelo efeito anti-inflamatório, cicatrizante e analgésico. Seus efeitos medicinais compreendem o tratamento de náuseas, flatulências, indigestão, diarreia. Possui ainda propriedades bactericidas, e é também usado como anestésico, antisséptico (Jiang *et al.*, 2010) e no alívio de dores de dente (Silvestri *et al.*, 2010). Para além destas aplicações medicinais, também já foi observado que o cravo-da-índia diminui o número de algumas bactérias durante o período de armazenamento de sumos, leite e chá. Apesar de ser uma planta já com diversos trabalhos realizados acerca dela, existe ainda a necessidade de investigar o seu potencial antimicrobiano, com vista a ser melhor aproveitado na indústria alimentar e/ou medicina (Silvestri *et al.*, 2010).

## 1.4. Objetivos

A cavidade oral é um dos ambientes do corpo humano com maior número e variedade de microrganismos, entre eles as bactérias *Enterococcus faecalis*, *Actinomyces viscosus* e ainda várias espécies do género *Streptococcus*. Neste ambiente vão formar-se biofilmes, que neste contexto são mais conhecidos como placa bacteriana. Os biofilmes são estruturas altamente organizadas, que fornecem proteção aos microrganismos presentes nele, dificultando a ação de antibióticos e desinfetantes, e promovendo a propagação de resistências às terapias antimicrobianas, levantando questões de saúde pública. Com o crescente número de antibióticos colocados na lista das resistências adquiridas, é necessário encontrar alternativas para a eliminação ou inibição dos microrganismos. Os óleos essenciais são uma alternativa que tem ganho popularidade pelas suas variadas propriedades, entre as quais a capacidade antimicrobiana, e pelo facto de serem uma alternativa natural.

Neste contexto, o presente estudo teve três objetivos principais:

### 1.4.1. Avaliação da capacidade de produção de biofilme

Avaliação da produção de biofilme em meio sólido com corante Vermelho do Congo.

Avaliação da produção de biofilme em diferentes condições (meios de cultura, tempos de incubação e temperatura) utilizando culturas puras e mistas.

### 1.4.2. Avaliação da actividade antimicrobiana dos óleos essenciais

Avaliação da ação antimicrobiana de óleos essenciais (cravo, eucalipto, flôr-de-laranjeira, menta, niaouli, oregão, pinheiro e tomilho) em meio sólido.

Avaliação da ação antimicrobiana dos óleos essenciais de cravo, oregão e tomilho em células planctónicas e em biofilmes de culturas mistas.

### 1.4.3. Modelo escova de dentes com fibras de nylon

Avaliação da capacidade de produção de biofilme de culturas mistas em fibras de *nylon*.

Estudo da ação antimicrobiana dos óleos essenciais de cravo, oregão e tomilho em biofilmes formados em fibras de *nylon*.

## 2. Materiais e Métodos

### 2.1. Microrganismos em estudo e manutenção das culturas

Neste estudo foram utilizados vários microrganismos, nomeadamente as estirpes, *Actinomyces viscosus*, *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas* sp., *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus gordonii*, *S. mutans*, *S. oralis*, *S. sanguinis* e *S. salivarius* (Tabela 1).

**Tabela 1.** Microrganismos utilizados neste estudo.

Espécie	Origem	Temperatura ótima de crescimento
<i>Actinomyces viscosus</i> 488 CECT <sup>1,2</sup>	Microbiota oral	37 °C
<i>Aeromonas</i> sp. (A3)	Matadouro de suínos (superfície)	
<i>Aeromonas hydrophila</i> (A259)	Clínica humana	Entre 22 e 37 °C
<i>Aeromonas hydrophila</i> DSMZ 30187 <sup>T</sup> (R5) <sup>3</sup>	Alimentar	
<i>Enterococcus faecalis</i> (3L1.2, 7C1.4)	Alimentar	
<i>Enterococcus faecalis</i> (DS16, OG1-10)	Microbiota oral	Entre 25 e 37 °C
<i>Enterococcus faecalis</i> (V583)	Clínica humana	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> DSM 1707 <sup>T</sup> (PAO1)(Holloway, 1955)	Clínica humana	30 °C
<i>Streptococcus gordonii</i> <sup>4</sup>		
<i>Streptococcus mutans</i> 479 CECT <sup>1,2</sup>		
<i>Streptococcus oralis</i> <sup>4</sup>	Microbiota oral	37 °C
<i>Streptococcus sanguinis</i> <sup>4</sup>		
<i>Streptococcus salivarius</i> <sup>4</sup>		

Legenda:

<sup>1</sup> gentilmente cedidas pela Professora Doutora Maria Manuela Carolino (cE3c, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, Portugal)

<sup>2</sup> CECT – Coleção espanhola de culturas tipo (*Collección Española de Cultivos Tipo*)

<sup>3</sup>DSMZ -Coleção alemã de microrganismos e culturas celulares (*Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen*)

<sup>4</sup> gentilmente cedidas pelo Doutor Martin Nilsson (*Costerton Biofilm Center*, Universidade de Copenhaga, Dinamarca)

<sup>T</sup> Estirpe tipo

Durante este estudo os microrganismos foram conservados a -80 °C em criotubos com 20% de glicerol (v/v) em APT (água peptonada tamponada) (Cultimed, Espanha), posteriormente foram transferidos para placas de meio BHI (Brain Heart Infusion, Scharlau, Espanha), incubados 24 h em estufa a 37 °C e mantidos a 4 °C após o crescimento. Sempre que necessário, as culturas foram cultivadas em 5 mL de meio BHI líquido e incubadas a 37 °C durante 24 h.

As suspensões bacterianas utilizadas nos ensaios foram preparadas de acordo o seguinte protocolo:

- Preparar em cuvete uma diluição de 1:10 de cada cultura bacteriana em BHI e medir a densidade ótica (DO) a um comprimento de onda de 600 nm num espectrofotómetro (Pharmacia Biotech Ultrospec 2000);
- Recolher o volume necessário de cultura bacteriana para microtubos e centrifugar 5 min a 13 200 g a 4 °C (Eppendorf, Cenytrifuge 5415R);

- Descartar o sobrenadante e ressuspender o *pellet* em 100  $\mu$ L de Tampão fosfato salino (PBS) a 0,1 M, de modo a obter um inóculo com a concentração inicial de  $1 \times 10^9$  UFC/mL.

Nota: Para efetuar o cálculo da concentração da cultura bacteriana a utilizar para obter em cada suspensão bacteriana  $1 \times 10^9$  UFC/mL, foi necessária medir a DO600nm e converter o valor, considerando que 1 Unidade de absorvância (U.A.) =  $5 \times 10^8$  UFC/mL (Moran *et al.*, 2010).

## **2.2. Avaliação da capacidade de produção de biofilme**

### **2.2.1. Avaliação da formação de biofilme em meio com corante Vermelho do Congo**

Neste ensaio foi estudada a capacidade dos microrganismos em estudo formarem ou não biofilme, através da sua inoculação em placas com meio BHI com o corante Vermelho do Congo (Sigma-Aldrich, Alemanha). Os ensaios foram realizados em duplicado e foram estudadas duas temperaturas diferentes, 37 °C e temperatura ambiente 25 °C.

Preparação do meio:

- Preparar uma solução stock de Vermelho do Congo em água destilada com uma concentração de 4 mg/mL.
- Adicionar o corante azul Comassie (DC Panreac, Espanha), uma vez que ajuda a julgar a morfologia e a cor das colónias (Friedman & Kolter, 2004). Preparar uma solução stock em água destilada com uma concentração de 20 mg/mL;
- Ao BHI adicionar sacarose (Merck, EUA), sendo a concentração final 50 g/L;
- Autoclavar o meio com a sacarose, ainda sem os corantes, durante 40 min a 110 °C;
- Estabilizar o meio no banho de água (Mermmert, Alemanha) a 55 °C, depois de estável adicionar os corantes. Da solução stock de Vermelho do congo utilizar 2 mL para 200 mL de BHI, de modo a ficar com uma concentração final de 0,040 mg/mL, e da solução stock de azul Comassie utilizar 200  $\mu$ L para 200 mL de BHI, de modo a obter uma concentração final de 0,020 mg/mL;

O procedimento efectuado foi o seguinte:

- A partir de culturas metabolicamente ativas, efetuar o riscado em meio com corante Vermelho do Congo.
- Incubar durante 24 h a 37 °C e a temperatura ambiente.

A leitura dos resultados foi feita com base na escala proposta por Arciola *et al.*, (2002); resumindo, existe uma escala de seis cores que varia de vermelho muito intenso a preto muito intenso, sendo que o primeiro citado corresponde às culturas não produtoras de biofilme e o preto muito intenso às produtoras de biofilme.

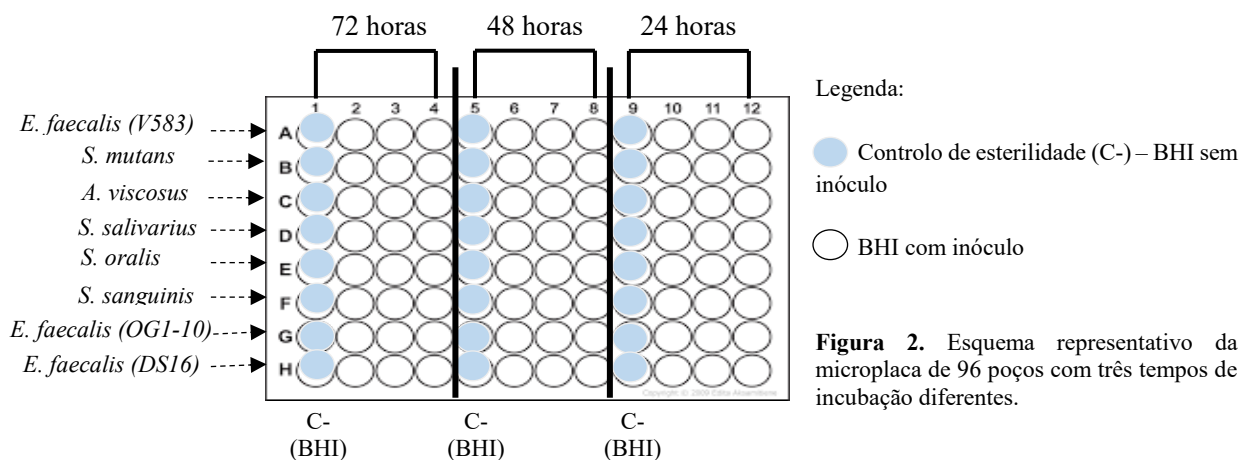
### **2.2.2. Avaliação da capacidade de produção de biofilme em microplacas de polistireno**

Neste ensaio foi estudada a produção de biofilme em microplacas de polistireno (VWR, EUA) a diferentes temperaturas (25 °C, 37 °C), tempos de incubação (24, 48, 72 h), meios de cultura (BHI, BHI

suplementado com mucina) e utilizando culturas puras ou culturas mistas. Os ensaios foram realizados em triplicado por microplaca e foram feitas três réplicas independentes em dias distintos.

A microplaca foi dividida em três partes, de modo a que cada uma correspondesse a um período de incubação diferente, ou seja, uma parte corresponde às 24 h, outra às 48 h e a última às 72 h, isto para 37 °C e 25 °C, e no meio BHI com e sem mucina (Sigma-Aldrich, Alemanha), como representado na Figura 2. Neste ensaio foi ainda usada a tampa em espigão (Nunc-TSP, Termo Scientific, Dinamarca) para simular o sistema “*Calgary Biofilm Device*” como descrito por Ceri *et al.*, (1999); em que a formação do biofilme também vai ocorrer em volta dos espigões.

Para preparar o meio suplementado com mucina, adicionou-se ao BHI a mucina de forma a obter uma concentração de 2,5 g/L (Kayalvizhi e Antony, 2011), e autoclavou-se durante 20 min a 121 °C.



**Figura 2.** Esquema representativo da microplaca de 96 poços com três tempos de incubação diferentes.

O procedimento experimental efectuado foi o seguinte:

- Preparar suspensões bacterianas de modo a obter uma concentração inicial de  $1 \times 10^9$  UFC/mL, a partir de culturas frescas, como mencionado em 2.1;
- Distribuir 178,2  $\mu$ L de BHI ou BHI suplementado com mucina;
- Adicionar 1,8  $\mu$ L de cada suspensão bacteriana nos poços correspondentes às 72 h, tapar a microplaca com a tampa em espigão de polistireno e incubar a 37 °C ou a 25 °C. Após 24 h inocular os poços correspondentes às 48 h, e no dia seguinte os poços correspondentes às 24 h.
- Após o período de incubação proceder de acordo com o protocolo descrito a seguir:
  - Tampa em espigão de polistireno:
    - Retirar a tampa e lavá-la três vezes noutra microplaca por imersão em 180  $\mu$ L de tampão fosfato salino 0,1 M;
    - Colocar a tampa numa microplaca com 180  $\mu$ L de tampão fosfato salino 0,1 M com 0,1% de tween 80 (v/v) em cada poço;
    - Colocar no banho de ultrassons (Grant, Ultrasonic bath, Inglaterra) durante 15 min, de forma a libertar o biofilme;
    - Substituir a tampa em espigão por uma tampa normal e medir a DO600nm num leitor de microplacas (FluostarOptima, BMG LABTECH);
  - Microplaca de polistireno;

- Efetuou-se a coloração com o corante violeta cristal de acordo o procedimento descrito por O'Toole, (2011).

Procedeu-se da mesma forma para as culturas mistas, em que as combinações de microrganismos foram as seguintes:

- Streptococcus mutans* + *S. oralis* + *S. sanguinis* + *S. salivarius*;
- Streptococcus mutans* + *S.oralis* + *S.sanguinis* + *S. salivarius* + *Actinomyces viscosus*;
- Streptococcus mutans* + *S.oralis* + *S. sanguinis* + *S. salivarius* + *Enterococcus faecalis* (OG1-10);
- Streptococcus mutans* + *S.oralis* + *S. sanguinis* + *S. salivarius* + *Actinomyces viscosus* + *Enterococcus faecalis* (OG1-10, DS16 e V583).

Foram preparadas as combinações bacterianas acima mencionadas num volume final de 8 µL. O volume adicionado de cada suspensão bacteriana dependeu do número de estirpes que se pretendia combinar.

Os cálculos efetuados foram os seguintes:

- 8 µL (volume final) / 4 (isolados) = 2 µL de cada suspensão bacteriana
- 8 µL / 5 = 1,6 µL de cada suspensão bacteriana
- 8 µL / 5 = 1,6 µL de cada suspensão bacteriana
- 8 µL / 8 = 1 µL de cada suspensão bacteriana

### 2.3. Avaliação da capacidade antimicrobiana dos óleos essenciais

Os óleos essenciais utilizados neste trabalho foram gentilmente cedidos pela Soria Natural, Espanha: cravo (*Eugenia caryophyllata Thunb*), eucalipto (*Eucalyptus globulus Labill*), flôr-de-laranjeira (*Citrus aurantium* L. var. amara), menta (*Mentha piperita* L.), niaoulí (*Melaleuca viridiflora Gaertn.*), oregão (*Origanum vulgare* L.) pinheiro (*Pinus sylvestris* L.) e tomilho (*Thymus vulgaris* L.).

#### 2.3.1. Método de difusão em meio sólido: *screening* inicial

O método da difusão em meio sólido foi adaptado do *Clinical and Laboratory Standart Institute's guideline* (CLSI, 2004), tendo como objetivo o estudo da ação dos óleos essenciais como agentes antimicrobianos em meio sólido. Para cada um dos óleos testaram-se duas diluições, uma mais concentrada de 1:2, e uma mais diluída de 1:10, sendo a diluição efetuada em agar (Agar-Agar, Scharlau, Espanha) a 0,15% em água destilada (esterilizado por autoclavagem).

O procedimento experimental efetuado foi o seguinte:

- Preparar meio BHI semi-sólido, isto é, meio BHI com agar 0,75%;
- A partir de culturas frescas, inocular 20 mL de BHI semi-sólido e homogeneizar no vórtex (IKA Vortex Genius 3, Sigma-Aldrich, Alemanha);
- Com o BHI semi-sólido já inoculado, fazer uma sobrecamada numa placa com BHI e deixar solidificar;

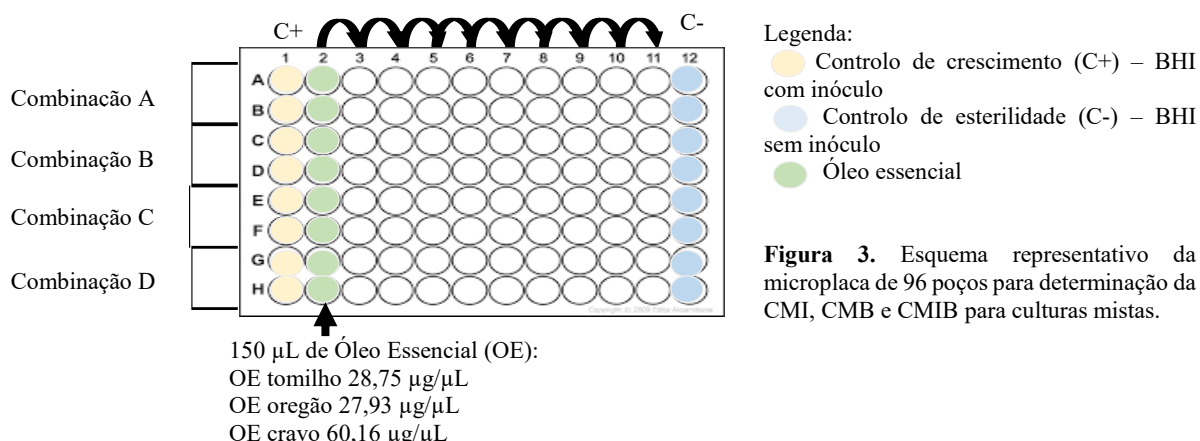


- Adicionar 5  $\mu\text{L}$  de cada óleo essencial na placa (em zonas distintas e bem delimitados) e incubar a 37 °C durante 24 h;
- Após a incubação medir com uma régua o diâmetro dos halos de inibição formados.

### 2.3.2. Método da microdiluição: Determinação das concentrações mínimas inibitórias (CMI), concentrações mínimas bactericidas (CMB) e concentrações mínimas inibitórias de formação de biofilme (CMIB)

As concentrações mínimas inibitórias dos óleos essenciais em estudo para as culturas mistas, foram determinadas num ensaio em meio líquido utilizando microplacas de 96 poços. Neste ensaio, utilizamos três óleos essenciais (tomilho, oregão e cravo). Os stocks de cada óleo essencial foram preparados em agar 0,15%, numa proporção de 1:1 (v/v), pesando um microtubo com 1 mL de cada óleo essencial e 1 mL de agar 0,15%, com a concentração inicial de 445,75  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  de OE de tomilho, 446,85  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  de OE de oregão e 481,30  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  de OE de cravo.

A partir de soluções stock dos óleos essenciais foram efetuadas diluições sucessivas de 1:1(v/v), em agar 0,15%, de modo a obter uma concentração inicial de 28,75  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  de OE tomilho, 27,93  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  de OE de oregão e 60,16  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  de OE de cravo.



Utilizou-se o procedimento a seguir descrito:

- Preparar suspensões bacterianas a partir de culturas frescas, de modo a obter uma concentração inicial de  $1 \times 10^9$  UFC/mL;
- Distribuir 142  $\mu\text{L}$  de meio BHI suplementado com mucina em todos os poços;
- Colocar em todos os poços da segunda coluna 150  $\mu\text{L}$  de cada óleo essencial e fazer diluições seriadas de 1:2 até à penúltima coluna (Figura 3);
- Adicionar 8  $\mu\text{L}$  de suspensão bacteriana em cada poço, exceto no controlo negativo;
- Incubar a microplaca a 37 °C durante 48 h.

A concentração mínima inibitória (CMI) foi definida como a menor concentração em que não se observou crescimento bacteriano, isto é, a menor concentração em que não se observou turvação no meio de cultura.

Para avaliar o efeito bactericida dos óleos essenciais, foram retirados 5  $\mu\text{L}$  de suspensão bacteriana dos poços sem turvação visível que, foram inoculados em placas de BHI e incubados a 37 °C durante 24 h.

Após incubação, foi determinada a concentração mínima bactericida, isto é, a concentração mínima em que não se observou crescimento bacteriano (Pankey e Sabath, 2004).

Para determinar a concentração mínima inibitória da formação de biofilme (CMIB), foi feita a coloração com o corante violeta cristal, como descrito por O'Toole (2011). O valor desta concentração considerou-se que se aproxima do controlo negativo, por isso efetuou-se o cálculo da média dos controlos negativos e os seus respetivos desvios padrão, obtendo-se um intervalo de valores de absorvância. Seguidamente observou-se os valores de absorvância obtidos nos restantes poços e verificou-se se algum se encontrava no intervalo de valores calculado, se sim, considerou-se que houve inibição da formação de biofilme. A CMIB determinou-se como sendo a menor concentração em que os valores de absorvância se encontravam no intervalo definido.

### **2.3.3. Determinação da concentração mínima de erradicação de biofilme (CMEB)**

Para determinar a concentração mínima de erradicação de biofilme para os óleos essenciais utilizados, adaptou-se a técnica descrita por Ceri *et al.*, 1999, em que se utilizaram microplacas de 96 poços com tampas em espigão, sendo os ensaios realizados em triplicado e com três repetições em dias distintos.

A metodologia utilizada foi a seguinte:

- Preparar suspensões bacterianas a partir de culturas frescas (culturas previamente incubadas a 37 °C durante 24 h em meio BHI), de modo a obter uma concentração inicial de  $1 \times 10^9$  UFC/mL;
- Distribuir 142 µL de meio BHI suplementado com mucina;
- Adicionar 8 µL de suspensão bacteriana em cada poço;
- Cobrir a microplaca com a tampa em espigão e incubar a 37 °C durante 48 h.
- Após o período de incubação, retirar a tampa em espigão da placa de incubação e lavá-la em 150 µL de tampão fosfato salino 0,1 M;
- Colocar durante uma hora a tampa em espigão na placa de erradicação (ver nota abaixo);

Nota: Preparação da placa de erradicação:

- Distribuir 150 µL de agar a 0,15% nos poços da microplaca;
  - Adicionar em toda a segunda coluna 150 µL de cada óleo essencial e realizar diluições sucessivas de 1:2 até à penúltima coluna.
- 
- Retirar da placa de erradicação e lavar a tampa três vezes em 150 µL de tampão fosfato salino a 0,1 M;
  - Colocar a tampa em espigão numa nova placa com 150 µL de BHI suplementado com mucina em cada poço e incubar 24 h a 37 °C;
  - Retirar 5 µL de suspensão bacteriana dos poços sem turvação visível, inocular em placas de BHI e incubar 24 h a 37 °C.

A CMEB foi determinada como a menor concentração em que não se observou crescimento bacteriano nas placas de BHI.

## 2.4. Escova de dentes: Modelo de estudo

Um dos principais componentes da escova de dentes é um material termoplástico da família das poliamidas, como o *nylon* [<https://www.colgateprofessional.com/education/patient-education/topics/oral-hygiene-basics/history-of-toothbrushes-and-toothpastes>, data de consulta 13/07/18]. Assim, para fazer o modelo da escova de dentes foi utilizado o fio de *nylon* (Ola-riomar, Espanha). Neste ensaio, a avaliação de produção de biofilme nos fios de *nylon*, e também a determinação da CMI, CMB e CMIB foram determinadas em meio líquido utilizando microplacas de 24 poços (VWR, EUA). A partir de soluções stock dos óleos essenciais foram efetuadas diluições sucessivas de 1:2 de modo a obter uma concentração inicial de 13,99 µg/µL de OE tomilho, 14,24 µg/µL de OE de oregão e 56,91-62,84 µg/µL de OE de cravo. Utilizou-se para termos de comparação um Elixir bucal (Colgate, EUA).

Preparação dos fios de *nylon*:

- Cortar com um bisturi fios de *nylon* com 1,4 cm de comprimento;
- Colocá-los num frasco com 50 mL de soluto de ringer (Oxoid LTD, Inglaterra) e autoclavar durante 20 min a 121 °C;
- Para confirmar se a esterilização foi eficaz, com a ajuda de uma pinça estéril, retirar três fios e colocá-los em 5 mL de BHI;
- Incubar 24 h a 37 °C;
- Visualizar se existe turvação no meio, se não, a esterilização dos fios foi eficaz.

O procedimento realizado foi o seguinte:

- Preparar suspensões bacterianas a partir de culturas frescas, de modo obter uma concentração inicial de  $1 \times 10^9$  UFC/mL, como descrito em 1.1;
- Distribuir 474 µL de BHI suplementado com mucina em todos os poços da placa de 24 poços (VWR, EUA);
- Adicionar à segunda coluna 500 µL de óleo essencial e fazer diluições sucessivas de 1:2 até ao penúltimo poço;
- Adicionar 26 µL de suspensão bacteriana a todos os poços, com exceção do último;
- Colocar, com uma pinça, 20 fios de *nylon* de aproximadamente 1,4 cm de comprimento em cada poço;
- Incubar 48 h a 37 °C;

A determinação da CMI e CMB foi feita como descrito no ponto 1.4.2.

Neste ensaio, tendo em conta que houve formação de biofilme nas fibras e na base da placa de polistireno, determinaram-se duas CMIB. Assim, efetuou-se o seguinte protocolo:

- Com uma pinça retirar as fibras para uma nova microplaca de 24 poços com 500 µL de tampão fosfato salino 0,1 M de modo a lavá-las;
- Observar à lupa (Nikon, Japão);
- Retirar o meio da microplaca original e lavar 2 vezes com 500 µL de tampão fosfato 0,1 M;
- Retirar o tampão das microplacas e deixar secar ao ar;
- Adicionar 150 µL do corante violeta cristal a 0,2% (p/v), e esperar 15 min;
- Retirar o corante, efetuar 3 lavagens com 150 µL de tampão fosfato salino 0,1 M e secar ao ar;

- Adicionar 150  $\mu\text{L}$  da solução solubilizadora álcool: acetona (80:20) (v/v) e deixar atuar 15 min;
- De modo a ser possível a medição da DO 580nm, efetuar uma diluição de 1:10 numa nova microplaca de 96 poços. Para tal, adicionar 135  $\mu\text{L}$  álcool: acetona (80:20) (v/v) em todos os poços, de seguida transferir 15  $\mu\text{L}$  do conteúdo de cada poço das placas de 24 poços para a microplaca de 96 poços.

A determinação das duas CMIBs foi efetuada como descrito no ponto 2.3.2., apenas se multiplicou os valores da leitura obtidos por 10, tendo em conta que se efetuou uma diluição de 1:10 para efetuar a leitura.

## 2.5. Análise de dados

Para obter os valores de produção de biofilme a partir dos valores das leituras da DO570nm, calculou-se a média dos controlos negativos, de seguida calculou-se as médias das réplicas de cada microrganismo/combinção. Subtraiu-se o valor da média dos controlos negativos ao valor da média dos microrganismos/combinções, obtendo-se assim o valor real da produção de biofilme. Para obter o valor do erro, calcularam-se os desvios padrão dos valores das réplicas de cada microrganismo/combinção.

Para realizar a análise estatística dos resultados utilizou-se o software XL STAT (2018). No ensaio de avaliação de formação de biofilme existiam vários factores a ter em conta, compararam-se os três períodos de incubação diferentes (24, 48 e 72 h) e compararam-se os diferentes meios e temperaturas de incubação (BHI 25 °C, BHI 37 °C, BHI suplementado com mucina 25 °C e BHI suplementado com mucina 37 °C). Neste ensaio compararam-se ainda os diferentes microrganismos em estudo. Para as culturas mistas efetuaram-se as mesmas comparações do que as efetuadas para as culturas puras.

No *screening* inicial dos óleos essenciais compararam-se os oito óleos diferentes, os oito microrganismos em estudo e ainda as duas diluições diferentes (1:2 e 1:10). No ensaio de determinação da CMI, CMB, CMIB e CMEB, foram comparados os três óleos (tomilho, oregão e cravo) e as quatro combinações de microrganismos para cada uma das concentrações.

No modelo da escova de dentes, foi avaliada a produção de biofilme tanto na microplaca de polistireno como nos fios de *nylon*, por isso foi comparada a produção de biofilme nestas duas superfícies e foi também comparada a produção de biofilme entre as quatro diferentes combinações de microrganismos. Neste modelo determinaram-se também as CMIs, CMBs e CMIBs dos três óleos essenciais em estudo, assim compararam-se os três óleos e as quatro combinações de microrganismos.

A análise de variância foi feita pelo teste de Kruskal-Wallis, efetuou-se ainda uma análise *a posteriori* pelo teste de Conover-Iman, e pelo teste de Steel-Dwass-Critchlow-Fligner, quando o anterior não pôde ser aplicado. Efetuou-se ainda o teste de Mann-Whitney para comparar a formação de biofilme nas culturas puras e nas culturas mistas.

### 3. Resultados e Discussão

#### 3.1. Avaliação da capacidade de formação de biofilme

##### 3.1.1. Avaliação da formação de biofilme em meio com corante Vermelho do Congo

Neste ensaio, avaliaram-se 15 microrganismos relativamente à capacidade de produzirem de biofilme. Para tal utilizou-se o Vermelho do Congo, um corante que se liga aos polissacarídeos que constituem a matriz do biofilme, sendo assim possível detetar visualmente se um determinado microrganismo forma ou não biofilme (Freeman *et al.*, 1989). Este método tem várias vantagens como o facto de as colónias permanecerem viáveis após o ensaio, ser fácil e barato de realizar. No entanto, é um método com uma interpretação de resultados subjetiva, não é um método quantitativo e tem pouca precisão (Arciola *et al.*, 2002; Freeman *et al.*, 1989; Kaiser *et al.*, 2013). Na Tabela 2 estão representados os resultados obtidos para a formação de biofilme em meio com corante Vermelho do Congo a duas temperaturas diferentes (temperatura ambiente e 37 °C). Esta tabela foi elaborada pela visualização da cor das colónias obtidas, em que foram classificadas, segundo uma escala de seis cores que varia entre o preto muito intenso e o vermelho muito intenso. O preto muito intenso correspondendo à cor das colónias do microrganismo produtor de biofilme, e o vermelho muito intenso à cor do microrganismo não produtor de biofilme (Arciola *et al.*, 2002).

**Tabela 2.** Resultados obtidos no ensaio de deteção de produção de biofilme a duas temperaturas utilizando o corante Vermelho do Congo

37 °C		Temperatura ambiente	
Produtoras	Não produtoras	Produtoras	Não produtoras
<i>Aeromonas hydrophila</i> (A259)	<i>Enterococcus faecalis</i> (3L1.2)	<i>Aeromonas hydrophila</i> (A259)	<i>Enterococcus faecalis</i> (3L1.2)
<i>Aeromonas</i> sp. (A3)	<i>Enterococcus faecalis</i> (7C1.4)	<i>Aeromonas hydrophila</i> (R5)	<i>Enterococcus faecalis</i> (7C1.4)
<i>Enterococcus faecalis</i> (DS16)	<i>A. viscosus</i>	<i>S. mutans</i>	<i>Aeromonas</i> sp. (A3)
<i>Aeromonas hydrophila</i> (R5)	<i>Enterococcus faecalis</i> (OG1-10)	<i>S. salivarius</i>	<i>A. viscosus</i>
<i>S. mutans</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (PAO1)		<i>Enterococcus faecalis</i> (DS16)
<i>S. salivarius</i>	<i>S. gordonii</i>		<i>Enterococcus faecalis</i> (OG1-10)
<i>S. sanguinis</i>			<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (PAO1)
<i>Enterococcus faecalis</i> (V583)			<i>Enterococcus faecalis</i> (V583)

Observando a Tabela 2, pode verificar-se que existem diferenças na formação de biofilme nas temperaturas estudadas, uma vez que alguns dos microrganismos em estudo nas duas temperaturas têm classificações de produtores e não produtores de biofilme. Tendo em conta este parâmetro, podemos observar que apenas cinco microrganismos mantêm a classificação de não produtoras em ambas as temperaturas, nomeadamente, 3L1.2, 7C1.4, OG1-10, *A. viscosus* e PAO1. Quanto às produtoras, esta classificação é mantida em ambas as temperaturas por apenas quatro microrganismos, A259, R5, *S. mutans* e *S. salivarius*. Pode ainda observar-se que a temperatura de 37 °C parece ter alguma influência na produção de biofilme, uma vez que nesta temperatura os há mais microrganismos produtores do que não produtores, ocorrendo o oposto para a temperatura ambiente. Esta diferença possivelmente pode ser justificada pelo facto de a maioria destes microrganismos ter uma temperatura ótima de crescimento próximo dos 37 °C, como *A. viscosus* ou *Streptococcus* (Gerencser e Slack, 1969).

Analisando os microrganismos, podemos observar que *E. faecalis*, *A. viscosus* e várias espécies de *Streptococcus*, neste ensaio foram classificados como não produtores, quando na literatura estão descritos como produtores de biofilme (Komiyama *et al.*, 2016; Kreth *et al.*, 2008; Krzyściak *et al.*, 2014; Mohamed e Huang, 2007; Rozen *et al.*, 2001). Estes resultados vêm dar ênfase à falta de precisão deste método (Freeman *et al.*, 1989; Kaiser *et al.*, 2013). *Pseudomonas aeruginosa* está descrita como sendo uma espécie produtora de biofilme (Percival *et al.*, 2012), no entanto, neste trabalho, a PAO1, uma estirpe de *P. aeruginosa*, foi classificada como não produtora. Este resultado está de acordo com o estudo feito por Friedman e Kolter, (2004), que demonstrou que esta estirpe não expressa o fenótipo auto-agregativo, necessário para a formação de biofilme.

*Aeromonas* spp. foram classificadas como produtoras, com exceção de *Aeromonas hydrophila* A3 à temperatura ambiente. Esta classificação está congruente com a literatura que reconhece o género *Aeromonas* como produtor de biofilme (Gavín *et al.*, 2002; Jahid *et al.*, 2013).

Não se obteve qualquer classificação relativamente a *S. oralis* e *S. sanguinis*, uma vez que não houve crescimento destes em ambas as temperaturas. Esta ausência de crescimento, pode dever-se ao facto de estas estirpes crescerem em ambientes menos ricos em oxigénio (Byers *et al.*, 2000; Kreth *et al.*, 2008).

*S. gordonii* também não cresceu à temperatura ambiente, possivelmente por esta não ser a temperatura indicada para o seu crescimento (Caparon *et al.*, 1992).

Outro aspeto a ter em conta na análise destes resultados é o facto deste teste estar otimizado para bactérias Gram-negativas, cujo biofilme formado é diferente do produzido por Gram-positivas. Enquanto a matriz do biofilme de bactérias Gram-negativas é constituída por polissacarídeos neutros ou polianionicos, a matriz de bactérias Gram-positivas é constituída por polissacarídeos catiónicos (Donlan, 2002; Schachter, 2003). Como foram também testadas bactérias Gram-positivas, os resultados obtidos podem ter sido afetados pelo facto de o teste não estar otimizado para estas.

Assim, este teste serviu para fazer uma análise inicial das estirpes utilizadas para tentar verificar se seriam ou não produtoras de biofilme, de forma a seleccionar as mais relevantes para utilizar nos ensaios seguintes e verificar se a temperatura iria influenciar esta formação.

### **3.1.2. Avaliação da capacidade de produção de biofilme em microplacas de polistireno**

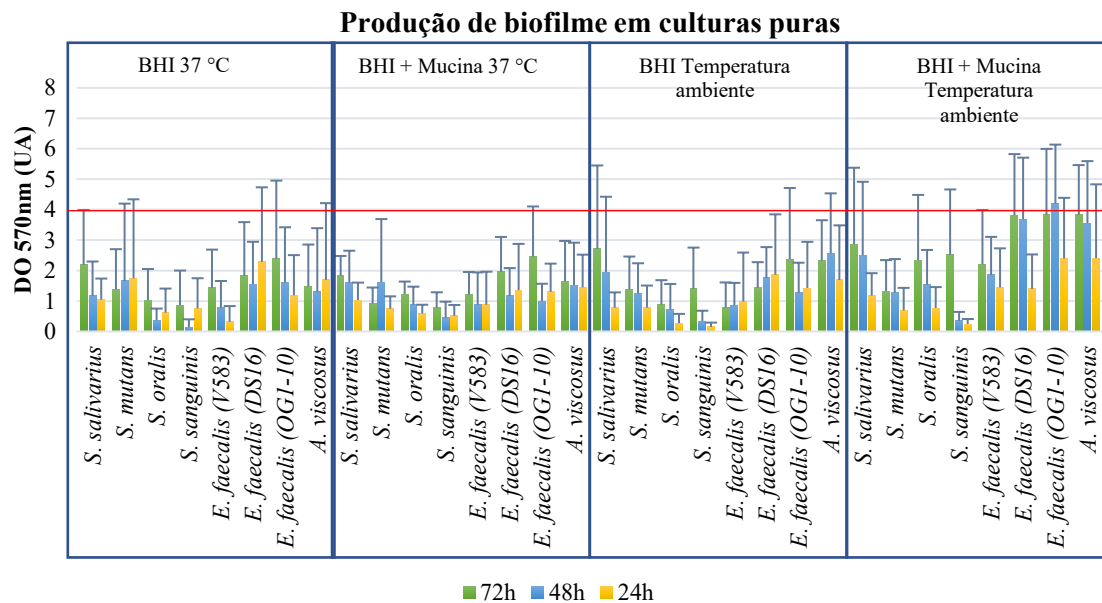
Os ensaios de formação de biofilme em microplacas de polistireno estão entre os ensaios mais frequentemente usados, devido às suas vantagens como o facto de serem baratos, serem necessários volumes reduzidos de reagentes e poderem fazer-se vários testes em simultâneo (Coenye e Nelis, 2010).

Este ensaio teve como objetivo avaliar a formação de biofilme dos diferentes microrganismos utilizados neste estudo, e se esta capacidade se alterava consoante a temperatura, período de incubação e adição de mucina ao meio.

Na Figura 4 estão representados os resultados obtidos para a produção de biofilme em culturas puras, no meio com e sem mucina, à temperatura ambiente e a 37 °C, e em três períodos de incubação diferentes, 24 h, 48 h e 72 h.

Analisando as condições de formação de biofilme (temperatura e adição de mucina) pode verificar-se que existem diferenças nos valores de absorvância. Observa-se que a 37 °C o meio BHI sem mucina atinge um valor máximo de cinco UA, enquanto que o meio BHI com a suplementação de mucina atinge um valor ligeiramente acima das quatro UA. No entanto, quando se observa a temperatura ambiente, verifica-se que no meio BHI sem mucina o valor máximo atingindo é um pouco abaixo de cinco UA,

enquanto que no meio BHI suplementado com mucina ultrapassa as seis UA. Estes dados levam-nos a inferir que a temperatura, em combinação com a suplementação do meio, influencia a formação de biofilme.



**Figura 4.** Produção de biofilme em culturas puras. A linha a vermelho é o limite de leitura do aparelho.

Assim, com o intuito de comprovar se existiam diferenças estatisticamente significativas entre as quatro condições usadas neste estudo, procedeu-se à análise de variância pelo teste de Kruskal-Wallis. Esta análise detetou diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre o meio BHI suplementado com mucina à temperatura ambiente e os três restantes, ou seja, o meio suplementado com mucina à temperatura ambiente vai influenciar a formação de biofilme, sendo maior nestas condições. A diferença de formação de biofilme nestas condições pode ser justificada pelo facto de a saliva ser composta por mucinas, fazendo delas componentes de grande abundância na cavidade oral (Chalovich e Eisenberg, 2013), assim a mucina vai mimetizar o ambiente *in vivo* de formação de biofilme pela microbiota oral. A temperatura ambiente, pode corresponder à temperatura da cavidade oral, tendo em conta que esta está constantemente a abrir, deixando entrar ar, arrefecendo-a. Os 37 °C corresponderiam à temperatura sentida se a cavidade oral estivesse sempre fechada, como não é o que ocorre, provavelmente será a justificação para esta condição favorecer a formação de biofilme, nas bactérias estudadas. De seguida, foi feito o teste *a posteriori* de Conover-Iman, que confirmou a formação de dois grupos, um formado pelo meio BHI suplementado com mucina a temperatura ambiente, e o segundo grupo formado pelos meios BHI e BHI com mucina a 37 °C e pelo meio BHI a temperatura ambiente.

Observando os três períodos de incubação (24, 48 e 72 h), verificaram-se diferenças nos valores de absorvância lidos, pois em todas as condições testadas, mais de metade dos microrganismos em estudo alcança o seu valor máximo de absorvância às 72 h, como podemos verificar na Figura 4.

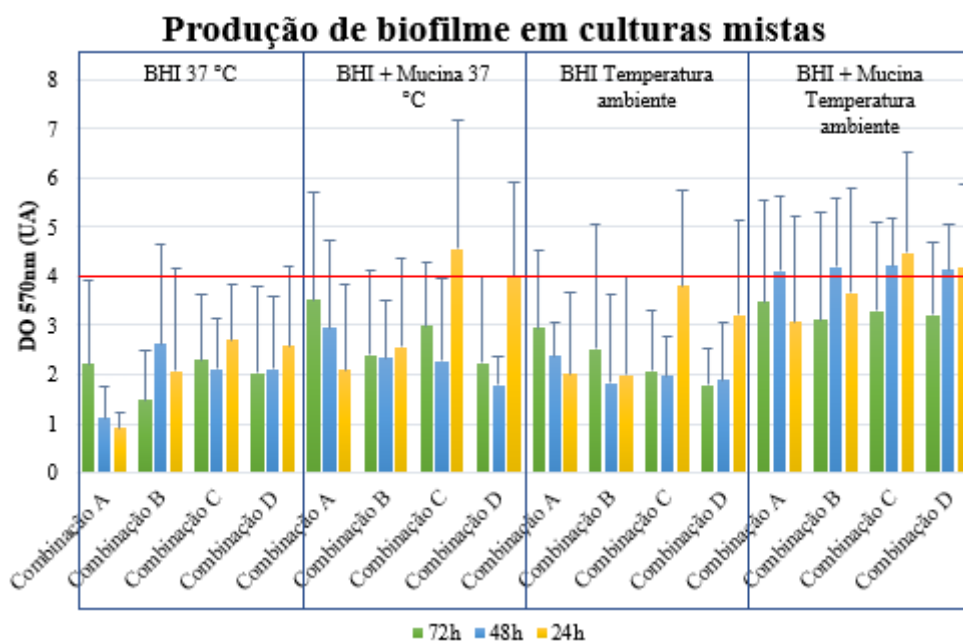
Para comprovar se estes resultados teriam significância estatística, realizou-se o teste de Kruskal-Wallis, que detetou existirem diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre o período de incubação de 72 h, e os períodos de 48 e 24 h. Seguidamente realizou-se o teste *a posteriori* de Conover-Iman, que confirmou a formação de dois grupos distintos, um formado pelo período de 72 h e o segundo grupo formado pelos períodos de 48 e 24 h. Estes resultados levam-nos a inferir que no período de incubação de 72 h há uma maior formação de biofilme, podendo derivar de um crescimento gradual da biomassa

do biofilme atingindo-se um máximo ao fim das 72 h. Num estudo realizado em 2013, observou-se que *E. faecalis* formou biofilme ao longo do tempo, atingindo um valor máximo de biomassa às 72 h (Seneviratne *et al.*, 2013). Assim, pode-se concluir que após este período de incubação foi onde ocorreu uma maior produção de biofilme.

Comparando os microrganismos em estudo podemos ver diferenças, estes agrupam-se de acordo com diferentes géneros analisados, ou seja, as espécies pertencentes a *Streptococcus* têm valores equivalentes, o mesmo acontecendo com as espécies de *Enterococcus*, no entanto *A. viscosus* teve valores semelhantes a *Enterococcus* spp. Realizou-se o teste de Kruskal-Wallis para verificar se estes resultados tinham significância estatística. Verificou-se que existem diferenças significativas entre grupos dos diferentes microrganismos, isto é, grupos de microrganismos que não tinham diferenças significativas entre si, mas que apresentavam diferenças quando comparados com outros. Observou-se que *A. viscosus*, DS16 e OG1-10 não apresentavam diferenças entre si, mas todos apresentavam diferenças significativas para com *S. oralis*, *S. sanguinis*, *S. mutans* e V583. *S. salivarius* apresentava diferenças estatisticamente significativas quando comparado com *S. oralis*, *S. sanguinis* e V583, não apresentando diferenças quanto aos restantes. Procedeu-se ao teste *a posteriori* de Conover-Iman para se obter a confirmação destes resultados. O observado foi a formação de quatro grupos, o primeiro constituído por *S. sanguinis*, *S. oralis* e V583, o segundo formado por *S. oralis*, *S. mutans* e V583, o terceiro englobava *S. salivarius* e *S. mutans*, e último continha *S. salivarius*, DS16, OG1-10 e *A. viscosus*. Estes grupos estão de acordo com o descrito anteriormente. Estes resultados fazem sentido, uma vez que houve comportamentos semelhantes de crescimento entre as espécies do mesmo género, ou no caso dos *Enterococcus*, da mesma espécie. Observou-se ainda comportamentos semelhantes na formação de biofilme entre *Enterococcus* e *A. viscosus*, talvez devido às suas condições de crescimento serem semelhantes. No entanto, V583 não se agrupou com os restantes *Enterococcus*, apresentando mesmo diferenças estatisticamente significativas, o que poderá estar relacionado com a sua origem, uma vez que este não foi isolado da microbiota oral, ao contrário dos restantes (DS16 e OG1-10). Outra das diferenças notadas, foi o facto de *S. salivarius* só ter uma resposta semelhante ao *S. mutans* e não com os restantes, o que pode ser justificado pelo facto destas duas crescerem em microaerofilia e *S. sanguinis* e *S. oralis* não. No entanto, não justifica o facto de *S. mutans* não apresentar diferenças para com *S. oralis*. As semelhanças de *S. salivarius* com *Enterococcus faecalis* pode dever-se a terem condições ótimas de crescimento semelhantes.

Num estudo efetuado por Loo *et al.*, (2000), várias espécies de *Streptococcus* da cavidade oral foram estudadas na sua capacidade de formação de biofilme. Os resultados obtidos para *S. oralis*, confirmaram que este tem uma formação de biofilme moderada, numa das estirpes estudadas não foi capaz de formar biofilme na superfície de polistireno. Apesar dos estudos não serem diretamente comparáveis, uma vez que as condições de crescimento foram diferentes, conseguimos confirmar que os microrganismos em estudo são capazes de formar biofilme.





**Figura 5.** Produção de biofilme em culturas mistas. A linha a vermelho representa o limite de leitura do aparelho.

Legenda:

Combinação A: *Streptococcus mutans* + *S. oralis* + *S. sanguinis* + *S. salivarius*;

Combinação B: *Streptococcus mutans* + *S.oralis* + *S.sanguinis* + *S. salivarius* + *Actinomyces viscosus*;

Combinação C: *Streptococcus mutans* + *S.oralis* + *S. sanguinis* + *S. salivarius* + *Enterococcus faecalis* (OG1-10);

Combinação D: *Streptococcus mutans* + *S.oralis* + *S. sanguinis* + *S. salivarius* + *Actinomyces viscosus* + *Enterococcus faecalis* (OG1-10, DS16 e V583).

Neste ensaio fomos avaliar a produção de biofilme em culturas mistas, isto é, a produção de biofilme das combinações de microrganismos usados neste ensaio.

Observando o gráfico da Figura 5, quanto às condições de crescimento (temperatura e meio), verifica-se que nos meios suplementados com mucina atingiram-se valores de densidade ótica elevados, chegando a ultrapassar as sete UA no meio com mucina a 37 °C, e está muito próximo a sete UA no meio com mucina à temperatura ambiente. Pode-se ainda observar que nesta última condição referida, os valores das leituras são aproximadamente uniformes, sendo na generalidade elevados e muito próximos. Realizou-se o teste de Kruskal-Wallis para verificar se estes dados possuiriam relevância estatística, e observou-se que há diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre os meios com e sem mucina, e entre os próprios meios com mucina a diferentes temperaturas, o que indica que não é só a adição de mucina ou só a temperatura que vai influenciar a formação de biofilme, mas sim a combinação das duas condições. Para confirmação, procedeu-se à realização do teste de Conover-Iman, que mostrou a formação de três grupos, o primeiro com os meios de BHI, o segundo com o meio BHI com a suplementação de mucina a 37 °C, e o terceiro pelo meio de BHI suplementado com mucina à temperatura ambiente. O meio BHI com a suplementação de mucina à temperatura ambiente foi o que teve a média mais elevada, sugerindo assim que estas são as condições mais favoráveis para a formação de biofilme, para estas combinações de microrganismos. As mucinas são proteínas que compõem a saliva, fazendo delas componentes de grande abundância na cavidade oral (Chalovich e Eisenberg, 2013), este facto pode justificar o favorecimento dos meios suplementados com mucina ao crescimento de biofilme pelos microrganismos em estudo. Jonsson *et al.*, (2001), demonstraram em bactérias do género *Lactobacillus* (pertencentes à microbiota oral) que a suplementação de mucina favorece a adesão, promovendo a formação de biofilme. A temperatura ambiente, sendo uma temperatura intermédia na

gama de temperaturas ótimas de crescimento dos microrganismos testados, uma vez que estão em associação, pode ser a justificção pelo favorecimento desta condição à formação de biofilme.

Analisando os períodos de incubação para as combinações de microrganismos, apesar de existirem alguns valores elevados na leitura de absorvância, como nas 24 h da combinação C e D no meio BHI com mucina a 37 °C, e na combinação C no meio BHI a temperatura ambiente, as restantes parecem ter poucas diferenças, sendo a diferença entre os períodos de incubação com um intervalo de valores não muito grande. Procedeu-se ao teste de Kruskal-Wallis para verificar a significância estatística dos resultados. Este teste revelou que os resultados não apresentavam diferenças estatisticamente significativas ( $p > 0,05$ ), sendo as médias muito próximas. Para confirmação realizou-se o teste de *a posteriori* de Steel-Dwass-Critchlow-Fligner, em que houve a formação de um único grupo, confirmando a ausência de diferenças significativas.

Observando as combinações, verifica-se que a combinação C apresenta valores de leitura de absorvância superiores em três das quatro condições testadas, no entanto a diferença para as restantes combinações não é muito elevada. No geral, os valores das quatro combinações são próximos nas quatro condições analisadas. Para confirmar se estes valores teriam diferenças consideráveis procedeu-se ao teste de Kruskal-Wallis, em que revelou que não existiam diferenças significativas para a formação de biofilme nas diferentes combinações. O teste de Steel-Dwass-Critchlow-Fligner confirmou o resultado obtido no teste anterior, com a formação de um único grupo. Estes resultados levam-nos a inferir que as associações feitas com microrganismos são estáveis na produção de biofilme, não existindo alterações significativas ao acrescentar microrganismos nas combinações ou microrganismos diferentes. Está descrito na literatura que *Streptococcus* spp. sendo colonizadores primários da microbiota oral, podem permanecer estáveis durante grandes períodos de tempo (Jakubovics, 2015), o que possivelmente pode ser o que acontece aqui, em que podem estabilizar os microrganismos que se associam a eles.

As combinações efetuadas para este estudo, tiveram o intuito de aproximar o teste *in vitro* à realidade, uma vez que os microrganismos da cavidade oral vão estabelecer ligações entre si. No estudo efetuado por Palmer *et al.*, (2003), foi observada a associação entre espécies do género *Streptococcus* e espécies do género *Actinomyces*. Mais tarde, em 2008, o mesmo autor demonstrou que a associação entre diferentes espécies ocorre *in vivo* sendo o primeiro passo para o estabelecimento de uma comunidade. Mais especificamente, neste ensaio foi estudada a co-agregação de *S. oralis* com *S. gordonii*, e a associação destes com *Veillonella* sp. (Chalmers *et al.*, 2008). Um estudo feito por Deng *et al.*, (2009) tinha como objetivo estudar o efeito de *S. mutans* na formação de biofilme por *E. faecalis*. Os resultados obtidos foram que na presença de *S. mutans*, a formação de biofilme por *E. faecalis* iria aumentar. Apesar destes estudos não serem diretamente comparáveis com os resultados obtidos, mostram que estas associações de microrganismos da microbiota oral ocorrem, sendo um fenómeno natural, podendo até influenciar a formação de biofilme.

Observando os gráficos das Figuras 4 e 5, podemos fazer uma comparação entre a formação de biofilme em culturas puras e culturas mistas. No geral, podemos verificar que os valores de absorvância obtidos para as culturas mistas são superiores aos obtidos para culturas puras, na maioria dos casos.

Efetuuou-se o teste de Mann-Whitney para verificar se existiam diferenças estatisticamente significativas entre a formação de biofilme pelas culturas puras e pelas culturas mistas. Rejeitou-se a hipótese nula, ou seja, os dois grupos, puras e mistas não provêm da mesma população. Com estes resultados podemos inferir que existem diferenças na formação de biofilme entre as culturas mistas e as culturas puras, uma vez que pela observação dos gráficos das Figuras 4 e 5 verificamos que os valores das culturas mistas são superiores, pode-se confirmar que os biofilmes existem maioritariamente na natureza em

associações de vários microrganismos diferentes, e não todos da mesma espécie (Cvitkovitch *et al.*, 2003).

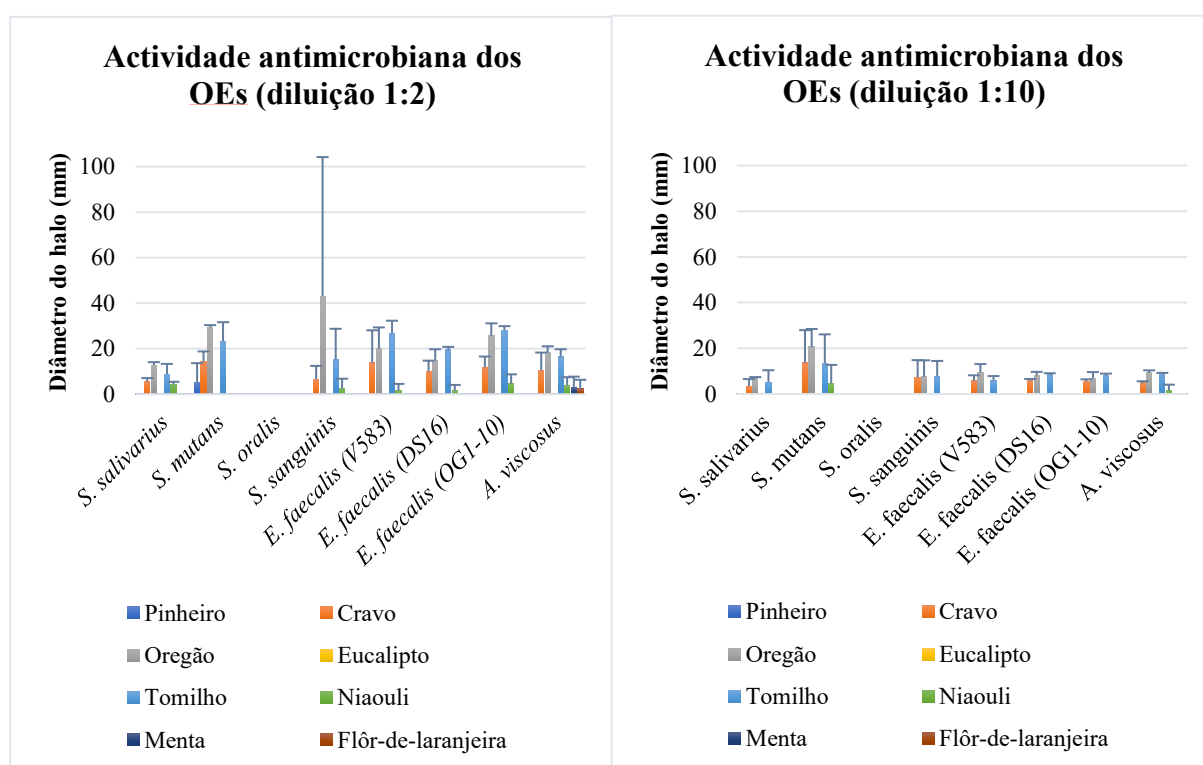
### 3.2. Avaliação da capacidade antimicrobiana dos óleos essenciais

#### 3.2.1. Método de difusão em meio sólido: *screening* inicial

Neste ensaio foram utilizados oito óleos essenciais (cravo, eucalipto, flôr-de-laranjeira, menta, niaouli, oregão, pinheiro, tomilho) em duas diluições diferentes (1:2 e 1:10), e oito microrganismos (*A. viscosus*, DS16, OG1-10, *S. mutans*, *S. oralis*, *S. salivarius*, *S. sanguinis*), através do método da difusão em meio sólido, de acordo com as normas descritas no *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2004).

O método da difusão é o mais usado nos laboratórios para testes de suscetibilidade antimicrobiana. É um método qualitativo, simples e com custos reduzidos, no entanto este teste não distingue se o composto usado tem um efeito bactericida ou bacteriostático (Balouiri *et al.*, 2016).

Para este ensaio foi usada uma temperatura de incubação de 37 °C. Os resultados estão apresentados na Figura 6.



**Figura 6.** Diâmetros dos halos de inibição formados pelos óleos essenciais em estudo.

Neste ensaio não foi possível medir as zonas de inibição em um dos oito óleos em análise, nomeadamente o de eucalipto, uma vez que a sua actividade antimicrobiana não foi suficiente para inibir os microrganismos em estudo, não havendo a formação de halos de inibição. No óleo essencial de flôr-de-laranjeira, menta e de pinheiro foi apenas possível medir o diâmetro do halo de inibição num dos microrganismos em estudo, *A. viscosus* e *S. mutans* respetivamente, e os halos medidos foram abaixo

dos 10 mm, muito abaixo dos restantes. O óleo essencial de niaouli mostrou alguma actividade antimicrobiana, conseguindo a formação de halos de inibição em seis dos oito microrganismos em estudo, apesar do diâmetro dos halos de inibição ser sempre abaixo dos 10 mm. Destacam-se três óleos essenciais, o de cravo, o de oregão e o de tomilho, pois formaram halos de inibição em todos os microrganismos em estudo, exceto *S. oralis*, e os diâmetros dos halos de inibição formados foram, no geral, mais elevados, chegando perto dos 30 mm, como se observa no gráfico da Figura 6.

Observaram-se diferenças entre os óleos essenciais analisados como descrito acima, e para comprovar se estes resultados tinham significância procedeu-se à realização do teste de Kruskal-Wallis. Neste teste comprovou-se a significância dos resultados ( $p < 0,05$ ), em que os que não mostraram diferenças entre si foram os de menta, pinheiro, flôr-de-laranjeira e eucalipto, e os de cravo, oregão e tomilho. Já o óleo de niaouli mostrou ser significativamente diferente dos restantes sete óleos essenciais em estudo. Para confirmação destes resultados efetuou-se o teste *a posteriori* de Conover-Iman, onde se confirmou a formação de três grupos distintos, o primeiro, com as médias mais baixas, constituído pelos óleos de eucalipto, flôr-de-laranjeira, menta e pinheiro, o segundo apenas pelo óleo essencial de niaouli, e o terceiro, com as médias mais altas, pelos óleos de cravo, oregão e tomilho. Pode-se então inferir que os três óleos essenciais que se destacaram, de cravo, de oregão e de tomilho, são os que apresentam uma actividade antimicrobiana mais relevante. Estes resultados estão de acordo com o que já se encontra descrito na literatura sobre estes óleos e as suas promissoras actividades antimicrobianas (Ahmad *et al.*, 2014; Raut e Karuppayil, 2014; Rodriguez-Garcia *et al.*, 2016). Estudos anteriores que relatam a ação destes óleos essenciais, principalmente em bactérias Gram-positivas, confirmam a presença ou ausência de atividade. O OE tomilho, o OE oregão e o OE cravo, quando testados noutras bactérias (todas Gram-positivas) foram sempre classificados como os que tinham um efeito antimicrobiano mais potente, pois nas condições testadas tinham efeito inibitório que permitia a formação de halos com maior diâmetro (Borş *et al.*, 2013; Da Silva e De Martinis, 2013; Iturriaga *et al.*, 2012; Mazzarrino *et al.*, 2015; Millezi *et al.*, 2012; Sharma *et al.*, 2014), como aconteceu no presente estudo. Quanto aos restantes óleos essenciais testados, o OE de eucalipto confirmou a sua falta de actividade antimicrobiana, não conseguindo inibir as espécies em estudo (Sharma *et al.*, 2014). O OE de pinheiro, em estudos anteriores foi classificado como tendo uma actividade antimicrobiana muito fraca (Maruzzellat e Lichtensteint, 1956), enquanto no presente estudo não apresentou qualquer atividade, o que pode ser justificado pela composição dos óleos essenciais testados poder ser ligeiramente diferente para gerar esta alteração, ou as bactérias testadas apresentarem ligeiras diferenças no local de atuação deste composto. O OE de menta e de niaouli, apresentaram fraca atividade antimicrobiana, inibindo com limitações os microrganismos (Brigitte, 2016; Chabernat, 2017), como ocorre neste estudo. O OE de flôr-de-laranjeira, foi considerado por vários investigadores moderadamente ativo, apresentando alguma atividade antimicrobiana (Santos *et al.*, 2016), no entanto, não foi observada actividade no presente estudo, uma vez que apenas inibiu um dos microrganismos em análise.

Neste ensaio verificou-se o efeito do OE e respetiva concentração em diferentes microrganismos, futuramente outros fatores poderão ser estudados com capacidade de afetar a actividade antimicrobiana dos óleos essenciais, como, o tempo de exposição, o pH e a disponibilidade de oxigénio (Seow *et al.*, 2014).

Observando os microrganismos em estudo, pode verificar-se diferentes sensibilidades aos óleos essenciais testados. No geral, quase todos foram inibidos pelos óleos essenciais em estudo, com exceção *A. viscosus* que foi inibido por seis óleos essenciais, indicando talvez uma maior sensibilidade a estes compostos, e *S. oralis* que não apresentou inibição, mas neste caso, justificado pelo insuficiente crescimento deste microrganismo, na maioria dos ensaios. Aplicou-se o teste de Kruskal-Wallis e verificou-se que não houve diferença estatística significativa para dizer que pertencem a populações

completamente diferentes ( $p < 0,05$ ). Efetuou-se o teste de Steel-Dwass-Critchlow-Fligner *a posteriori*, e verificou-se que não existiam diferenças, havendo a formação de um só grupo. A ausência de diferenças significativas entre os microrganismos pode-se justificar pelo facto de serem todos Gram-positivos, tendo assim uma estrutura semelhante na zona de atuação dos óleos essenciais, uma vez que não apresentam membrana externa, os compostos hidrofóbicos dos óleos essenciais podem-se ligar diretamente à bicamada fosfolipídica da membrana celular e aumentar a permeabilidade iónica ou aumentar as fugas de constituintes intracelulares (Seow *et al.*, 2014).

Comparando as duas diluições (Figura 6), podemos observar que na diluição 1:10, os diâmetros dos halos de inibição formados diminuem, com exceção do *S. mutans* em que os resultados permanecem muito próximos, podendo indicar que este é mais sensível, uma vez que são produzidos halos com o mesmo diâmetro nas duas diluições. Aplicou-se o teste de Kruskal-Wallis e o teste *a posteriori* de Steel-Dwass-Critchlow-Fligner, tendo-se verificado a ausência de diferenças estatisticamente significativas entre os resultados das diluições, o que faz sentido, uma vez que é utilizada uma diluição menor, a inibição dos microrganismos também vai ser menor, ocorrendo uma diminuição do diâmetro dos halos de inibição formados.

### 3.2.1. Método da microdiluição: Determinação das concentrações mínimas inibitórias (CMI), concentrações mínimas bactericidas (CMB) e concentrações mínimas inibitórias de biofilme (CMIB). Determinação da concentração mínima de erradicação do biofilme (CMEB)

O método da microdiluição é muito utilizado para testes de suscetibilidade. O facto de requerer pequenos volumes de reagentes e a sua reprodutibilidade constituem as vantagens de utilização deste método.

Para este ensaio foi escolhida a temperatura de incubação de 37 °C e o meio BHI suplementado com mucina, por serem as condições mais semelhantes às existentes na cavidade oral e de acordo com os resultados anteriores (Faran Ali e Tanwir, 2012), foi também estabelecido o período de incubação de 48 h, pois segundo Wilson *et al* (2014), este é o tempo suficiente para os microrganismos estabelecerem biofilme quantificável.

Observando a Tabela 3, é possível verificar que foi possível determinar as CMIs, CMBs, CMIBs e CMEBs para os três óleos essenciais em estudo (cravo, oregão e tomilho) e para as quatro combinações de microrganismos (A, B, C e D).

**Tabela 3.** Resultados das CMIs, CMBs, CMIBs e CMEBs para os três óleos essenciais em estudo em culturas mistas

Culturas mistas	OE Tomilho				OE Oregão				OE Cravo			
	CMI	CMB	CMIB	CMEB	CMI	CMB	CMIB	CMEB	CMI	CMB	CMIB	CMEB
Combinação A	7,19	8,98	12,58	45,16	7,76	9,48	18,76	58,65	30,08	41,78	37,6	322,12
Combinação B	5,24	7,19	20,13	27,11	7,76	9,77	14,84	112,88	36,97	42,62	40,11	481,3
Combinação C	11,58	16,17	28,75	21,87	12,8	15,96	22,69	46,37	55,15	45,12	51,14	360,98
Combinação D	5,19	9,58	22,16	107,04	6,59	8,38	27,93	57,01	45,122	46,79	42,11	327,04

Legenda:

Combinação A: *Streptococcus mutans* + *S. oralis* + *S. sanguinis* + *S. salivarius*;

Combinação B: *Streptococcus mutans* + *S.oralis* + *S.sanguinis* + *S. salivarius* + *Actinomyces viscosus*;

Combinação C: *Streptococcus mutans* + *S.oralis* + *S. sanguinis* + *S. salivarius* + *Enterococcus faecalis* (OG1-10);

Combinação D: *Streptococcus mutans* + *S.oralis* + *S. sanguinis* + *S. salivarius* + *Actinomyces viscosus* + *Enterococcus faecalis* (OG1-10, DS16 e V583).

Os valores das concentrações estão representados em  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ .

Comparando as CMI's dos três OEs observou-se que o OE tomilho teve um efeito inibitório mais eficaz que o OE oregão e o OE cravo, sendo necessárias concentrações inferiores ( $5,19 - 11,58 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ ). No caso do OE tomilho, foram obtidas CMI's semelhantes para B ( $5,24 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) e para D ( $5,19 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ ), C foi a que necessitou uma concentração mais alta de  $11,58 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ , enquanto que A necessitou de uma concentração de  $7,19 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ . Para o OE oregão, as CMI's variaram entre  $6,59 - 12,8 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ , sendo o menor valor registado o de D ( $6,59 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ ). No OE cravo as CMI's foram valores mais elevados que os OEs anteriores, em que variaram entre  $30,08 - 55,15 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ , sendo que o valor menor pertence a A.

Para verificar se existiam diferenças estatisticamente significativas entre os três óleos essenciais, efetuou-se o teste de Kruskal-Wallis. Este teste confirmou que existiam diferenças ( $p < 0,05$ ) entre o OE cravo e os restantes, OE tomilho e OE oregão. Realizou-se *a posteriori* o teste de Conover-Iman, existindo a formação de dois grupos, o primeiro constituído pelo OE oregão e o OE tomilho, e o segundo apenas pelo OE cravo. Estes resultados levam-nos a inferir que o efeito inibitório do OE tomilho e do OE oregão sejam semelhantes, isto é justificado pelo facto de os seus componentes maioritários sejam os mesmos, o timol e o carvacrol (Ahmad *et al.*, 2014; Azizi, 2010), o que faz com que a sua acção seja muito idêntica. Pode-se ainda observar que o OE cravo tenha um efeito inibitório mais fraco, uma vez que a sua média é maior, ou seja, necessita de concentrações superiores para inibir os microrganismos, não compartilhando os mesmos componentes maioritários que o OE oregão e o OE tomilho, o que poderá ser o motivo da sua fraca actividade quando comparada com os restantes.

Os trabalhos abaixo mencionados permitiram comparar e comprovar a eficácia dos óleos essenciais utilizados neste estudo.

Stojković *et al.* (2013) estudaram a actividade antimicrobiana dos óleos essenciais de tomilho e oregão em *Staphylococcus aureus* através do método da microdiluição. Foram obtidas CMI's muito baixas, de  $1 \mu\text{g}/\text{mL}$  para o OE de tomilho e  $0,5 \mu\text{g}/\text{mL}$  para o OE de oregão. Em 2015, Stefanovic *et al.*, (2015) estudaram o efeito dos mesmos óleos essenciais em *Bacillus cereus* obtendo uma CMI de  $320 \mu\text{g}/\text{mL}$  para o OE tomilho e  $160 \mu\text{g}/\text{mL}$  para OE oregão. O efeito inibitório do óleo essencial de cravo foi mais estudado para *E. faecalis* obtendo CMI's de  $0,16 \text{ mg}/\text{mL}$  (Razak *et al.*, 2014) e  $0,0625 \mu\text{g}/\text{mL}$  (Kaur *et al.*, 2014). Em *Streptococcus mutans* e *S. sanguinis* apresentou CMI's de  $0,2$  e  $0,4 \text{ mg}/\text{mL}$  respetivamente (Razak *et al.*, 2014). Em todos os estudos foi verificada a eficiência dos três óleos essenciais na inibição do crescimento antimicrobiano, conseguindo inibir os microrganismos em estudo e com concentrações relativamente baixas.

Em relação a determinação das CMB's verificou-se que o OE tomilho e o OE oregão mostraram um efeito bactericida maior que o OE cravo, uma vez que as suas CMB's variaram entre  $7,19 - 16,17 \mu\text{g}/\mu\text{L}$  para o OE tomilho, entre  $8,38 - 15,96 \mu\text{g}/\mu\text{L}$  para o OE oregão e para o OE cravo variaram entre  $41,78 - 46,79 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ . Para o OE tomilho, o menor valor registado pertence à combinação B ( $7,19 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ ), para OE oregão pertence à combinação D ( $8,38 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) e para o OE cravo pertence à combinação A ( $41,78 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ ).

Efetuiu-se o teste de Kruskal-Wallis em que se verificou que existiam diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) quando comparados os três óleos essenciais. Mais especificamente existiam

diferenças quando comparado o OE cravo com o OE tomilho e o OE oregão, mas estas não existiam quando comparados os OE tomilho e OE oregão. Realizou-se ainda o teste de Conover-Iman que revelou a formação de dois grupos distintos, o primeiro composto pelo OE tomilho e o OE oregão, enquanto o segundo é apenas constituído pelo OE cravo, o que vem comprovar os resultados do teste anterior. Com estes resultados podemos assim inferir que OE tomilho e o OE oregão têm uma actividade antimicrobiana semelhante, diferenciando-se da actividade do OE cravo que parece ser mais fraca, uma vez que os valores da CMB obtidos são mais elevados.

Em estudos anteriores, a actividade bactericida dos óleos essenciais estudados foi testada em bactérias pertencentes à microbiota oral. Para *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus* foi obtida uma CMB de 1280 e 2560 µg/mL para OE tomilho, respetivamente, e de 2560 e 1280 µg/mL para OE oregão (Stefanovic *et al.*, 2015). O OE de cravo demonstrou uma atividade bactericida forte contra algumas bactérias orais, apresentado uma CMB de 0,8 mg/mL para *Streptococcus mutans* e *S. sanguinis* (Moon *et al.*, 2011). Estes estudos apresentaram concentrações muito baixas uma vez que foram na ordem das microgramas ou miligramas por mililitro. Assim, foi comprovada a actividade bactericida dos óleos essenciais em estudo.

Quanto à determinação das CMIBs, observou-se que o OE tomilho e o OE oregão foram mais eficientes no efeito inibitório do biofilme do que o OE de cravo. As concentrações dos dois primeiros OEs variaram entre 12,58 – 28,75 µg/µL no OE tomilho, entre 14,84 – 27,93 µg/µL no OE oregão, e entre 37,6 – 51,14 µg/µL no OE cravo. Para o OE tomilho o menor valor registado foi da combinação A (12,58 µg/µL), para o OE oregão foi o da combinação B (14,84 µg/µL), e para o OE cravo foi o da combinação A (37,60 µg/µL).

Realizou-se o teste de Kruskal-Wallis para verificar se existiriam diferenças estatisticamente significativas. Observou-se que existiam diferenças entre os três óleos essenciais, sendo as três médias afastadas, a mais alta seria a de OE cravo, seguida pela do OE tomilho, e a mais baixa, a do OE oregão. Observando estes valores das médias pode-se inferir que o OE cravo, neste ensaio, é o que tem o efeito inibitório de formação de biofilme mais fraco, enquanto que o que tem o efeito inibitório mais forte será o de OE oregão. Procedeu-se a um segundo teste estatístico, teste de Conover-Iman, que confirmou estas diferenças levando a formação de três grupos, cada um constituído por cada um dos óleos essenciais em estudo.

A determinação da CMIB não é muito utilizada, sendo mais usual a determinação da CMI e da CMB. No entanto, foi possível encontrar alguns trabalhos que fizessem referência a esta concentração. Nostro *et al.*, (2007) mostraram que o OE de oregão conseguia inibir com eficácia o biofilme formado pelo *Staphylococcus epidermis* com concentrações baixas a variar ente 0,125 e 0,500 % (v/v). Em *Streptococcus pyogenes* foi ainda possível obter uma CMIB de 0,5 mg/mL (Wijesundara e Rupasinghe, 2018). A eficácia do OE de cravo na inibição de biofilme de *Staphylococcus aureus* foi demonstrada por Chamdit e Siripermpool, (2012), em que obtiveram concentrações de 3,0-5,0 % (v/v). Estes resultados confirmaram as capacidades inibitórias do óleo essencial de oregão e de cravo contra várias bactérias patogénicas, demonstrando o potencial para a sua aplicação em tratamentos antimicrobianos.

A última concentração que tinha de se determinar era a CMEB, em que se observou que o OE tomilho foi mais eficaz na erradicação de biofilme do que os restantes OEs, uma vez que necessitou de concentrações menores (21,87 – 107,04 µg/µL) do que o OE oregão (46,37 – 112,88 µg/µL) e do que o OE cravo (322,12 – 481,30 µg/µL). No OE tomilho a concentração menor foi obtida pela combinação C (21,87 µg/µL), no OE oregão pela combinação C (46,37 µg/µL) e no OE cravo pela combinação A (322,12 µg/µL).

Após a análise estatística efetuada com base no teste de Kruskal-Wallis, verificou-se que existiam diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ). Observou-se que as médias do OE tomilho e OE oregão eram muito próximas, apesar da do OE tomilho ser menor e a média do OE cravo era muito mais elevada, o que nos leva a inferir que este seja o óleo essencial com o efeito bactericida na formação de biofilme mais fraco, e o efeito do OE tomilho e do OE oregão sejam mais fortes e muito semelhantes. Confirmou-se estes resultados com o teste de Conover-Iman, que confirmou as semelhanças entre o OE tomilho e o OE oregão, agrupando-os, e as diferenças destes para com o OE cravo colocando-o num grupo diferente. O OE oregão e o OE tomilho vão-se agrupar provavelmente por terem na sua constituição os mesmos compostos como o timol e o carvacrol (Ahmad *et al.*, 2014; Azizi, 2010), enquanto que o OE cravo vai pertencer a um grupo diferente pois o seu principal constituinte é o eugenol (Jiang *et al.*, 2010). Estes resultados levam-nos a inferir que o OE tomilho e o OE oregão terão em comum algum composto que seja responsável pelo seu efeito bactericida mais eficaz, não estando presente no OE cravo pois este demonstra um efeito mais fraco.

Em trabalhos anteriores foi estudada a CMEB do OE de oregão para *Staphylococcus epidermis* e para *Streptococcus pyogenes* sendo obtida a concentração de 0,25-1 % (v/v) (Nostro *et al.*, 2007) e 0,5 mg/mL (Wijesundara e Rupasinghe, 2018), respetivamente. O óleo essencial de tomilho também mostrou o seu efeito bactericida ao reduzir o biofilme em 2,0 log UFC/peg, em *Listeria monocytogenes* (Sadekuzzaman *et al.*, 2018). Em *Staphylococcus aureus* foi também testado o óleo essencial de cravo, em que se obteve uma CMEB entre 4,0 e >5,0 % (v/v) (Chamdit e Siripermpool, 2012). Estes estudos permitiram confirmar que os três óleos essenciais em estudo têm capacidade de inibir biofilme, não só em bactérias da microbiota oral, mas também noutras como *S. aureus* que é responsável por várias doenças.

Para os resultados das CMI, CMB, CMIB e CMEB realizaram-se os mesmos testes estatísticos, o de Kruskal-Wallis, e *a posteriori* o de Stell-Dwass-Critchlow-Fligner, para comparar as quatro combinações. Observou-se que entre elas não existiam diferenças estatisticamente significativas ( $p > 0,05$ ), e pelo teste *a posteriori* houve apenas a formação de um grupo, o que vem reforçar a ausência de diferenças estatisticamente significativas. Estes resultados levam-nos a inferir que as combinações não têm influência nos resultados das concentrações inibitórias e bactericidas dos óleos essenciais em estudo.

Ao longo dos resultados obtidos, podemos verificar que os óleos essenciais de oregão e tomilho vão tendo comportamentos semelhantes na sua actividade antimicrobiana. O motivo para tal acontecer pode ser justificado pela sua constituição. O óleo essencial de tomilho é constituído principalmente por timol e carvacrol (Ahmad *et al.*, 2014), assim como o óleo essencial de oregão (Azizi, 2010), como são compostos equivalentes, provavelmente vão atuar no mesmo alvo da célula bacteriana. No entanto, a sua resposta não é totalmente igual podendo dever-se aos óleos essenciais possuírem percentagens diferentes destes compostos, ou devido à ação sinérgica com outros constituintes que os compõem. No entanto, o óleo essencial de cravo não contém nenhum destes componentes (Silvestri *et al.*, 2010), sendo possivelmente uma das justificações pela sua fraca actividade comparada com os restantes.

### 3.3. Escova de dentes: Modelo de estudo

Neste trabalho, procedemos ao estudo da microbiota oral e de como esta poderá ser inibida ou eliminada através do uso de compostos naturais como os óleos essenciais. Para aproximar este estudo da realidade, houve a necessidade de fazer um modelo de estudo, neste caso, o escolhido foi o modelo de estudo da



escova de dentes. Como não é pratico utilizar escovas de dentes reais, tentou-se mimetizar as fibras que constituem a escova em si utilizando fios de *nylon*.

**Tabela 4.** Resultados das CMI, CMB e CMIBs para os três óleos essenciais em estudo em culturas mistas no modelo da escova de dentes.

Culturas mistas	OE Tomilho				OE Oregão				OE Cravo			
	CMI	CMB	CMIB nylon	CMIB base	CMI	CMB	CMIB nylon	CMIB base	CMI	CMB	CMIB nylon	CMIB base
A	15,28	-	1,96	1,96	12,42	-	10,31	8,27	-	62,84	11,33	11,41
B	11,35	-	1,96	1,96	14,00	-	6,55	8,27	-	62,84	8,59	-
C	14,85	15,71	1,96	1,96	15,42	15,71	6,06	11,91	-	62,84	16,5	56,92
D	10,93	-	1,96	7,86	15,42	-	6,55	15,71	-	31,42	18,69	62,84

Legenda:

Combinação A: *Streptococcus mutans* + *S. oralis* + *S. sanguinis* + *S. salivarius*;

Combinação B: *Streptococcus mutans* + *S.oralis* + *S.sanguinis* + *S. salivarius* + *Actinomyces viscosus*;

Combinação C: *Streptococcus mutans* + *S.oralis* + *S. sanguinis* + *S. salivarius* + *Enterococcus faecalis* (OG1-10);

Combinação D: *Streptococcus mutans* + *S.oralis* + *S. sanguinis* + *S. salivarius* + *Actinomyces viscosus* + *Enterococcus faecalis* (OG1-10, DS16 e V583).

Os valores das concentrações estão representados em  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ .

Observando a Tabela 4, verifica-se que foi possível determinar a CMI para o OE tomilho e o OE oregão, pelo contrário não foi possível para o OE cravo, uma vez que houve corrosão nos poços de maior concentração, todos os poços aparentavam estar turvos, não sendo possível determinar a CMI. Comparando as CMIs do OE tomilho e do OE oregão, pode-se dizer que o OE tomilho (10,93 – 15,28  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) tem um efeito inibitório mais eficaz, mas muito semelhante ao OE oregão (12,42 – 15,42  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ). A combinação que necessitou de uma concentração mais elevada de OE, no caso do tomilho foi a combinação A (15,28  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ), no caso do oregão foi a combinação C e D (15,42  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ). Pelo contrário, as combinações que necessitaram de uma concentração menor no caso do tomilho foi a combinação D, e no caso do oregão foi a combinação A. Como não foi possível determinar a CMI leva-nos a inferir que este óleo será aquele com o menor efeito inibitório, uma vez que serão necessárias concentrações mais elevadas, no entanto, é possível que a impossibilidade da determinação da CMI se pudesse dever à corrosão existente nos poços de maior concentração da microplaca (interação entre o OE e o polistireno da microplaca).

Para verificar se existiam diferenças estatisticamente significativas entre os três óleos essenciais, efetuou-se o teste de Kruskal-Wallis. Este teste confirmou que existiam diferenças ( $p < 0,05$ ) entre o OE cravo e os restantes, OE tomilho e OE oregão. Realizou-se *a posteriori* o teste de Conover-Iman, existindo a formação de dois grupos, o primeiro constituído por OE oregão e OE tomilho, e o segundo apenas pelo OE cravo. Estes resultados levam-nos a inferir que o efeito inibitório do OE tomilho e do OE oregão sejam semelhantes e mais eficazes do que o OE cravo, uma vez que necessitam de concentrações inferiores. Pode-se ainda observar que o OE cravo tem um efeito inibitório mais fraco, uma vez que a sua média foi superior, ou seja, necessita de concentrações mais elevadas para inibir os microrganismos em estudo.

Observando as colunas referentes à CMB da Tabela 4, verifica-se que foi possível determinar este valor para todas as combinações utilizando o OE cravo e apenas foi possível determinar para a combinação C utilizando o OE oregão e o OE tomilho. Comparando os valores de CMB obtidos, verifica-se que apesar

de o valor obtido para OE tomilho e OE oregão ser inferior (15,71  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) aos obtidos para OE cravo (31,42 – 62,84  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ), o OE cravo foi mais eficaz, isto porque não foi possível determinar CMB para as restantes combinações para OE oregão e OE tomilho, ou seja, são necessárias concentrações maiores do que as testadas. Para verificar a existência de diferenças estatisticamente significativas, efetuou-se o teste de Kruskal-Wallis. Verificou-se que existiam diferenças entre os três óleos essenciais ( $p < 0,05$ ). Para confirmar estes resultados efetuou-se o teste *a posteriori* de Conover-Iman, em que se verificou estas diferenças, existindo a formação de três grupos distintos constituídos por cada um dos óleos essenciais. Observando a Tabela 4, a separação do OE tomilho e o OE oregão não faz sentido, uma vez que o valor da concentração obtida é o mesmo e para a mesma combinação (combinação C), por isso a possível justificação para esta divisão do OE oregão e do OE tomilho é a utilização das suas concentrações iniciais para os testes estatísticos quando não foi possível determinar as CMBs, 455,7  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  e 447,8  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ . Como são concentrações diferentes, resulta na separação destes dois óleos essenciais em grupos distintos.

Quanto à determinação da CMIB, foi importante determiná-la tanto nas fibras de *nylon* como na base, uma vez que a produção de biofilme ocorreu nas duas superfícies.

Foi possível determinar as CMIBs do fio de *nylon* para os três óleos essenciais e para as quatro combinações de microrganismos em estudo. Comparando as CMIBs dos três óleos essenciais, pode-se observar que o OE tomilho tem um efeito inibitório de formação de biofilme mais eficaz que os restantes, uma vez que foram necessárias concentrações mais baixas (1,96  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ). Olhando para o OE oregão, as concentrações variaram entre 6,06 – 10,31  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , sendo o valor mais baixo pertencente à combinação C, e o mais alto à combinação A. Quanto ao OE cravo, as concentrações variaram entre 8,59 – 18,69  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , sendo o valor mais baixo pertencente à combinação B e o mais alto à D. Após a realização do teste de Kruskal-Wallis, verificou-se a existência de diferenças significativas entre o OE oregão e o OE cravo, mas não entre estes e o OE tomilho. Realizou-se o teste de Conover-Iman em que se confirmaram as diferenças entre OE oregão e OE cravo, mas não destes dois OEs com o OE tomilho. A formação de grupos resultou em dois, um constituído pelo OE oregão e o outro pelo OE cravo, com o OE tomilho a pertencer a ambos. Apesar de o OE tomilho ter sido considerado como o mais eficaz na inibição de biofilme, neste estudo, por serem necessárias concentrações mais baixas do que os restantes OEs em estudo, o agrupamento deste com o OE oregão, cujas concentrações necessárias para a inibição de biofilme foram mais elevadas, é normal, uma vez que estes são os que apresentam os valores mais próximos. Quanto ao agrupamento do OE tomilho com o OE cravo, não corresponde ao que é observado, uma vez que o OE tomilho é considerado como o mais eficaz e o OE cravo é classificado como o menos eficaz. Isto pode ser explicado devido ao facto de serem testes estatísticos que vão arrumar as observações em rankings, substituindo o menor número por 1 e o maior por n (Nahm, 2016). Neste caso, para efetuar os testes estatísticos, nas observações em que não era possível determinar a CMIB atribuiu-se o valor da concentração máxima. No OE de cravo, foi possível determinar num maior número de observações a CMIB do que nos restantes OEs. Assim, a média obtida através do ranking para o OE cravo foi a menor, seguida pelo OE tomilho e a maior foi a do OE oregão. Com base nestas médias, o OE tomilho aproximou-se dos restantes OEs, sendo inserido em ambos os grupos.

Observando os valores da CMIB da base da microplaca, conseguiu-se determinar esta concentração para todos os óleos essenciais e para as quatro combinações, com exceção a combinação B no OE cravo. Com base na Tabela 4, verificamos que mais uma vez o OE tomilho foi mais eficaz na inibição da formação de biofilme na base da microplaca, uma vez que necessitou de concentrações mais baixas em comparação aos restantes óleos essenciais em estudo (1,96 – 7,86  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ), sendo a concentração mais alta pertencente à combinação D. Quanto aos restantes óleos, o de oregão variou entre 8,27 – 15,71  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , sendo o valor mais alto pertencente à combinação D, e o mais baixo à A e B. O de cravo variou

entre 11,41 – 62,84 µg/µL, sendo a concentração mais alta pertencente à combinação D, e a mais baixa à A. Com base no teste de Kruskal-Wallis, pode-se afirmar que existem diferenças estatisticamente significativas entre os valores das concentrações dos diferentes óleos essenciais ( $p < 0,05$ ). O teste de Conover- Iman veio confirmar estes resultados, e fez três grupos diferentes, em que cada um deles era constituído por um dos óleos essenciais em estudo.

Estes resultados levam-nos a inferir que, neste estudo, os óleos essenciais de tomilho e oregão têm um efeito mais eficaz na inibição tanto de células planctónicas como na formação de biofilme, enquanto que o óleo de cravo terá um efeito bactericida mais promissor. Estes resultados podem estar relacionados com a composição dos óleos essenciais, uma vez que o OE tomilho e OE oregão, tendo componentes semelhantes, têm comportamentos equivalentes, enquanto que o OE cravo, não tendo componentes em comum com os restantes óleos vai ter um comportamento diferente.

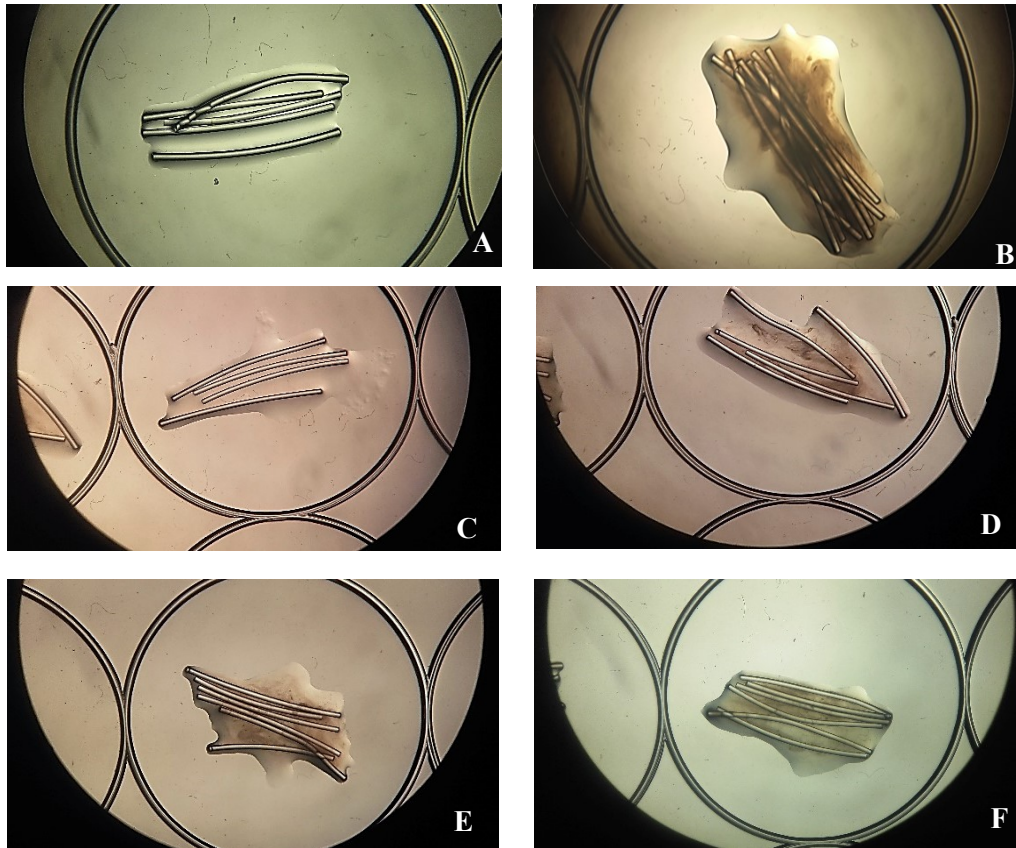
Os biofilmes têm a particularidade de serem até 1000 vezes mais resistentes do que as células planctónicas aos antibióticos (Chmit *et al.*, 2014), tal facto não foi verificado, uma vez que foram obtidos valores mais baixos de concentração de composto antimicrobiano para a inibição de biofilme do que de células planctónicas, para todas as combinações e para os três OEs, como pode observar-se na Tabela 4. Estes resultados podem estar relacionados com a composição dos óleos essenciais, mostrando que são compostos com uma elevada actividade antimicrobiana, com um potencial que pode ser aproveitado para vários fins, entre os quais a substituição das terapêuticas antimicrobianas tradicionais.

Comparando com outros estudos feitos, do efeito destes óleos essenciais sobre bactérias da microbiota oral, estes vêm confirmar a actividade antimicrobiana dos óleos testados, mesmo no contexto real.

O OE de cravo é comumente usado por dentistas, uma vez que demonstra actividade antimicrobiana contra as bactérias da microbiota oral que provocam cáries e outras doenças orais (Cai e Wu, 1996). Vários estudos prévios demonstraram a sua actividade em bactérias da microbiota oral, como Aznita *et al.*, (2009), que estudaram o efeito do óleo essencial de cravo em bactérias como *Streptococcus* sp., *Lactobacillus* sp. e *Staphylococcus* sp., no qual observaram que o OE cravo reduzia drasticamente a população da placa dentária após o contacto (Aznita *et al.*, 2009). Os extratos de cravo mais utilizados são da planta *Syzygium aromaticum*, em que este demonstrou uma maior actividade antimicrobiana contra microrganismos causadores de doença periodontal como *Prevotella intermedia* e *Porphyromonas gingivalis* (Cai e Wu, 1996). Noutro estudo, foi testada a ação apenas dos compostos timol e eugenol, o timol conhecido por ser um componente do óleo essencial de oregão e de tomilho, e o eugenol do óleo essencial de cravo. Aqui foi estudada a ação destes óleos essenciais na microbiota oral, em que os resultados revelaram reduções na formação de placa dentária, na formação de placa supragengival e redução da gengivite (Kraivaphan e Amornchat, 2012). Outro estudo teve em conta a ação do tomilho numa bactéria da microbiota oral, *Streptococcus mutans*, cujos resultados demonstraram uma redução significativa das contagens (Timimi e Casey, 2012). Ciandrini *et al.*, (2014) estudaram o efeito do carvacrol, um composto pertencente ao óleo essencial de tomilho e de oregão, em algumas bactérias causadoras de doença oral como *Streptococcus mutans*, *Porphyromonas gingivalis* e *Fusobacterium nucleatum*. Este composto, demonstrou actividade inibitória contra os organismos testados e a propriedade de inibir a formação de biofilme.

Para os resultados das CMIs, CMBs e CMIBs realizaram-se os mesmos testes estatísticos, o de Kruskal-Wallis, e *a posteriori* o de Stell-Dwass-Critchlow-Fligner, para comparar as quatro combinações. Observou-se que entre elas não existiam diferenças estatisticamente significativas ( $p > 0,05$ ), e pelo teste *a posteriori* houve apenas a formação de um grupo, o que vem reforçar a ausência de diferenças estatisticamente significativas. Estes resultados levam-nos a inferir que as combinações não têm influência nos resultados das concentrações inibitórias e bactericidas dos óleos essenciais em estudo.

Apesar dos dados da Tabela 4, após a visualização à lupa (Figura 7), a maioria das fibras nas concentrações superiores de óleo essencial não apresentavam biofilme em volta delas, como podemos ver nas imagens da Figura 7. Esta observação é curiosa, uma vez que isto apenas acontece nas concentrações mais elevadas de óleo essencial. À medida que esta concentração vai diminuindo, observa-se o aparecimento de biofilme em volta das fibras, o que nos leva a inferir que pode estar relacionado com os óleos essenciais. Anteriormente, neste trabalho foi comprovada a capacidade antimicrobiana dos óleos essenciais, o que pode ser uma justificação para o que ocorreu.



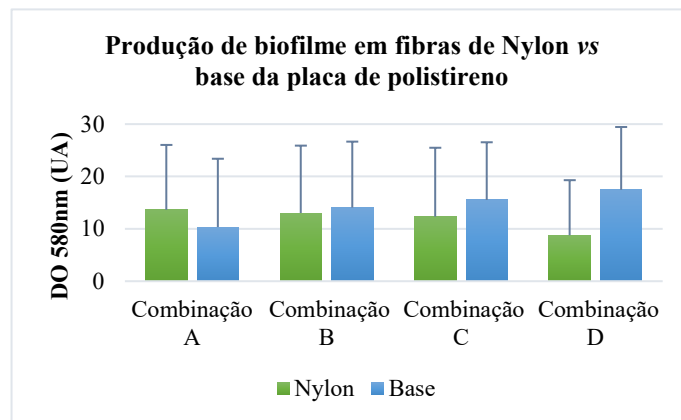
**Figura 7.** Formação de biofilme em fibras de nylon, quando em contacto com diferentes concentrações do óleo essencial de oregão (Observação à lupa, ampliação 10x). A- Controlo negativo; B- Controlo positivo; C- Poço 2 (maior concentração de óleo essencial); D- poço 3; E- Poço 4; F- Poço 5 (Menor concentração de óleo essencial).

Para comparação, efetuou-se ainda o mesmo ensaio com um elixir bucal, em que se verificou que só havia inibição da formação do biofilme na concentração comercialmente distribuída (elixir puro).

Com estes resultados, podemos inferir que os óleos essenciais são uma boa alternativa aos desinfetantes e outros agentes antimicrobianos usados até agora. Estes demonstraram ter actividade antimicrobiana contra os microrganismos testados e em concentrações mínimas, ao contrário do elixir que apenas na sua forma pura demonstrou esta actividade. Mostraram ainda inibir a formação de biofilme em torno das fibras de *nylon*.

Neste modelo, avaliou-se também a produção de biofilme nas duas superfícies em estudo, as fibras de *nylon* e a base da microplaca de poliestireno. Como podemos observar no gráfico da Figura 8, a produção de biofilme vai ocorrer de forma muito equiparada nas duas superfícies. Efetuou-se o teste estatístico de Kruskal-Wallis e à *posteriori* o teste de Steel-Dwass-Critchlow-Fligner, e verificou-se que não existiam

diferenças estatisticamente significativas na produção de biofilme nas duas superfícies distintas ( $p < 0,05$ ), ocorrendo a formação de um único grupo.



**Figura 8.** Formação de biofilme na base da placa de polistireno e nas fibras de *nylon*. O limite de leitura do aparelho são 4 UA.

Estes resultados fazem sentido, uma vez que estas superfícies são inoculadas com a mesma quantidade de inóculo e meio, e são incubadas à mesma temperatura, logo a produção de biofilme em ambas vai ser bastante semelhante. Podíamos pensar que pelo facto de as fibras ocuparem a base da placa que iria ocorrer maior produção nestas, mas tal não acontece, pois existe sempre espaço entre as fibras, e até mesmo estas contactam com a base, ocorrendo assim produção de biofilme semelhante.

## 4. Conclusões

O presente estudo teve como principais objetivos a avaliação da capacidade de formação de biofilme por culturas puras e culturas mistas de microrganismos presentes na microbiota oral, a avaliação da actividade antimicrobiana de óleos essenciais e o último objetivo foi o estudo de um modelo que representasse uma escova-de-dentes contaminada com microrganismos, neste caso foram inoculadas fibras de *nylon* com as bactérias orais utilizadas no presente trabalho. Neste último objetivo estavam englobados a avaliação da formação de biofilme em culturas mistas e a avaliação da actividade antimicrobiana dos três óleos essenciais em estudo.

- Inicialmente foi analisada a capacidade de formação de biofilme de vários microrganismos em meio sólido com o corante Vermelho do Congo. Podemos concluir que a temperatura influencia a formação de biofilme, não ocorrendo em microrganismos habitualmente classificados como produtores de biofilme. A temperatura de 37 °C favorece a formação de biofilme. No entanto, nos resultados obtiveram-se algumas incongruências com o descrito na literatura dando ênfase às desvantagens desta técnica, como a sua falta de precisão. Assim, os resultados não podem ser conclusivos.
- A formação de biofilme avaliada pela capacidade de produção de biofilme em microplaca de polistireno, foi favorecida pelo meio suplementado com mucina à temperatura ambiente, tanto em culturas puras como culturas mistas, concluindo-se que a temperatura e a composição do meio têm uma influência conjunta na formação de biofilme
- Nas culturas puras, observou-se que no período de incubação de 72 h ocorre maior formação de biofilme. Quanto aos microrganismos, vão-se comportar de um modo semelhante dentro de cada género, existindo outras semelhanças intergenéricas talvez devido às condições de crescimento serem semelhantes.
- Nas culturas mistas, o período de incubação e as diferentes combinações de microrganismos não têm influência na formação de biofilme, relativamente às culturas puras.
- Da comparação entre as culturas puras e as culturas mistas, podemos dizer que há maior formação de biofilme nas culturas mistas do que nas puras, o que nos leva a concluir que é mais provável os biofilmes formarem-se na natureza por associações de vários microrganismos diferentes, e não pertencentes à mesma espécie.
- Os óleos essenciais que se destacam com maior actividade antimicrobiana são o óleo essencial de cravo, de oregão e de tomilho.
- Os óleos essenciais de tomilho e oregão têm efeitos semelhantes na inibição e erradicação de células planctónicas, e na erradicação de biofilme dos microrganismos em estudo.
- O óleo essencial de oregão tem um efeito inibitório da formação de biofilme mais eficaz, para os microrganismos em estudo, que os restantes óleos essenciais em estudo.
- O óleo essencial de cravo mostra ser o que tem um efeito mais fraco nos microrganismos em estudo.
- No modelo da escova-de-dentes, os óleos essenciais de tomilho e oregão têm um efeito mais eficaz na inibição tanto de células planctónicas como na formação de biofilme, que é mostrado pela CMI e pela CMIB, respetivamente. Enquanto que o óleo essencial de cravo tem um efeito bactericida mais promissor, mostrando CMBs mais baixas que os restantes óleos em estudo, sendo possível determiná-la para todas as combinações.
- Os óleos essenciais têm alguma influência na formação de biofilme em volta das fibras de *nylon*, uma vez que nas concentrações mais elevadas não se encontrava biofilme em volta delas como nos controlos de crescimento.

- Não há diferenças na formação de biofilme entre a placa de polistireno e as fibras de *nylon*.

No geral, este estudo confirmou a possibilidade da utilização dos óleos essenciais como alternativa aos desinfetantes e agentes antimicrobianos até agora usados na microbiota oral. Demonstrou ainda que estes podem ser uma alternativa aos antibióticos tradicionais, que ao serem menos utilizados vão diminuir o aparecimento de resistências, trazendo também os benefícios de serem produtos mais naturais, menos tóxicos para o humano e para o ambiente.

Como perspectivas futuras, podem ser efetuados mais estudos com vista a entender melhor o mecanismo de acção destes óleos, podendo abrir portas para o fabrico de novos medicamentos. Poder-se-ia efetuar ainda o estudo dos componentes dos óleos essenciais, uma vez que existem óleos que em pequenas concentrações apresentam actividade antimicrobiana promissora em alguns microrganismos. Seria também interessante testar microrganismos diferentes, por exemplo *Staphylococcus aureus* metilina-resistente, *Clostridium difficile* e *Pseudomonas aeruginosa*, uma vez que são causadoras de infeções em ambientes hospitalares. É importante ressaltar que cada vez surgem mais microrganismos com algum tipo de resistência aos agentes antimicrobianos usados diariamente, sendo uma necessidade a procura e o estudo de novas alternativas.

## 5. Referências bibliográficas

- Ahmad, A., Van Vuuren, S., & Viljoen, A. (2014). Unravelling the complex antimicrobial interactions of essential oils - the case of *Thymus vulgaris* (Thyme). *Molecules*, *19*(3), 2896–2910.
- Alam, S., Brailsford, S. R., Adams, S., Allison, C., Sheehy, E., Zoitopoulos, L., ... Beighton, D. (2000). Genotypic heterogeneity of *Streptococcus oralis* and distinct aciduric subpopulations in human dental plaque. *Applied and Environmental Microbiology*, *66*(8), 3330–3336.
- Arciola, C. R., Campoccia, D., Gamberini, S., Cervellati, M., Donati, E., & Montanaro, L. (2002). Detection of slime production by means of an optimised Congo red agar plate test based on a colourimetric scale in *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates genotyped for *ica* locus. *Biomaterials*, *23*(21), 4233–4239.
- Avila, M., Ojcius, D. M., & Yilmaz, Ö. (2009). The Oral Microbiota: Living with a Permanent Guest. *DNA and Cell Biology*, *28*(8), 405–411.
- Azizi, A. (2010). *Genetic, chemical and agro-morphological evaluation of the medicinal plant *Origanum vulgare* L. for marker assisted improvement of pharmaceutical quality. Pharmaceuticals.*
- Aznita, H., & Zainal-Abidin, Z. (2009). The effectiveness of chlorhexidine, hexetidine and *Eugenia caryophyllus* extracts in commercialized oral rinses to reduce dental plaque microbes. *Research Journal of Biological Sciences*.
- Balouiri, M., Sadiki, M., & Ibsouda, S. K. (2016). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, *6*(2), 71–79.
- Balunas, M. J., & Kinghorn, A. D. (2005). Drug discovery from medicinal plants. *Life Sciences*, *78*(5), 431–441.
- Benbelaïd, F., Khadir, A., Abdoune, M. A., Bendahou, M., Muselli, A., & Costa, J. (2014). Antimicrobial activity of some essential oils against oral multidrug-resistant *Enterococcus faecalis* in both planktonic and biofilm state. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, *4*(6), 463–472.
- Borş, M., Tofană, M., Suharoschi, R., & Rotar, A. (2013). A study regarding the antibacterial activity of some commercial essential oils on food-borne pathogenic and spoilage bacteria. *Journal of Agroalimentary Processes and Technologies*, *19*(3), 314–318.
- Bower, A., Marquez, S., & de Mejia, E. G. (2016). The Health Benefits of Selected Culinary Herbs and Spices Found in the Traditional Mediterranean Diet. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *56*(16), 2728–2746.
- Branda, S. S., Vik, Å., Friedman, L., & Kolter, R. (2005). Biofilms: The matrix revisited. *Trends in Microbiology*, *13*(1), 20–26.
- Brigitte, C. (2016). *Eficacia antibacteriana de los aceites esenciales de *Mentha piperita* “menta” y *Rosmarinus officinalis* “romero”, sobre *Staphylococcus aureus*, estudio in vitro.*
- Busatta, C., Mossi, A. J., Rodrigues, M. R. A., Cansian, R. L., & De Oliveira, J. V. (2007). Evaluation of *Origanum vulgare* essential oil as antimicrobial agent in sausage. *Brazilian Journal of Microbiology*, *38*(4), 610–616.
- Byers, H. L., Tarelli, E., Homer, K. A., & Beighton, D. (2000). Isolation and characterisation of sialidase from a strain of *Streptococcus oralis*. *Journal of Medical Microbiology*, *49*(3), 235–244.
- Cai, L., & Wu, C. D. (1996). Compounds from *Syzygium aromaticum* possessing growth inhibitory activity against oral pathogens. *Journal of Natural Products*, *59*(10), 987–990.



- Caparon, M. G., Geist, R. T., Perez-Casal, J., & Scott, J. R. (1992). Environmental regulation of virulence in group A streptococci: transcription of the gene encoding M protein is stimulated by carbon dioxide. *J.Bacteriol.*, *174*(17), 5693–5701.
- Caufield, P. W., Dasanayake, A. P., Li, Y., Pan, Y., Hsu, J., & Hardin, J. M. (2000). Natural history of *Streptococcus sanguinis* in the oral cavity of infants: Evidence for a discrete window of infectivity. *Infection and Immunity*, *68*(7), 4018–4023.
- Ceri, H., Olson, M. E., Stremick, C., Read, R. R., Morck, D., & Buret, A. (1999). The Calgary Biofilm Device : New Technology for Rapid Determination of Antibiotic Susceptibilities of Bacterial Biofilms The Calgary Biofilm Device : New Technology for Rapid Determination of Antibiotic Susceptibilities of Bacterial Biofilms. *Journal of Clinical Microbiology*, *37*(6), 1771.
- Chabernat. (2017). *Potentialité in vitro de 10 huiles essentielles, seules ou en association, dans le traitement des infections bactériennes cutanées. Université de Limoges.*
- Chalmers, N. I., Palmer, R. J., Cisar, J. O., & Kolenbrander, P. E. (2008). Characterization of a *Streptococcus* sp.-*Veillonella* sp. community micromanipulated from dental plaque. *Journal of Bacteriology*, *190*(24), 8145–8154.
- Chalovich, J. M., & Eisenberg, E. (2013). Mucin can enhance growth, biofilm formation and survival of *Streptococcus mutans*. *Magn Reson Imaging*, *31*(3), 477–479.
- Chamdit, S., & Siripermpool, P. (2012). Antimicrobial Effect of Clove and Lemongrass Oils against Planktonic Cells and Biofilms of *Staphylococcus aureus*. *Mahidol University Journal of Pharmaceutical Sciences*, *39*(2), 28–36.
- Charles M.A.P. Franz, Melanie Huch, Hikmate Abriouel, Wilhelm Holzapfel, A. G. (2011). Enterococci as probiotics and their implications in food safety. *International Journal of Food Microbiology*, *151*(2), 125–140.
- Chmit, M., Kanaan, H., Habib, J., Abbass, M., Mcheik, A., & Chokr, A. (2014). Antibacterial and antibiofilm activities of polysaccharides, essential oil, and fatty oil extracted from *Laurus nobilis* growing in Lebanon. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, *7*(S1), S546–S552.
- Ciandrini, E., Campana, R., Federici, S., Manti, A., Battistelli, M., Falcieri, E., ... Baffone, W. (2014). In vitro activity of Carvacrol against titanium-adherent oral biofilms and planktonic cultures. *Clinical Oral Investigations*, *18*(8), 2001–2013.
- Cisar, J. O., Kolenbrander, P. E., & McIntire, F. C. (1979). Specificity of coaggregation reactions between human oral streptococci and strains of *Actinomyces viscosus* or *Actinomyces naeslundii*. *Infection and Immunity*, *24*(3), 742–752.
- CLSI. (2004). *Method for antifungal disk diffusion susceptibility testing of yeasts: approved guideline M44-A. Clinical and Laboratory Standards Institute* (Vol. 24).
- Coenye, T., & Nelis, H. J. (2010). In vitro and in vivo model systems to study microbial biofilm formation. *Journal of Microbiological Methods*, *83*(2), 89–105.
- Cvitkovitch, D. G., Li, Y. H., & Ellen, R. P. (2003). Quorum sensing and biofilm formation in streptococcal infections. *Journal of Clinical Investigation*, *112*(11), 1626–1632.
- Da Silva, E. P., & De Martinis, E. C. P. (2013). Current knowledge and perspectives on biofilm formation: The case of *Listeria monocytogenes*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *97*(3), 957–968.
- Danser, M. M. (2003). Tongue coating and tongue brushing : a literature review. *International Journal of Dental Hygiene*, *1*(4), 151–158.
- Delaquis, P. J., Stanich, K., Girard, B., & Mazza, G. (2002). Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils. *International Journal of*

*Food Microbiology*, 74, 101–109.

- Delorme, C., Abraham, A. L., Renault, P., & Guédon, E. (2015). Genomics of *Streptococcus salivarius*, a major human commensal. *Infection, Genetics and Evolution*, 33, 381–392.
- Deng, D. M., Hoogenkamp, M. A., Exterkate, R. A. M., Jiang, L. M., van der Sluis, L. W. M., ten Cate, J. M., & Crielaard, W. (2009). Influence of *Streptococcus mutans* on *Enterococcus faecalis* Biofilm Formation. *Journal of Endodontics*, 35(9), 1249–1252.
- Donlan, R. M. (2002). Biofilms: Microbial life on surfaces. *Emerging Infectious Diseases*, 8(9), 881–890.
- Duggan, J. M., & Sedgley, C. M. (2007). Biofilm Formation of Oral and Endodontic *Enterococcus faecalis*. *Journal of Endodontics*, 33(7), 815–818.
- Ellen, R. P. (1976). Establishment and distribution of *Actinomyces viscosus* and *Actinomyces naeslundii* in the human oral cavity. *Infection and Immunity*, 14(5), 1119–1124.
- Ellen, R. P., & Balcerzak-Raczkowski, I. B. (1975). Differential medium for detecting dental plaque bacteria resembling *Actinomyces viscosus* and *Actinomyces naeslundii*. *Journal of Clinical Microbiology*, 2(4), 305–310.
- Faran Ali, S. M., & Tanwir, F. (2012). Oral microbial habitat a dynamic entity. *Journal of Oral Biology and Craniofacial Research*, 2(3), 181–187.
- Freeman, D. J., Falkiner, F. R., & Patrick, S. (1989). New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. *Journal of Clinical Pathology*, 42, 872–874.
- Friedman, L., & Kolter, R. (2004). Two Genetic Loci Produce Distinct Carbohydrate-Rich Structural Components of the *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Matrix Two Genetic Loci Produce Distinct Carbohydrate-Rich Structural Components of the *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Matrix. *Journal of Bacteriology*, 186(14), 4457–4465.
- Gavín, R., Rabaan, A. A., Merino, S., Tomás, J. M., Gryllos, I., & Shaw, J. G. (2002). Lateral flagella of *Aeromonas* species are essential for epithelial cell adherence and biofilm formation. *Molecular Microbiology*, 43(2), 383–397.
- Gerencser, M. a., & Slack, J. M. (1969). Identification of human strains of *Actinomyces viscosus*. *Applied Microbiology*, 18(1), 80–87.
- Giaouris, E., Heir, E., Hébraud, M., Chorianopoulos, N., Langsrud, S., Møretrø, T., ... Nychas, G. J. (2014). Attachment and biofilm formation by foodborne bacteria in meat processing environments: Causes, implications, role of bacterial interactions and control by alternative novel methods. *Meat Science*, 97(3), 289–309.
- Giraffa, G. (2003). Functionality of enterococci in dairy products. *International Journal of Food Microbiology*, 88(2–3), 215–222.
- Golmakani, M. T., & Rezaei, K. (2008). Comparison of microwave-assisted hydrodistillation with the traditional hydrodistillation method in the extraction of essential oils from *Thymus vulgaris* L. *Food Chemistry*, 109(4), 925–930.
- Gracia-Valenzuela, M. H., Orozco-Medina, C., & Molina-Maldonado, C. (2012). Efecto antibacteriano del aceite esencial de orégano (*Lippia berlandieri*) en bacterias patógenas de camarón *Litopenaeus vannamei*. *Hidrobiologica*, 22(3), 201–206.
- Holloway, B. W. (1955). Genetic Recombination in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology*, 13(3), 572–581.
- Hosseinzadeh, S., Jafarikukhdan, A., Hosseini, A., & Armand, R. (2015). The Application of Medicinal Plants in Traditional and Modern Medicine: A Review of &lt;i>Thymus

- vulgaris&lt;/i&gt; *International Journal of Clinical Medicine*, 06(09), 635–642.
- Huie, C. W. (2002). A review of modern sample-preparation techniques for the extraction and analysis of medicinal plants. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 373(1–2), 23–30.
- Hyltdgaard, M., Mygind, T., & Meyer, R. L. (2012). Essential oils in food preservation: Mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. *Frontiers in Microbiology*, 3(Jan), 1–24.
- Isman, M. B. (2000). Plant essential oils for pest and disease management. *Crop Protection*, 19, 603–608.
- Iturriaga, L., Olabarrieta, I., & de Marañón, I. M. (2012). Antimicrobial assays of natural extracts and their inhibitory effect against *Listeria innocua* and fish spoilage bacteria, after incorporation into biopolymer edible films. *International Journal of Food Microbiology*, 158(1), 58–64.
- Jahid, I., Lee, N., & Kim, Anna and Ha, S. (2013). Influence of Glucose Concentrations on Biofilm Formation, Motility, Exoprotease Production, and Quorum Sensing in *Aeromonas hydrophila*. *Journal of Food Protection*, 76(2), 239–247.
- Jakubovics, N. S. (2015). Intermicrobial Interactions as a Driver for Community Composition and Stratification of Oral Biofilms. *Journal of Molecular Biology*, 427(23), 3662–3675.
- Jhajharia, K., Mehta, L., Parolia, A., & Shetty, Kv. (2015). Biofilm in endodontics: A review. *Journal of International Society of Preventive and Community Dentistry*, 5(1), 1.
- Jia, G., Zhi, A., Lai, P. F. H., Wang, G., Xia, Y., Xiong, Z., ... Ai, L. (2018). The oral microbiota – a mechanistic role for systemic diseases. *Brithish Dental Journal*, 224(6), 447–455.
- Jiang, C., Sun, Y., Zhu, X., Gao, Y., Wang, L., Wang, J., ... Song, D. (2010). Solvent-free microwave extraction coupled with headspace single-drop microextraction of essential oils from flower of *Eugenia caryophyllata* Thunb. *Journal of Separation Science*, 33(17–18), 2784–2790.
- Jonsson, H., Ström, E., & Roos, S. (2001). Addition of mucin to the growth medium triggers mucus-binding activity in different strains of *Lactobacillus reuteri* in vitro. *FEMS Microbiology Letters*, 204(1), 19–22.
- Jordán, M. J., Martínez, R. M., Goodner, K. L., Baldwin, E. A., & Sotomayor, J. A. (2006). Seasonal variation of *Thymus hyemalis* Lange and Spanish *Thymus vulgaris* L. essential oils composition. *Industrial Crops and Products*, 24(3), 253–263.
- Kaiser, T. D. L., Pereira, E. M., dos Santos, K. R. N., Maciel, E. L. N., Schuenck, R. P., & Nunes, A. P. F. (2013). Modification of the Congo red agar method to detect biofilm production by *Staphylococcus epidermidis*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 75(3), 235–239.
- Kaur, M., Dhawan, P., Damor, S., Arora, D., & Soni, I. P. (2014). Investigating and Exploiting the Antibacterial Potential of Clove (*Eugenia caryophyllyum*) Extracts while Utilizing it to the Maximum to Develop Liquid Soap against Drug Resistant Bacteria Causing Skin Diseases. *International Journal of Pharmaceutical & Biological Archives*, 5(5), 110–115.
- Kayalvizhi, V., & Antony, U. (2011). Microbial and physico-chemical changes in tomato juice subjected to pulsed electric field treatment. *African Journal of Agricultural Research*, 6(30), 6348–6353.
- Kayaoglu, G. (2004). Virulence Factors of *Enterococcus faecalis*: Relationship to Endodontic Disease. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, 15(5), 308–320.
- Kolenbrander J., P. E. L. (1993). Adhere today, here tomorrow: oral bacterial adherence. *Journal of Bacteriology*, 175(11), 3247–3252.
- Kolenbrander, P. E., Palmer, R. J., Rickard, A. H., Jakubovics, N. S., Chalmers, N. I., & Diaz, P. I.

- (2006). Bacterial interactions and successions during plaque development. *Periodontology* 2000, 42(1), 47–79.
- Komiyama, E. Y., Lepesqueur, L. S. S., Yassuda, C. G., Samaranayake, L. P., Parahitiyawa, N. B., Balducci, I., & Koga-Ito, C. Y. (2016). Enterococcus species in the oral cavity: Prevalence, virulence factors and antimicrobial susceptibility. *PLoS ONE*, 11(9), 1–11.
- Kraivaphan, P., & Amornchat, C. (2012). Effect of an essential oil-containing dentifrice on established plaque and gingivitis. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, 43(1), 243–248.
- Kreth, J., Zhang, Y., & Herzberg, M. C. (2008). Streptococcal antagonism in oral biofilms: Streptococcus sanguinis and Streptococcus gordonii interference with Streptococcus mutans. *Journal of Bacteriology*, 190(13), 4632–4640.
- Krishnan, K., Chen, T., & Paster, B. J. (2017). A practical guide to the oral microbiome and its relation to health and disease. *Oral Diseases*, 23(3), 276–286.
- Krzyściak, W., Jurczak, A., Kościelniak, D., Bystrowska, B., & Skalniak, A. (2014). The virulence of Streptococcus mutans and the ability to form biofilms. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 33(4), 499–515.
- Kuorwel, K. K., Cran, M. J., Sonneveld, K., Miltz, J., & Bigger, S. W. (2011). Essential Oils and Their Principal Constituents as Antimicrobial Agents for Synthetic Packaging Films. *Journal of Food Science*, 76(9).
- Leyva-López, N., Gutiérrez-Grijalva, E. P., Vazquez-Olivo, G., & Heredia, J. B. (2017). Essential oils of oregano: Biological activity beyond their antimicrobial properties. *Molecules*, 22(6).
- Loo, C. Y., Corliss, D. a., & Ganeshkumar, N. (2000). Streptococcus gordonii Biofilm Formation : Identification of Genes that Code for Biofilm Phenotypes Streptococcus gordonii Biofilm Formation : Identification of Genes that Code for Biofilm Phenotypes, 182(5), 1374–1382.
- Maruzzellat, B. J. C., & Lichtensteint, M. B. (1956). In Vitro Antibacterial Activity of Oils. *Journal of the American Pharmaceutical Association*, XLV(6), 378–381.
- Mazzarrino, G., Paparella, A., Chaves-López, C., Faberi, A., Sergi, M., Sigismondi, C., ... Serio, A. (2015). Salmonella enterica and Listeria monocytogenes inactivation dynamics after treatment with selected essential oils. *Food Control*, 50, 794–803.
- Meneses ML, L. M. (2011). Bacterial Biofilms. *Analecta Vet*, 31(2), 44–49.
- Millezi, A. F., Caixeta, D. S., Rossoni, D. F., Cardoso, M. das G., & Piccoli, R. H. (2012). In vitro antimicrobial properties of plant essential oils thymus vulgaris, cymbopogon citratus and laurus nobilis against five important foodborne pathogens. *Food Science and Technology*, 32(1), 167–172.
- Mohamed, J. A., & Huang, D. B. (2007). Biofilm formation by enterococci. *Journal of Medical Microbiology*, 56(12), 1581–1588.
- Moon, S. E., Kim, H. Y., & Cha, J. D. (2011). Synergistic effect between clove oil and its major compounds and antibiotics against oral bacteria. *Archives of Oral Biology*, 56(9), 907–916.
- Moran, U., Phillips, R., & Milo, R. (2010). SnapShot: Key numbers in biology. *Cell*, 141(7), 1–2.
- Nahm, F. S. (2016). Nonparametric statistical tests for the continuous data: the basic concept and the practical use. *Korean Journal Anesthesiology*, 1(69), 8–14.
- Nostro, A., Roccaro, A. S., Bisignano, G., Marino, A., Cannatelli, M. A., Pizzimenti, F. C., ... Blanco, A. R. (2007). Effects of oregano, carvacrol and thymol on Staphylococcus aureus and Staphylococcus epidermidis biofilms. *Journal of Medical Microbiology*, 56(4), 519–523.

- O'Toole, G. A. (2011). Microtiter Dish Biofilm Formation Assay. *Journal of Visualized Experiments*, (47), 10–11.
- Özcan, M., & Chalchat, J. (2004). Aroma profile of *Thymus vulgaris* L. growing wild in Turkey. *Bulgarian Journal of Plant Physiology*, 30, 68–73.
- Ozogul, Y., Kuley, E., Uçar, Y., & Ozogul, F. (2015). Antimicrobial Impacts of Essential Oils on Food Borne-Pathogens. *Recent Patents on Food, Nutrition & Agriculture*, 7(July), 53–61.
- Palmer, R. J., Gordon, S. M., Cisar, J. O., & Kolenbrander, P. E. (2003). Coaggregation-mediated interactions of streptococci and actinomyces detected in initial human dental plaque. *Journal of Bacteriology*, 185(11), 3400–3409.
- Pankey, G. A., & Sabath, L. D. (2004). Clinical Relevance of Bacteriostatic versus Bactericidal Mechanisms of Action in the Treatment of Gram-Positive Bacterial Infections. *Clinical Infectious Diseases*, 38(6), 864–870.
- Patil, S. (2013). Microbial Flora in Oral Diseases. *The Journal of Contemporary Dental Practice*, 14, 1202–1208.
- Percival, S. L., Hill, K. E., Williams, D. W., Hooper, S. J., Thomas, D. W., & Costerton, J. W. (2012). A review of the scientific evidence for biofilms in wounds. *Wound Repair and Regeneration*, 20(5), 647–657.
- Radford, B. L., & Ryan, W. J. (1977). Isolation of *Actinomyces viscosus* from two patients with clinical infections. *Journal of Clinical Pathology*, 30(6), 518–520.
- Raut, J. S., & Karuppayil, S. M. (2014). A status review on the medicinal properties of essential oils. *Industrial Crops and Products*, 62, 250–264.
- Razak, N., Shaari, A., Rukunudin, I., & Ahmad, M. (2014). Effects of High Storage Relative Humidity on Cosmetic Quality and Bioactive Compounds Content ... *International Conference of Natural Products 2014 (ICNP2014)*, (March 2014), 117–123.
- Roberts, A. P., & Mullany, P. (2010). Oral biofilms: A reservoir of transferable, bacterial, antimicrobial resistance. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 8(12), 1441–1450.
- Rodriguez-Garcia, I., Silva-Espinoza, B. A., Ortega-Ramirez, L. A., Leyva, J. M., Siddiqui, M. W., Cruz-Valenzuela, M. R., ... Ayala-Zavala, J. F. (2016). Oregano Essential Oil as an Antimicrobial and Antioxidant Additive in Food Products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56(10), 1717–1727.
- Rosan, B., & Lamont, R. J. (2000). Dental plaque formation. *Microbes and Infection*, 2(13), 1599–1607.
- Rozen, R., Bachrach, G., Bronshteyn, M., Gedalia, I., & Steinberg, D. (2001). The role of fructans on dental biofilm formation by *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus gordonii* and *Actinomyces viscosus*. *FEMS Microbiology Letters*, 195(2), 205–210.
- Sadekuzzaman, M., Mizan, M. F. R., Kim, H. S., Yang, S., & Ha, S. Do. (2018). Activity of thyme and tea tree essential oils against selected foodborne pathogens in biofilms on abiotic surfaces. *LWT - Food Science and Technology*, 89, 134–139.
- Sahin, F., Güllüce, M., Daferera, D., Sökmen, A., Sökmen, M., Polissiou, M., ... Özer, H. (2004). Biological activities of the essential oils and methanol extract of *Origanum vulgare* ssp. *vulgare* in the Eastern Anatolia region of Turkey. *Food Control*, 15(7), 549–557.
- Santos, A. O., Freire, J. A. D. S., Carvalho, T. D. De, Barbosa, T. C., Prates, R. P., César, J., ... Farias, K. S. (2016). Atividade antibacteriana e antioxidante de óleos essenciais cítricos com potencialidade para inclusão como aditivos em alimentos Antibacterial and antioxidant activity of essential oils citrus with potentiality for inclusion as additives in foods. *Caderno de Ciências*

*Agrárias*, 8(3), 15–21.

- Schachter, B. (2003). Slimy business — the biotechnology of biofilms New insight into the biology of biofilms is spawning novel commercial strategies for treating the. *Nature Biotechnology*, 21(April), 361–365.
- Seneviratne, C. J., Yip, J. W. Y., Chang, J. W. W., Zhang, C. F., & Samaranyake, L. P. (2013). Effect of culture media and nutrients on biofilm growth kinetics of laboratory and clinical strains of *Enterococcus faecalis*. *Archives of Oral Biology*, 58(10), 1327–1334.
- Seow, Y. X., Yeo, C. R., Chung, H. L., & Yuk, H.-G. (2014). Plant Essential Oils as Active Antimicrobial Agents. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 54(5), 625–644.
- Sharma, S., Singh, S., Bond, J., Singh, A., & Rustagi, A. (2014). Evaluation of Antibacterial Properties of Essential Oils From Clove and Eucalyptus, 7(5), 5–8.
- Silvestri, J. D. F., Paroul, N., Czyewski, E., Lerin, L., Rotava, I., Cansian, R. L., ... Treichel, H. (2010). Perfil da composição química e atividades antibacteriana e antioxidante do óleo essencial do cravo-da-índia (*Eugenia caryophyllata* Thunb.) [Chemical composition and antioxidant and antibacterial activities of clove essential oil (*Eugenia caryophyllata* Thu. *Revista Ceres*, 57(5), 589–594.
- Simões, M., Simões, L. C., & Vieira, M. J. (2010). A review of current and emergent biofilm control strategies. *LWT - Food Science and Technology*, 43(4), 573–583.
- Sreenivasan, P., & Gaffar, A. (2002). Antiplaque biocides and bacterial resistance: A review. *Journal of Clinical Periodontology*, 29(11), 965–974.
- Stefanovic, S., Spiric, D., Petronijevic, R., Trailovic, J. N., Milicevic, D., Nikolic, D., & Jankovic, S. (2015). Comparison of two Analytical Methods (ELISA and LC-MS/MS) for Determination of Aflatoxin B1 in Corn and Aflatoxin M1 in Milk. *Procedia Food Science*, 5(November), 270–273.
- Stojković, D., Glamočlija, J., Ćirić, A., Nikolić, M., Ristić, M., Šiljegović, J., & Soković, M. (2013). Investigation on antibacterial synergism of *Origanum vulgare* and *Thymus vulgaris* essential oils. *Archives of Biological Sciences*, 65(2), 639–644.
- SVANBERG, M. (1978). Contamination of toothpaste and toothbrush by *Streptococcus mutans*. *European Journal of Oral Sciences*, 86(5), 412–414.
- Teixeira, B., Marques, A., Ramos, C., Neng, N. R., Nogueira, J. M. F., Saraiva, J. A., & Nunes, M. L. (2013). Chemical composition and antibacterial and antioxidant properties of commercial essential oils. *Industrial Crops and Products*, 43(1), 587–595.
- Timimi, E. A., & Casey, M. (2012). Effect of thymus vulgaris extract on streptococci and mutans streptococci, in comparison to chlorhexidine gluconate (in vivo study). *J. Bagh. College Dentistry*, 24(3), 116–121.
- Trajano, V. N., Lima, E. de O., Souza, E. L. de, & Travassos, A. E. R. (2010). Inhibitory effect of the essential oil from *Eugenia caryophyllata* Thumb leaves on coalho cheese contaminating microorganisms. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 30(4), 1001–1006.
- Veras, H. N. H., Rodrigues, F. F. G., Botelho, M. A., Menezes, I. R. A., Coutinho, H. D. M., & Da Costa, J. G. M. (2014). Antimicrobial effect of lippia sidoides and thymol on enterococcus faecalis biofilm of the bacterium isolated from root canals. *The Scientific World Journal*, 2014, 1–5.
- Wade, W. G. (2013). The oral microbiome in health and disease. *Pharmacological Research*, 69(1), 137–143.
- Wei-Chun, C., Meen-Woon, H., Hsi-Chin, W., Yin-Yi, C., Yao-Ching, H., & Je-Chiuan, Y. (2011).

- The analysis of eugenol from the essential oil of *Eugenia caryophyllata* by HPLC and against the proliferation of cervical cancer cells. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(7), 1121–1127.
- White, J. C., & Niven, C. F. (1946). *Streptococcus S.B.E.*: A *Streptococcus* associated with subacute bacterial endocarditis. *Journal of Bacteriology*, 6(51), 717–722.
- Wijesundara, N. M., & Rupasinghe, H. P. V. (2018). Essential oils from *Origanum vulgare* and *Salvia officinalis* exhibit antibacterial and anti-biofilm activities against *Streptococcus pyogenes*. *Microbial Pathogenesis*, 117, 118–127.
- Wilkins, J. C., Beighton, D., & Homer, K. A. (2003). Effect of acidic pH on expression of surface-associated proteins of *Streptococcus oralis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(9), 5290–5296.
- Zaura, E., Nicu, E. A., Krom, B. P., & Keijser, B. J. F. (2014). Acquiring and maintaining a normal oral microbiome: current perspective. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 4(June), 1–8.