




Psidium guajava, *Phalaenopsis* sp., *Syzygium aromaticum* e *Cinnamomum verum* como inibidores naturais do crescimento de *Streptococcus mutans*

Psidium guajava, *Phalaenopsis* sp., *Syzygium aromaticum* and *Cinnamomum verum* as natural inhibitors of growth of *Streptococcus mutans*

Letícia Maria Soares Azevedo ^{1,2*}, Camila Mara dos Reis ², Marisa Cristina da Fonseca Casteluber ²

¹Universidade Federal de Minas Gerais – Departamento de Microbiologia, Belo Horizonte, MG, Brasil.

²Universidade do Estado de Minas Gerais – Unidade Ibirité, Ibirité, MG, Brasil.

*leticiamariaazevedo12@gmail.com

RESUMO

Atualmente, aumentaram as pesquisas com extratos de plantas buscando a ação terapêutica no controle de doenças da cavidade bucal, especialmente a cárie dental. Diversos extratos vegetais já são incorporados nos dentífrícios e enxaguantes bucais. O objetivo deste estudo foi avaliar *in vitro* a ação antibacteriana dos extratos de *Psidium guajava* (goiabeira), *Phalaenopsis* sp. (orquídea), *Syzygium aromaticum* (cravo-da-Índia) e *Cinnamomum verum* (canela-do-Ceilão). Os testes foram realizados com a bactéria da cavidade bucal *Streptococcus mutans*. A atividade antibacteriana dos extratos vegetais foi avaliada por método de disco difusão em ágar e por concentração inibitória mínima (CIM). Os testes mostraram a eficácia dos extratos por meio de zonas de inibição do crescimento bacteriano (de 5 a 20 mm de diâmetro) e CIM de 100 mg. mL⁻¹ extrato da *Phalaenopsis* sp. e de 50 mg. mL⁻¹ extrato da *P. guajava*. Estudos complementares serão necessários para avaliar outras ações farmacológicas na finalidade de usar estes extratos vegetais nas diferentes especialidades odontológicas e principalmente no tratamento e profilaxia da cárie dental.

Palavras-chave: Atividade antibacteriana. Extrato vegetal. *Streptococcus mutans*.

ABSTRACT

Currently, an increase on research on plant extracts seeking therapeutic action in the control of diseases of the oral cavity are observed, especially dental caries. Several plant extracts are already incorporated into toothpastes and mouthwashes. The objective of this study was to evaluate *in vitro* the antibacterial action of *Psidium guajava* (guava), *Phalaenopsis* sp. (orchid), *Syzygium aromaticum* (clove) and *Cinnamomum verum* (Ceylon cinnamon) extracts. The tests were carried out with the oral cavity bacteria *Streptococcus mutans*. The antibacterial activity of plant extracts was evaluated by the disk diffusion method in agar and by minimal inhibitory concentration (MIC). The tests showed the effectiveness of the extracts through inhibition zones of bacterial growth (from 5 to 20 mm in diameter) and MIC of 100 mg. mL⁻¹ *Phalaenopsis* sp. extract and 50 mg. mL⁻¹ *P. guajava* extract. Complementary studies will be needed to evaluate other pharmacological actions in order to use these plant extracts in different dental specialties and mainly in the treatment and prophylaxis of dental caries.

Keywords: Antibacterial activity. Plant Extract. *Streptococcus mutans*.

INTRODUÇÃO

A cárie dental é uma doença infecciosa autolimitante que progride lentamente até destruir totalmente a estrutura do dente (Fejerskov & Kidd, 2005). De acordo com Lima (2007), a cárie é um processo anormal de desequilíbrio fisiológico de causa local, que necessita da interação de fatores como tempo, suscetibilidade, dieta e microrganismos para ocorrer, sendo o principal microrganismo causador do distúrbio a bactéria *Streptococcus mutans*.

Esta bactéria fixa-se no esmalte do dente formando colônias que produzem ácidos capazes de corroerem as camadas do esmalte dentário, podendo causar perfurações. Tais colônias causam um desequilíbrio físico-químico entre o substrato do dente e o biofilme presente na superfície dental, destruindo as camadas do esmalte dentário (Carvalho et al., 2018).

Segundo Nunes e Perosa (2017), o histórico de cáries na população brasileira, bem como na população mundial, está relacionada a diversos fatores, dentre eles: sociodemográficos, psicossocial e ambiental. A doença pode atingir toda a população, mas observa-se predomínio nos indivíduos em estado de vulnerabilidade social, pois o acesso a tratamentos odontológicos, as condições de higiene e a alimentação são mais precários. As crianças são as mais atingidas, principalmente devido à má higiene e a preferência por alimentos que estimulam o desenvolvimento de microrganismos causadores de cárie (Álvarez & Fernandez, 2018).

O Ministério da Saúde (2018) declara a cárie como um problema que ainda afeta grande parte da população brasileira, com 53,4% das crianças até cinco anos de idade possuindo dentes cariados enquanto que, na adolescência, encontram-se no mesmo quadro 56,5% da população. Esse percentual aumenta com a idade do indivíduo por causa do caráter acumulativo de fatores que favorecem o desenvolvimento da cárie, como falta de higienização ao longo da vida.

A utilização de produtos naturais para o tratamento de patogenias tem se intensificado. Dentre esses, destacam-se os extratos vegetais e os óleos essenciais, os quais oferecem compostos farmacologicamente ativos capazes de combater e de inibir o desenvolvimento de muitos patógenos. Tanto os extratos vegetais quanto os óleos essenciais vêm sendo amplamente estudados e utilizados de forma clínica e terapêutica, principalmente para aumentar a resistência imune e diminuir os efeitos colaterais causados pelos antibióticos sintéticos (Carvalho, 2016; Azevedo, 2019).

A busca por tratamentos alternativos que utilizam plantas medicinais intensificou-se na Odontologia nas últimas décadas, buscando formas de minimizar graves problemas dentais, como a cárie (Pinheiro, Brito, Almeida, Cavalcanti & Padilha, 2012). Muitos estudos apontam a eficácia de extratos naturais e tinturas contra o desenvolvimento de *S. mutans*, como demonstrado por Freires et al. (2010).

Extratos vegetais e óleos essenciais podem ser capazes de reprimir ou cessar o crescimento de *S. mutans* e essa proposta se apresenta como uma alternativa para auxiliar na prevenção contra infecções causadas pela bactéria. A eficácia antibacteriana desses extratos pode fornecer subsídios para a substituição de componentes químicos antibacterianos na composição de cremes dentais e demais produtos de higiene bucal. O objetivo desta pesquisa, portanto, foi avaliar o potencial antibacteriano dos extratos de *P. guajava*, *Phalaenopsis* sp., *S. aromaticum* e *C. verum* contra o *S. mutans in vitro*.

MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi realizada no Laboratório de Microbiologia Aplicada da Universidade do Estado de Minas Gerais – Unidade Ibirité (LAMAP). Todas as etapas foram realizadas em Capela de Fluxo Laminar, evitando contato e contaminação do meio externo.

A cepa inicial de *Streptococcus mutans* (ATCC 31989) foi doada pelo Laboratório de Microbiologia Oral e Anaeróbios do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, sendo em seguida encaminhada para o Laboratório de Microbiologia Aplicada da Universidade do Estado de Minas Gerais – Ibirité. O

cultivo do *Streptococcus mutans* foi realizado em ágar Mueller Hinton, mantido em estufa bacteriológica a 37° C por 48 horas em microaerofilia e submetido ao teste de Coloração de Gram, segundo manual do Ministério da Saúde (2001), para confirmação do microrganismo teste (Freire et al., 2014; Carvalho, 2016).

Para o preparo dos extratos, foram utilizadas as folhas de *Psidium guajava* (goiabeira); as flores de *Phalaenopsis* sp. (orquídea) com todas as estruturas; o botão seco da flor de *Syzygium aromaticum* (cravo-da-índia) e as cascas de *Cinnamomum verum* (canela-do-Ceilão). Os componentes vegetais de *P. guajava* e *Phalaenopsis* sp. foram obtidos na forma *in natura* na horta e no pomar do Laboratório de Botânica da Universidade do Estado de Minas Gerais – unidade de Ibité. Os componentes vegetais de *S. aromaticum* e *C. verum* foram adquiridos comercialmente em uma loja de produtos naturais do Mercado Central de Belo Horizonte.

A aquisição dos extratos vegetais foi feita de acordo com o protocolo para obtenção de extratos proposto pela Farmacopeia Brasileira (Agência Nacional de Vigilância Sanitária [Anvisa], 2018). Após higienização, as partes vegetais utilizadas, como folhas, flores e cascas, foram fracionadas em pequenos fragmentos e maceradas em etanol (70% v/v), a cada 1g de material vegetal, foram adicionados 5mL de álcool de cereais. O macerado foi armazenado por sete dias, em frasco âmbar, temperatura ambiente e, na ausência de luz, após esse período, filtrado em filtro de papel e armazenado para uso posterior.

Para realização dos testes que avaliaram a atividade antibacteriana dos extratos sobre *S. mutans*, foi obtida uma suspensão da bactéria de interesse pelo protocolo experimental a seguir. Inicialmente, uma alçada desse microrganismo, retirada de uma cultura desenvolvida em placa de Petri, foi inoculada em 50 mL de caldo Mueller Hinton. A suspensão foi agitada e em seguida incubada por 12 horas a 37° C em microaerofilia. Depois do crescimento do inóculo, a suspensão foi centrifugada a 1500 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspensionado em 15 mL de caldo Mueller Hinton.

A concentração bacteriana foi ajustada de modo a obter 5×10^5 UFC mL⁻¹ para plaqueamento, conforme descrito por Veloz, Alvear e Salazar (2019). Para realização do teste de disco-difusão em ágar, o *S. mutans* foi inoculado no ágar Mueller Hinton pela técnica de espalhamento. Discos de papel filtro de 6 mm de diâmetro, previamente embebidos nos extratos a serem testados, foram dispersos sobre a placa. Os discos continham separadamente os extratos de folhas de *Psidium guajava* (goiabeira) (10 µg por disco); *Phalaenopsis* sp. (orquídea) (10 µg por disco); *Syzygium aromaticum* (cravo da índia) (10 µg por disco) e *Cinnamomum verum* (canela do Ceilão) (10 µg por disco); amoxicilina na concentração de 10 µg por disco, consoante a Sánchez, Varona, Ortega e Ciódaro (2015) (controle positivo) e álcool 70% (v/v) (controle negativo) (10 µg por disco). O álcool foi utilizado como controle negativo para demonstrar que a eficácia dos extratos se devia às propriedades antibacterianas desses e não ao álcool presente nos extratos.

As placas foram incubadas por 12 horas em estufa bacteriológica a 37° C em anaerobiose. Foram realizados sete testes em triplicata. As zonas de inibição do crescimento bacteriano foram medidas após o tempo de incubação com o auxílio de um paquímetro e os dados conseguidos foram analisados pelo programa Graph Pad Prism 5.0 pelo teste estatístico TwoWayANOVA.

Os testes de concentração inibitória mínima (CIM) foram realizados de acordo com a metodologia descrita por Carvalho (2016) com modificações, utilizando o método de microdiluição em microplacas de 96 poços, com todos os extratos testados em duplicata. Para a diluição, foi utilizado meio Mueller Hinton líquido esterilizado, adicionando 100 µL em cada poço. As concentrações desejadas dos extratos eram 200 mg. mL⁻¹, 100 mg. mL⁻¹, 50 mg. mL⁻¹, 25 mg. mL⁻¹, 12,5 mg. mL⁻¹, 6,25 mg. mL⁻¹, 3,125 mg. mL⁻¹ e 1,5625 mg. mL⁻¹. A fim de obtê-las 100 µL do extrato, foi depositado, no primeiro poço, homogeneizado, sendo retirado 100 µL e colocado no poço seguinte. O processo foi repetido até chegar à concentração de 1,5625 mg. mL⁻¹ no último poço, obtendo, assim, oito concentrações diferentes para os extratos testados. Foi feita a diluição do álcool 70% (v/v) (controle negativo) e da amoxicilina na concentração inicial de 100 mg. mL⁻¹ (controle positivo).

A microplaca foi incubada sob microaerofilia (método de chama de vela) em estufa bacteriológica a 37° C por 12 horas (Melo et al., 2006). Após a incubação, foi realizada a leitura da placa na leitora de microplacas TP – Reader NM Thermo Plate no comprimento de onda de 630 nm. Os resultados foram registrados. O programa Excel (2013) foi utilizado para análise dos dados.

A análise estatística foi feita através do Programa Graph Pad Prism 5.0, ferramenta Two-wayANOVA, realizando a análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os extratos de *Psidium guajava* (goiabeira), *Phalaenopsis* sp. (orquídea), *Syzygium aromaticum* (cravo-da-índia) e *Cinnamomum verum* (canela-do-Ceilão) foram capazes de inibir o crescimento de *Streptococcus mutans*, com CIM de 50 mg. mL⁻¹, 100 mg. mL⁻¹, 50 mg. mL⁻¹ e 50 mg. mL⁻¹ respectivamente (Figura 1).

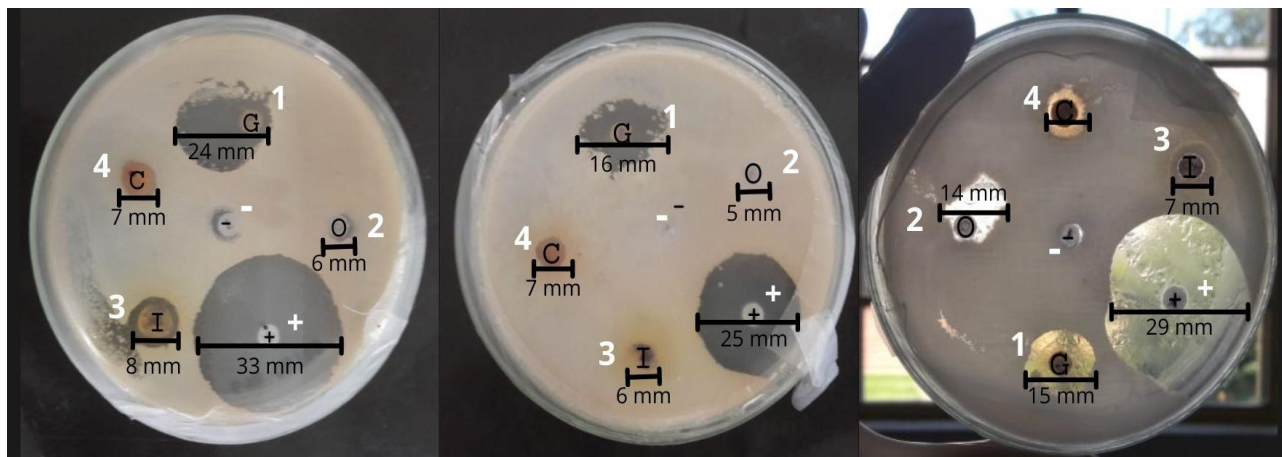


Figura 1. Ensaio da Atividade Antibacteriana por método de disco- difusão em Ágar. Zonas de inibição para *Psidium guajava* (goabeira) (G - 1) (24 mm, 16 mm, 15 mm); *Phalaenopsis* sp. (orquídea) (O – 2) (6 mm, 5 mm, 14 mm); *Syzygium aromaticum* (cravo da Índia) (I – 3) (8 mm, 6 mm, 7 mm), *Cinnamomum verum* (canela do Ceilão) (C – 4) (7 mm, 7 mm, 10 mm), Amoxicilina (controle positivo - +) (33 mm, 25 mm, 29 mm) e álcool 70% (controle negativo) (sem zona de inibição).

Fonte: Os autores.

Foram realizados sete testes de disco-difusão, em triplicata, nos quais as zonas de inibição, após 12 horas de incubação em estufa bacteriológica, foram medidas com auxílio de um paquímetro. A média das zonas de inibição em cada extrato testado está expressa na Tabela 1.

Depois de sete (7) testes em triplicata, as zonas de inibição do crescimento bacteriano foram medidas e as médias descritas em mm. O extrato de *P. guajava* obteve média de zonas de inibição entre 12 mm e 20 mm. Já o extrato de *Phalaenopsis* sp. teve média de zonas de inibição entre 6 mm e 9 mm. Para o extrato de *S. aromaticum*, a média de zonas de inibição ficou entre 6 mm e 10 mm. Por sua vez, o extrato de *C. verum* com média de zonas de inibição entre 7 mm e 8 mm.

Tabela 1

Distribuição das médias dos Diâmetros das Zonas de inibição do crescimento de *S. mutans* (mm).

	<i>P. guajava</i>	<i>Phalaenopsis</i> sp.	<i>S. aromaticum</i>	<i>C. verum</i>	Amoxicilina	Álcool 70%
Teste 1	16 mm	9 mm	6 mm	8 mm	33 mm	0 mm
Teste 2	19 mm	6 mm	8 mm	8 mm	27 mm	0 mm
Teste 3	14 mm	7 mm	7 mm	8 mm	30 mm	0 mm
Teste 4	20 mm	6 mm	7 mm	8 mm	35 mm	0 mm
Teste 5	17 mm	6 mm	10 mm	8 mm	34 mm	0 mm
Teste 6	12 mm	6 mm	6 mm	7 mm	27 mm	0 mm
Teste 7	16 mm	6 mm	7 mm	8 mm	28 mm	0 mm

Fonte: Os autores.

Notas: A Tabela expressa as médias das zonas de inibição conquistadas nos sete (7) testes realizados para os extratos de *P. guajava*, *Phalaenopsis* sp., *S. aromaticum*, *C. verum*, controle positivo e negativo.

Os dados alcançados demonstram que o extrato de *P. guajava* (goiabeira) com zonas de inibição de 12 a 20 mm de diâmetro foi o que apresentou maior capacidade de inibição do crescimento de *S. mutans*, com diferenças estatísticas relevantes ($p < 0,001$) quando comparado aos extratos de *Phalaenopsis* sp. (orquídea) (zonas de inibição de 6 mm de diâmetro), *S. aromaticum* (cravo-da-índia) ($p < 0,01$) (zonas de inibição de 8 mm de diâmetro) e *C. verum* (canela-do-Ceilão) ($p < 0,01$) (zonas de inibição de 8 mm), mostrando ser mais eficaz na inibição da bactéria em estudo. A análise estatística demonstra a eficácia entre os extratos testados (Figura 2).

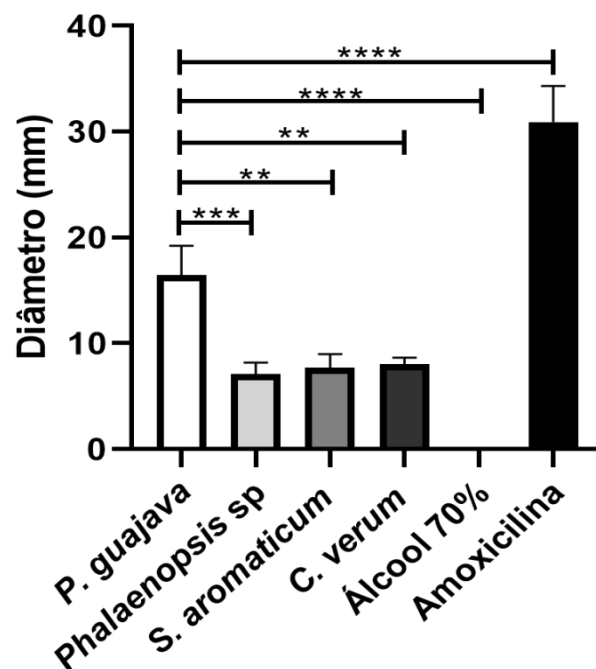


Figura 2. Eficácia dos extratos testados como inibidores de *Streptococcus mutans*. O gráfico mostra a diferença estatística da média das zonas de inibição entre os extratos testados e os controles positivo e negativo.

Fonte: Os autores.

O extrato de *P. guajava* apresentou diferença estatística entre todos os extratos testados e os controles. *P. guajava* e *Phalaenopsis* sp.: diferença estatística de $p < 0,001$. *P. guajava* e *S. aromaticum*: diferença estatística de $p < 0,01$. *P. guajava* e *C. verum*: diferença estatística de $p < 0,01$. *P. guajava* e Amoxicilina: diferença estatística de $p < 0,0001$. *P. guajava* e Álcool 70 %: diferença estatística de $p < 0,0001$. Os demais extratos apresentaram ausência de diferença estatística entre si ou entre o controle negativo.

Quando comparado ao controle positivo com relação à inibição apresentada pelo extrato de goiabeira, demonstrou ineficácia quanto à amoxicilina ($p < 0,0001$). No estudo de Alves, Queiroz, J. V. Pereira e Pereira (2009), o extrato de *P. guajava* foi capaz de inibir bactérias que colonizam a boca com CIM de 1:4, além de alguns gêneros de *Candida*, com CIM de 1:32. Brighenti et al. (2008) ponderaram que outras espécies do gênero *Psidium* possuem potencial antimicrobiano contra *S. mutans*. O extrato aquoso da folha de *P. guajava* também possui efeitos em bactérias cariogênicas, sendo capaz de prevenir o aparecimento de cáries em ratos, segundo resultados do trabalho de Menezes, Delbem, Brighenti, Okamoto e Gaetti-Jardim (2010). No presente estudo, a CIM para *P. guajava* encontrada foi de 50 mg. mL⁻¹. Ainda assim, o fato de o extrato de goiabeira ter sido capaz de inibir a bactéria em estudo representa uma alternativa em tempos em que os microrganismos têm se mostrado cada vez mais resistentes aos antibióticos sintéticos amplamente utilizados.

No que concerne ao extrato de orquídea, Bertolino (2015) apresentou inibição utilizando extratos de espécies de orquídeas diferentes de *Phalaenopsis*. Orquídeas do gênero *Dendrobium* apresentaram melhor inibição de *Enterococcus faecalis* e *Escherichia coli* na concentração de 50 mg/mL, sendo o extrato de orquídeas do gênero *Cymbidium* capaz de inibir *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* também na concentração de 50 mg/mL. Não foram relatadas pesquisas a respeito de atividade antibacteriana contra *S. mutans* com essa espécie vegetal. Porém, na pesquisa em questão, a CIM do extrato dessa planta foi de 100 mg. mL⁻¹.

O óleo essencial de *S. aromaticum* (cravo-da-índia) foi utilizado por Nogueira, Diaz, Tagami e Lorscheide (2007) para inibir o crescimento de *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus casei* e, no teste de difusão em ágar com o *S. mutans*, foram observadas zonas de inibição de 9 mm. Nesta pesquisa, foram observadas zonas de aproximadamente 8 mm e CIM de 50 mg. mL⁻¹ para o extrato de mesma espécie vegetal. Ressalta-se que, neste estudo, foi utilizado o extrato alcoólico, tendo fácil acesso e melhor custo-benefício.

Quanto ao extrato de *C. verum*, pesquisadores constataram o potencial inibitório da espécie. Carvalho (2016) demonstrou a ação inibitória de *C. verum* contra *S. mutans* com zonas de inibição de aproximadamente 8 mm de diâmetro no ensaio de atividade antimicrobiana. Neste artigo, foram averiguadas as zonas de inibição de mesmo diâmetro nos testes realizados. Já a CIM do estudo relatado foi menor do que na pesquisa atual, sendo 0,156 mg. mL⁻¹ para o primeiro caso e 50 mg. mL⁻¹ no segundo caso. Vale ressaltar que o estudo conduzido por Carvalho (2016) utilizou do óleo essencial de *C. verum* e este apresenta concentração maior de compostos antibacterianos quando comparado ao extrato bruto da planta.

Todos os extratos testados como potenciais inibidores do crescimento de *S. mutans* apresentaram zonas de inibição. Além disso, os valores de CIM dos extratos de *P. guajava*, *Phalaenopsis* sp., *S. aromaticum* e *C. verum* estados foram satisfatórios tendo em vista que o extrato bruto possui menos componentes antibacterianos comparados ao óleo essencial desses vegetais. No entanto, o extrato com melhor resultados para ambas as metodologias utilizadas (teste de disco-difusão em ágar e ensaio da concentração inibitória mínima) foi o extrato de *P. guajava*, pois apresentou maiores zonas de inibição.

CONCLUSÃO

Os resultados indicaram que os extratos de *P. guajava*, *Phalaenopsis* sp., *S. aromaticum* e *C. verum* possuem potencial ação antibacteriana frente a cepas de *S. mutans*, verificados por meio de zonas de inibição do crescimento bacteriano. Nenhum dos extratos vegetais testados foi

estatisticamente semelhante ou superior ao potencial de inibição do antibiótico testado, a Amoxicilina. Os dados encontrados neste trabalho permitem propor que novos testes utilizando o óleo essencial de *P. guajava* possam ser analisados contra o *S. mutans*, uma vez que, nos testes *in vitro*, esse foi o extrato que apresentou melhor atividade antibacteriana. Assim, esse extrato torna-se a melhor opção para futuras pesquisas, com intuito de viabilizá-lo como potencial componente de produtos de higiene bucal, podendo ser usado tanto para tratamento quanto para profilaxia da formação de cárie dental.

REFERÊNCIAS

- Álavarez, J. J. R., & Fernandez, D. Y. B. (2018). Conocimientos de higiene oral de acudientes y su relación con caries en menores de 5 años. *Revista Facultad Nacional de Salud Pública*, 36(2), pp. 1-17. doi: 10.17533/udea.rfnsp.v36n2a03
- Alves, P. M., Queiroz, L. M. G., Pereira, J. V., & Pereira, M. S. V. (2009). Atividade antimicrobiana, antiaderente e antifúngica *in vitro* de plantas medicinais brasileiras sobre microrganismos do biofilme dental e cepas do gênero *Candida*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 42(2), pp. 222-224. doi.org/10.1590/S0037-86822009000200028
- Anvisa. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. (2018). *Formulário de Fitoterápicos Farmacopeia Brasileira*. 1. ed., Primeiro Suplemento. Recuperado de <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/farmacopeia/formulario-fitoterapico>
- Azevedo, L. M. S. (2019). *Psidium guajava, Phalaenopsis sp., Syzygium aromaticum e Cinnamomum verum como inibidores naturais do crescimento de Streptococcus mutans*. (Monografia de Graduação em Ciências Biológicas). Universidade do Estado de Minas Gerais, Ibité, Brasil.
- Bertolino, B. F. C. (2015). *Avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos de Dendrobium sp e Cymbidium sp*. (Monografia de Graduação em Farmácia). Faculdade de Pindamonhangaba, Pindamonhangaba, Brasil.
- Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Políticas de Saúde. Programa Nacional de DST e Aids. (2001). *Técnica de Coloração de Gram*. Recuperado de https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/115_03gram.pdf
- Brasil. Ministério da Saúde. (2018). *A saúde bucal no Sistema Único de Saúde*. Brasília: Ministério da Saúde. Recuperado de <https://aps.saude.gov.br/biblioteca/visualizar/MTI2Nw==>
- Brighenti, F. L., Luppens, S. B. I., Delbem, A. C. B., Deng, D. M., Hoogenkamp, M., Gaetti-Jardim E. Jr., ... Cate, J. M. (2008). Effect of *Psidium cattleianum* leaf extract on *Streptococcus mutans* viability, protein expression and acid production. *Caries Research*, 42(2), pp. 148-154. doi: 10.1159/000121439
- Carvalho, I. O. (2016). *Atividade antibacteriana de óleos essenciais e cremes dentais fitoterápicos em bactérias cariogênicas*. (Dissertação de Mestrado em Bioquímica Aplicada). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Brasil.
- Carvalho, T. P., Maske, T. T., Signori, C., Brauner, K. V., Oliveira, E. F., & Cenci, M. S. (2018). Desenvolvimento de lesões de cárie em dentina em um modelo de biofilme simplificado *in vitro*: um estudo piloto. *Revista de Odontologia da UNESP*, 47(1), pp. 40-44. doi.org/10.1590/1807-2577.06017

- Fejerskov, O., & Kidd, E. (2005). *Cárie dentária: a doença e seu tratamento clínico*. 1. ed. São Paulo: Santos.
- Freire, I. C. M., Pérez, A. L. A. L., Cardoso, A. M. R., Mariz, B. A. L. A., Almeida, L. F. D., Cavalcanti, Y. W., & Padilha, W. W. N. (2014). Atividade antibacteriana de óleos essenciais sobre *Streptococcus mutans* e *Staphylococcus aureus*. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 16(2), suppl. 1. doi.org/10.1590/1983-084X/12_053
- Freires, I. A., Alves, L. A., Jovito, V. C., Almeida, L. F. D., Castro, R. D., & Padilha, W. W. N. (2010). Atividades antibacteriana e antiaderente *in vitro* de tinturas de *Schinus terebinthinifolius* (Aroeira) e *Solidago microglossa* (Arnica) frente a bactérias formadoras do biofilme dentário. *Odontologia Clínico-Científica*, 9(2), pp. 139-143.
- Lima, J. E. O. (2007). Cárie dentária: um novo conceito. *Revista Dental Press Ortodontia e Ortopedia Facial*, 12(6), pp. 119-130. doi.org/10.1590/S1415-54192007000600012
- Melo, A. F. M., Santos, E. J. V., Souza, L. F. C., Carvalho, A. A. T., Pereira, M. S. V., & Higino, J. S. (2006). *In vitro* antimicrobial activity of an extract of *Anacardium occidentale* L. against *Streptococcus* species. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 16 (2). doi.org/10.1590/S0102-695X2006000200012
- Menezes, C. T. E., Delbem, A. C. B., Brighenti, F. L., Okamoto, A. C., & Gaetti-Jardim, E. (2010). Protective efficacy of *Psidium cattleianum* and *Myracrodruon urundeuva* aqueous extracts against caries development in rats. *Pharmaceutical Biology*, 48(3), pp. 300-305. doi: 10.3109/13880200903122202
- Nogueira, M. A., Diaz, M. G., Tagami, P. M., & Lorscheide, J. (2007). Atividade microbiana de óleos essenciais e extratos de própolis sobre bactérias cariogênicas. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, 28(1), pp. 93-97.
- Nunes, V. H., & Perosa, G. B. (2017). Cárie dentária em crianças de 5 anos: fatores sociodemográficos, lócus de controle e atitudes parentais. *Ciência Saúde Coletiva*, 22(1), pp. 191-201. doi.org/10.1590/1413-81232017221.13582015
- Pinheiro, M. A., Brito, D. B. A., Almeida, L. F. D., Cavalcanti, Y. W., & Padilha, W. W. N. (2012). Efeito antimicrobiano de tinturas de produtos naturais sobre bactérias da cárie dentária. *Revista Brasileira em Promoção da Saúde*, 25(2), pp. 197-201. doi: 10.5020/18061230
- Sánchez, S. B., Varona, F. S. S., Ortega, H. D., & Ciódaro, A. R. (2015). Resistencia a la amoxicilina de cepas de *Streptococcus mutans* aisladas de individuos con antibiotico terapia previa y sin esta. *Universitas Odontológica*, 34(72), pp. 101-106. doi.org/10.11144/Javeriana
- Veloz, J. J., Alvear, M., & Salazar, L. A. (2019). Antimicrobial and antibiofilm activity against *Streptococcus mutans* of individual and mixtures of the main polyphenolic compounds found in Chilean propolis. *BioMed Research International*, 7602343, pp. 1-7. doi: 10.1155/2019/7602343