



Ana Mafalda Bica Tavares

Produtos de Origem Vegetal - Uma Nova Estratégia na Prevenção da Cárie Dentária

Monografia realizada no âmbito da unidade Estágio Curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, orientada pela Professora Doutora Lígia Maria Ribeiro Pires Salgueiro Silva Couto e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Julho 2016



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Ana Mafalda Bica Tavares

Produtos de Origem Vegetal - Uma Nova Estratégia na Prevenção da Cárie Dentária

Monografia realizada no âmbito da unidade Estágio Curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas,
orientada pela Professora Doutora Lígia Maria Ribeiro Pires Salgueiro Silva Couto e apresentada à
Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Julho 2016



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Eu, Ana Mafalda Bica Tavares, estudante de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o número de estudante de 2011144651, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo da Monografia apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade Estágio Curricular.

Mais declaro que este é um trabalho original e que toda e qualquer afirmação ou expressão, por mim utilizada, está referenciada na Bibliografia desta Monografia, segundo os critérios bibliográficos legalmente estabelecidos, salvaguardando sempre os Direitos de Autor, à exceção das minhas opiniões pessoais.

Coimbra, 5 de julho 2016.

(Ana Mafalda Bica Tavares)

Agradecimentos

Aos meus pais, à minha irmã e aos meus avós pelo apoio incondicional, por acreditarem em mim e incentivarem as minhas escolhas e por estarem presentes ao longo de todo o meu percurso académico.

À minha orientadora, Professora Doutora Lúcia Maria Ribeiro Pires Salgueiro Silva Couto, pelo constante auxílio e disponibilidade, bem como pela notável orientação dirigida.

A todos os professores da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra pelo seu esforço e dedicação na transmissão de conhecimentos nas mais diversas áreas.

Aos meus amigos, por todos bons momentos partilhados, pela força e boa disposição transmitidas e por fazerem parte desta fase da minha vida.

À Mariana Abreu, por ser o meu anjinho da guarda.

A todos, o meu sincero obrigada!

Lista de Acrónimos

DNA – *Deoxyribonucleic Acid* (Ácido Desoxirribonucleico)

EPS – *Extracellular Polysaccharides* (Polissacáridos Extracelulares)

FAP – Fluoroapatite

GTF – Glucosiltransferase

HAP – Hidroxiapatite

IPS – *Intracellular Polysaccharides* (Polissacáridos Intracelulares)

OEs – Óleos Essenciais

OMS – Organização Mundial da Saúde

PAC – Proantocianidinas

Resumo

As doenças orais estão entre as doenças crônicas mais comuns que afetam o Homem, sendo consideradas um grave problema de Saúde Pública. Das doenças orais, a cárie dentária e as doenças periodontais são as mais prevalentes. A cárie dentária é uma doença de origem polimicrobiana e de caráter multifatorial, definida como uma desmineralização da superfície do dente, causada por um desequilíbrio no processo de desmineralização-remineralização. O seu desenvolvimento depende principalmente da formação da placa bacteriana, um biofilme biológico, e da presença de bactérias gram-positivas com capacidade acidogénica e acidófila – *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus acidophilus* e *Actinomyces* spp., os principais responsáveis pela formação e colonização do biofilme. As bactérias constituintes do biofilme são muito mais resistentes a agentes anti-microbianos do que quando isoladas. Dado que, cada vez mais as terapêuticas convencionais ficam aquém das expectativas, há uma necessidade incessante de procura de novas alternativas seguras e eficazes para prevenir a cárie dentária, recorrendo-se a produtos medicinais de origem vegetal. Extratos não voláteis e óleos essenciais de espécies vegetais, tais como *Camellia sinensis*, *Vaccinium macrocarpon*, *Stevia rebaudiana*, *Zingiber officinale*, *Withania somnifera*, *Salvadora persica*, *Lippia sidoides*, *Curcuma longa*, *Mentha spicata*, *Eucalyptus camaldulensis* e *Ocimum americanum* assumem um lugar de destaque pelas propriedades que lhe são atribuídas, podendo assim, fundamentar o seu uso como ingredientes ativos em formulações farmacêuticas para a prevenção da cárie dentária.

Palavras-chave: cárie dentária, placa bacteriana, *Streptococcus mutans*, óleos essenciais, extratos não voláteis.

Abstract

Oral diseases are among the most common chronic diseases affecting mankind, being considered a serious public health problem. Among the most common diseases are oral diseases, dental caries and periodontal diseases. Dental caries is a disease of polymicrobe origin and multifactorial in nature, defined by demineralization of the tooth surface, caused by an imbalance in the process of demineralization-remineralization. The development depends mainly on the formation of dental plaque, a biological biofilm and the presence of Gram-positive bacteria with acidogenic and acidophilic capacity – *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus acidophilus* and *Actinomyces* spp. – primarily responsible for formation and colonization of biofilm. Bacteria biofilm constituents are much more resistant to antimicrobials agents than when isolated. Since conventional therapies increasingly do not meet expectations, there is a necessity of new safe and effective alternatives to prevent tooth decay, using medicinal products of vegetable origin. Non-volatile extracts and essential oils of plant species, such as *Camellia sinensis*, *Vaccinium macrocarpon*, *Stevia rebaudiana*, *Zingiber officinale*, *Withania somnifera*, *Salvadora persica*, *Lippia sidoides*, *Curcuma longa*, *Mentha spicata*, *Eucalyptus camaldulensis* and *Ocimum americanum* assume a prominent place due to their properties, and thus justify their use as active ingredients in pharmaceutical formulations for the prevention of dental caries.

Keywords: dental caries, dental plaque, *Streptococcus mutans*, essential oils, non-volatile extracts.

Índice

Agradecimentos	4
Lista de Acrónimos	5
Resumo	6
Abstract	7
1 Introdução	9
2 Cavidade Oral	9
2.1 Dente: Considerações Gerais	10
2.1.1 Esmalte e Dentina: Composição	11
2.2 Glândulas Salivares	11
3 Cárie Dentária	12
3.1 Epidemiologia	12
3.2 Etiologia	13
3.3 Fisiopatologia	13
3.4 Estratégias de Prevenção Convencionais	16
4 Produtos de Origem Vegetal – Nova Estratégia na Prevenção da Cárie Dentária	17
4.1 Extratos de Plantas	17
4.1.1 <i>Camellia sinensis</i> (L.) O. Kuntze	17
4.1.2 <i>Vaccinium macrocarpon</i> Aiton	18
4.1.3 <i>Stevia Rebaudiana</i> Bertoni	20
4.1.4 <i>Zingiber officinale</i> Roscoe	21
4.1.5 <i>Withania somnifera</i> (L.) Dunal	22
4.1.6 <i>Salvadora persica</i> L.	23
4.2 Óleos Essenciais	25
4.2.1 <i>Lippia sidoides</i> Cham	25
4.2.2 <i>Curcuma longa</i> L.	26
4.2.3 <i>Mentha spicata</i> L. e <i>Eucalyptus camaldulensis</i> Dehnh	27
4.2.4 <i>Ocimum americanum</i> L.	28
4.3 Produtos Comercializados	30
5 Conclusão	31
6 Bibliografia	32

I| Introdução

A saúde oral é inseparável da saúde geral do indivíduo, pois causa dor e sofrimento e tem impacto no seu bem-estar geral. As doenças orais são um problema de saúde grave a nível mundial, com principal destaque para a cárie dentária e para as doenças periodontais.^{1,2}

Mais de 750 espécies de microorganismos habitam na cavidade oral, sendo que um grande número está envolvido nas doenças orais. No entanto, dada a elevada incidência destas doenças associada ao aumento da resistência bacteriana a antibióticos, aos efeitos adversos de alguns agentes anti-bacterianos usados em medicina dentária e às condições financeiras dos países em desenvolvimento, cria uma necessidade urgente de encontrar opções de tratamento alternativas que sejam efetivas, seguras e economicamente viáveis.²

Desde os primórdios que as plantas medicinais são utilizadas no tratamento e prevenção de inúmeras doenças humanas. Os seus extratos provaram ser fontes abundantes de componentes ativos, muitos dos quais foram a base no desenvolvimento de produtos de saúde à base de plantas. Está cientificamente provado que a utilização isolada ou em combinação de plantas medicinais ou dos seus extratos é eficaz e segura no tratamento e na prevenção de vários problemas de saúde oral, como a halitose, gengivite, úlceras e cáries dentárias e que os seus componentes ativos restauram a saúde com efeitos secundários mínimos e máxima eficácia.¹

Neste trabalho, apresenta-se uma análise fundamentada sobre a utilização de extratos não voláteis e óleos essenciais (extratos voláteis) de plantas medicinais com elevado potencial na prevenção da cárie dentária. Tal análise incidiu, sobretudo, no tratamento de informação sobre plantas medicinais com uso tradicional comprovado, considerando ensaios *in vivo* e *in vitro*. Para enquadramento do tema, apresentam-se nas secções imediatas uma breve introdução sobre a cavidade oral, a cárie dentária e as suas terapêuticas convencionais.

2| Cavidade Oral

A cavidade oral é a primeira porção do trato gastrointestinal e pode ser dividida em dois compartimentos: uma porção interna – palatina no maxilar, lingual na mandíbula, e outra porção externa – vestibulo. A zona palatina/lingual integra tudo o que se encontra internamente às arcadas dentárias. O vestibulo corresponde ao espaço delimitado externamente, pelos lábios e pelos músculos mastigatórios e, internamente, pelos dentes e a gengiva.³

A cárie dentária é uma das doenças da cavidade oral com maior prevalência a nível mundial. Posto isto, torna-se fulcral o conhecimento da principal estrutura envolvida – o dente.

2.1| Dente: Considerações Gerais

Os dentes são estruturas duras de cor branca, altamente mineralizadas, implantadas nas gengivas e em cavidades presentes na mandíbula e na maxila, denominadas alvéolos dentários. Estes estão principalmente envolvidos nos processos de mastigação dos alimentos e auxílio da fala e podem ser categorizados como incisivos, caninos, pré-molares e molares.

Os seres humanos possuem, durante o seu período de vida, dois conjuntos de dentes: dentes decíduos, comumente chamados de “dentes de leite”, e que constituem a nossa primeira dentição; e dentes permanentes, dentição secundária que vai substituindo os dentes decíduos. Aproximadamente, entre os 6 e os 12 anos, ambos os conjuntos de dentes coexistem na cavidade oral, denominando-se dentição mista.⁴

Anatomicamente, o dente é uma estrutura complexa. Cada dente maduro completamente erupcionado é constituído por coroa e raiz, sendo que a porção do dente exposta na cavidade oral é denominada coroa e a porção inserida na crista óssea é denominada raiz.³ A coroa do dente é composta por três camadas: uma camada mais externa e extremamente dura – esmalte, outra intermédia e moderadamente dura – dentina, e uma camada mais interna, envolvida pela dentina, que contém vasos sanguíneos, vasos linfáticos, e nervos – polpa. Na raiz, a dentina continua a envolver a polpa, porém o esmalte é “substituído” pelo cimento que, por sua vez, está em contacto com o ligamento periodontal, material com propriedades elásticas, que absorve e distribui as forças exercidas durante a mastigação e permite ancorar o dente ao alvéolo dentário, mantendo-o fixo na sua posição (Figura 1).⁵

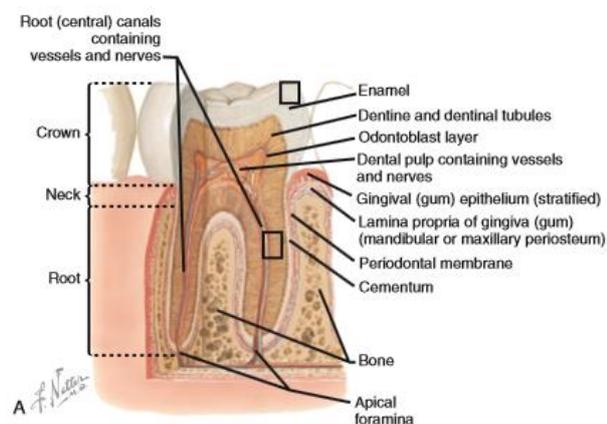


Figura 1 – Anatomia da peça dentária.⁴

2.1.1| Esmalte e Dentina: Composição

O esmalte é composto por cerca de 96% de cristais altamente organizados de apatite de cálcio, tanto na forma de hidroxiapatite (HAP) como na forma de fluoroapatite (FAP). A elevada concentração mineral confere ao esmalte elevada dureza e resistência contra agressões.

A dentina é composta por cerca de 68% de HAP, sendo que grande parte da sua matriz orgânica é composta por colagénio. O facto de possuir menos concentração mineral associada à presença de colagénio confere alguma elasticidade a esta camada, servindo assim de suporte ao esmalte e impedindo a fratura do dente.⁶

2.2| Glândulas Salivares

As glândulas salivares são glândulas exócrinas responsáveis pela produção de uma secreção, a saliva. Existem três pares de glândulas salivares principais: as parótidas, as submandibulares e as sublinguais.⁴

A saliva é uma secreção maioritariamente aquosa, cerca de 99% de água, composta por eletrólitos – sódio, potássio, cálcio, cloro, magnésio, bicarbonato, fosfato e flúor; e proteínas – maioritariamente enzimas, imunoglobulinas e certos polipeptídeos e oligopeptídeos, essenciais na manutenção da saúde oral. Contém também substâncias como a ureia e possui um pH neutro, geralmente entre 6 e 7.^{7,8} Esta apresenta um papel importante na proteção e lubrificação da cavidade oral, através de vários processos, tais como:

- Eliminação de hidratos de carbono presentes em excesso, limitando a disponibilidade de açúcares para os microorganismos presentes na placa bacteriana. Sendo que, quanto maior o fluxo salivar, maior a sua capacidade de “limpeza”;
- Prevenção da colonização da cavidade oral por potenciais microorganismos patogénicos devido à capacidade de aumentar o pH do meio – capacidade tampão, contrariando as condições ideais para o seu desenvolvimento. Deste modo, previne a desmineralização do esmalte por microorganismos acidogénicos. A ureia é uma das substâncias responsáveis por este aumento do pH, bem como, o bicarbonato que possui a capacidade de neutralizar os ácidos;
- Manutenção da integridade física e química do esmalte dentário, modulando o processo de desmineralização-rem mineralização. Os principais fatores responsáveis pela estabilidade da HAP do esmalte são o pH salivar e a presença de cálcio, fosfato e flúor. Elevadas concentrações de cálcio e fosfato auxiliam a remineralização, enquanto a presença de

flúor reduz a perda mineral durante períodos ácidos, diminuindo a solubilidade da HAP, tornando-a, deste modo, mais resistente à desmineralização.^{7,9}

Contudo, a secreção salivar pode ser afetada por inúmeros fatores, como o exercício físico, o consumo de álcool, a presença de doenças crônicas, alterando a sua composição e comprometendo assim as suas funções.⁷

3| Cárie Dentária

3.1| Epidemiologia

A cárie dentária tem elevada incidência em todo o mundo, sendo considerada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como um grave problema de Saúde Pública que afeta pessoas de todas as idades.¹⁰

No ano de 2004, segundo dados fornecidos pela OMS, a América e a Europa foram os continentes que apresentaram maior prevalência de cáries dentárias em crianças em idade escolar, contrariamente ao continente africano (Figura 2). Resultados semelhantes foram obtidos para a população adulta, com o continente sul-americano e a grande maioria dos países desenvolvidos a apresentarem um maior registo de cáries dentárias, em detrimento dos continentes africano e asiático (Figura 3). Todavia, no futuro, prevê-se uma inversão destas prevalências. Isto porque, nos países em vias de desenvolvimento a tendência será a de aumentar o consumo de açúcares, enquanto nos países desenvolvidos a aplicação de medidas de Saúde Pública, associadas a alterações no estilo de vida e a melhorias nas práticas de higiene oral, resultará na diminuição desta prevalência.^{11,12}

Fig. 1. Dental caries levels (Decayed, Missing and Filled Teeth (DMFT) Index) among 12-year-olds worldwide, December 2004

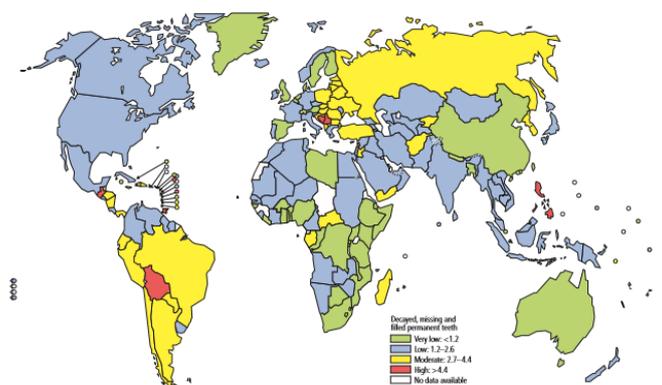


Figura 2 – Prevalência mundial da cárie dentária entre crianças com 12 anos de idade.¹¹

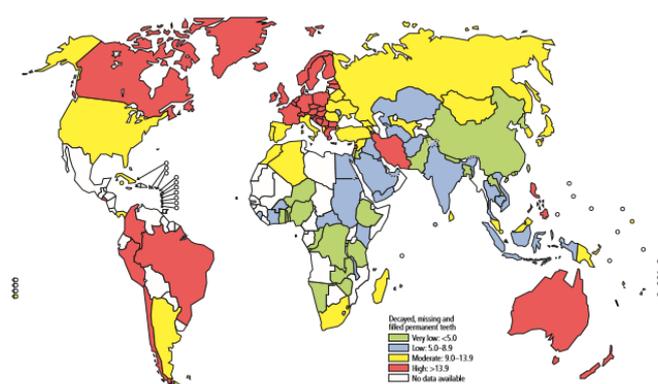


Figura 3 – Prevalência mundial da cárie dentária em adultos com idades entre os 35 e os 44 anos.¹¹

3.2| Etiologia

Trata-se de uma doença de origem polimicrobiana e de caráter multifatorial, sendo necessário a interação de vários fatores, em condições críticas, durante um certo período de tempo, para que esta se expresse clinicamente. Ou seja, não depende unicamente dos fatores relacionados com o “agente”, de que fazem parte os microorganismos cariogênicos, sendo também necessária a presença de fatores relacionados com o “hospedeiro” e com o “ambiente” envolvente.¹⁰

Assim, os fatores etiológicos da cárie dentária podem ser agrupados em duas categorias: fatores primários essenciais e indispensáveis à ocorrência da cárie, como é o caso de tecidos dentários susceptíveis à dissolução ácida, substrato adequado à satisfação das necessidades energéticas das bactérias cariogênicas - hidratos de carbono, e a saliva; e fatores secundários, que influenciam a evolução de lesões e que, atuando isoladamente ou em combinação, influenciam também, de modo importante, cada um dos fatores primários podendo interferir no processo de aparecimento e desenvolvimento da cárie dentária. Alguns exemplos de fatores secundários são a presença de flúor na cavidade oral, a higiene oral, o estado de saúde geral do hospedeiro, a predisposição genética e o estatuto socioeconómico.¹⁰

3.3| Fisiopatologia

A cárie dentária pode ser definida como uma desmineralização da superfície do dente, iniciando no esmalte e afetando posteriormente ou não a dentina, causada por um desequilíbrio no processo de desmineralização-rem mineralização que acontece constantemente à superfície do dente.¹³

A desmineralização é causada por ácidos, principalmente ácido láctico, produzidos por fermentação bacteriana de hidratos de carbono ingeridos na dieta, nomeadamente a sacarose. No caso da exposição aos ácidos ser curta, a saliva aumenta naturalmente o pH do meio para que ocorra reparação do mineral perdido. No entanto, a constante exposição a ácidos, no caso de uma dieta rica em hidratos de carbono, pode levar à dissolução da superfície das peças dentárias, criando uma situação de desequilíbrio em que a taxa de remineralização seja insuficiente para reparar a taxa de desmineralização, aumentando a possibilidade de ocorrência de cárie dentária.^{14,10}

Apesar dos inúmeros microorganismos que integram a cavidade oral humana, são as bactérias Gram-positivas com capacidade acidogénica e acidófila, principalmente *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus acidophilus* e *Actinomyces* spp., as principais responsáveis pelo desenvolvimento da cárie dentária.¹⁵ Porém, o *Streptococcus mutans* tem vindo a ser apontado como o principal agente causador desta doença em humanos, dado que apresenta várias vantagens adaptativas relativamente às restantes bactérias presentes na cavidade oral:

- Capacidade de utilizar eficazmente a sacarose ingerida na dieta para sintetizar Polissacáridos Extracelulares (EPS);
- Capacidade de aderir firmemente a superfícies revestidas por glucanos;
- Capacidade acidogénica;
- Elevada tolerância a ácidos.^{16,17}

Um elemento fundamental no desenvolvimento da cárie dentária é a presença da placa bacteriana.¹⁰ A placa bacteriana integra uma comunidade complexa e estruturalmente organizada, constituída por múltiplas espécies de bactérias aderentes a uma superfície sólida e rodeadas por polissacáridos extracelulares e proteínas microbianas, sendo considerada um biofilme natural. A placa bacteriana constitui assim um microambiente propício ao desenvolvimento bacteriano.^{15,18}

Os polissacáridos presentes na placa bacteriana podem ser divididos em duas categorias: Polissacáridos Extracelulares (EPS), caracterizados por promoverem a adesão e a acumulação bacteriana na superfície do dente, por influenciarem as propriedades físicas e bioquímicas do biofilme e por conferirem proteção bacteriana; e Polissacáridos Intracelulares (IPS), fontes endógenas de hidratos de carbono que podem ser metabolizados em ácidos orgânicos durante períodos de privação de nutrientes. O *Streptococcus mutans* sintetiza EPS, nomeadamente glucanos solúveis e insolúveis, utilizando a sacarose como substrato principal. Esta síntese ocorre através da ação enzimática de enzimas bacterianas Glucosiltransferases (GTFs), também sintetizadas pela bactéria *Streptococcus mutans*. Os glucanos, polímeros de

glucose com propriedades altamente adesivas, são considerados críticos na produção da placa bacteriana, isto porque possuem a capacidade de promover a adesão das bactérias cariogênicas à superfície do dente. Acrescente-se ainda a capacidade dos EPS em aumentarem o volume, a porosidade e a estabilidade da matriz da placa bacteriana, permitindo uma difusão eficaz da sacarose até às zonas mais profundas do biofilme, resultando na sua metabolização e numa diminuição acentuada do pH, promovendo o desenvolvimento da cárie dentária.^{19,20,21}

A formação da placa bacteriana é um processo complexo que se inicia com o aparecimento, na superfície do dente, de uma fina película composta essencialmente por proteínas. As GTFs sintetizadas pelo *Streptococcus mutans* são posteriormente adsorvidas tanto nesta película como na superfície de bactérias cariogênicas, mesmo que não sejam produtoras de GTF, como é o caso da *Actinomyces* spp. . Depois de adsorvidas, as GTFs metabolizam a sacarose ingerida na dieta sintetizando glucanos solúveis e insolúveis *in situ*. Concomitantemente, a sacarose é também metabolizada em ácidos pelo *Streptococcus mutans*. As moléculas de glucano sintetizadas fornecem locais de ligação com elevada afinidade para as bactérias cariogênicas, mediando a sua agregação e adesão à superfície do dente. Caso o biofilme permaneça na superfície do dente e exista frequente ingestão de hidratos de carbono, a quantidade de EPS e a extensão de acidificação vão aumentar. Tais condições originam alterações bioquímicas, ecológicas e estruturais, favorecendo a sobrevivência e a dominância de organismos acidogênicos tolerantes a alterações do meio, resultando numa desmineralização do esmalte dentário (Figura 4).^{16,22} Torna-se, portanto, claro que tanto os EPS como a acidificação da matriz do biofilme desempenham papéis cruciais na perturbação da homeostasia desmineralização-remineralização, promovendo o desenvolvimento da placa bacteriana e, conseqüentemente, da cárie dentária.²¹

Resumindo, a manifestação clínica da cárie dentária resulta de interações estabelecidas entre as bactérias que colonizam a superfície do dente e os hidratos de carbono ingeridos na dieta, responsáveis pela produção de um biofilme estruturalmente complexo e organizado. O pH ácido característico da interface dente-biofilme resulta num aumento da desmineralização do esmalte, conduzindo ao desenvolvimento da doença.

3.4| Estratégias de Prevenção Convencionais

Atualmente, existem duas estratégias utilizadas na prevenção da cárie dentária: mecânicas e químicas.

As estratégias mecânicas caracterizam-se por uma remoção segura e eficaz da placa bacteriana através da utilização de escova de dentes, fio dentário e pasta dentífrica.²³

As estratégias químicas previnem a adesão, a colonização e o metabolismo bacteriano comprometendo assim o seu desenvolvimento. São exemplos a clorhexidina e o flúor, substâncias de referência contra a placa bacteriana e partes integrantes da composição de diversas pastas dentífricas e colutórios e também os antibióticos.^{23,24,25}

Saliente-se, contudo, que ambas as estratégias possuem algumas limitações. As mecânicas não atingem as partes mais inacessíveis da cavidade oral e a utilização prolongada das substâncias químicas está associada a efeitos secundários indesejados, nomeadamente, a descoloração acastanhada das peças dentárias, a alteração do paladar, a ulceração da mucosa oral, a fluorose e a resistência a antibióticos. Importa ainda referir que a utilização de antibióticos com largo espectro de ação, atinge não só as bactérias cariogênicas, mas também a flora comensal, criando um ambiente propício para a recolonização da cavidade oral pelos agentes patogênicos.^{24,25,26}

Surge, portanto, a necessidade de encontrar novas alternativas ou complementos terapêuticos mais seguros, eficazes e menos tóxicos.

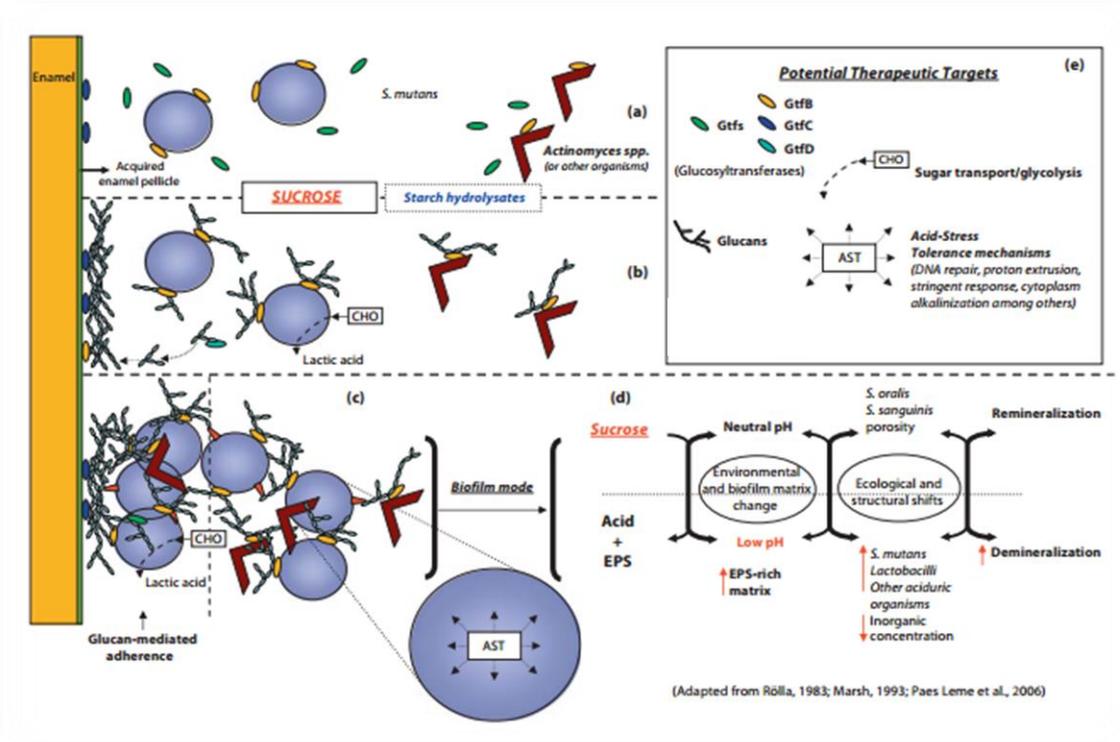


Figura 4 – Formação da placa bacteriana.¹⁶

4| Produtos de Origem Vegetal – Nova Estratégia na Prevenção da Cárie Dentária

4.1| Extratos de Plantas

Os extratos vegetais são normalmente misturas complexas que integram múltiplos constituintes, nomeadamente, glucósidos, polissacáridos, ácidos, polifenóis, terpenos, flavonóides, alcalóides, entre outros. Estes compostos são os responsáveis pelas múltiplas propriedades biológicas que as plantas apresentam, onde se inclui as propriedades anti-oxidante, anti-fúngica e anti-bacteriana.²⁷

4.1.1| *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze

Considerações Gerais

A *Camellia sinensis* é um arbusto de pequeno porte, de origem asiática pertencente à família *Theaceae*.¹⁵ As folhas são a parte mais utilizada da planta e consoante o seu tipo de processamento podem ser produzidos fundamentalmente três tipos de chá: chá verde – folhas não fermentadas, chá preto – folhas fermentadas, e chá oolong – folhas semi-fermentadas. O chá verde apresenta uma constituição variada, possuindo desde metilxantinas, sais minerais, proteínas e vitaminas (B1,B2,C), no entanto, são os polifenóis os seus componentes maioritários (cerca de 30%), com principal destaque para os flavonóides.^{24,28} Os principais flavonóides presentes no chá verde são as catequinas, nomeadamente: (-)-epigallocatequina-3-galhato, (-)-epigallocatequina, (-)-epicatequina-3-galhato e (-)-epicatequina.²⁹ Por não ser fermentado, o chá verde possui mais catequinas do que os outros chás supracitados e apresenta propriedades anti-oxidantes, anti-virais e anti-tumorais.²⁴

Ensaio

Com o objetivo de avaliar a atividade anti-microbiana do extrato etanólico de folhas de *Camellia sinensis* contra bactérias cariogénicas, nomeadamente *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus acidophilus*, foi realizado um estudo *in vitro*²⁴, tendo os autores concluído que o chá verde apresenta atividade anti-bacteriana contra as duas bactérias supracitadas. O Método de Difusão em Agar revelou halos de inibição de 18.33 mm para o *Streptococcus mutans* e de 12.67 mm para o *Lactobacillus acidophilus* (extrato etanólico de 300 µg), em comparação com uma solução de 0,2% de clorhexidina cujos halos de inibição foram 14.67 mm e 7.33 mm, respetivamente.²⁴ Segundo Puneet Goenka e colegas,³⁰ os compostos ativos

presentes no chá verde - polifenóis, principalmente as catequinas, são os responsáveis pela atividade anti-microbiana do extrato: a (-)-epigalocatequina-3-galato possui capacidade de lisar a membrana bacteriana e de prevenir o enrolamento do DNA (*super-coiling*), acabando por destruí-la; a (-)-epigalocatequina possui a capacidade de interagir com proteínas, alterando as suas estruturas terciárias, podendo deste modo afetar as enzimas GTFs, impedindo a metabolização da sacarose ingerida na dieta e a produção de ácidos e de EPS necessários para a formação da placa bacteriana.

Um outro ensaio *in vivo*³¹ avaliou a eficácia dos polifenóis presentes no chá verde na redução dos níveis salivares de *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus* spp. . Este foi efetuado em 66 voluntários, de ambos os sexos (36 sexo feminino e 30 sexo masculino) com idades entre os 12 e os 18 anos, selecionados de acordo com os critérios de inclusão. Os voluntários foram aleatoriamente divididos em dois grupos: grupo experimental (n=33) e grupo controlo (n=33), sendo que o grupo experimental foi submetido a um colutório preparado a partir de folhas pulverizadas de *Camellia sinensis* e o grupo controlo submetido a um colutório, cuja formulação incluía simplesmente água destilada e corante. Comparativamente ao grupo controlo, os resultados obtidos mostraram uma redução dos níveis salivares de *Streptococcus mutans* e de *Lactobacillus* spp. em 60% e em 42,2% dos voluntários, respetivamente. A redução observada ter-se-á devido às propriedades anti-bacterianas dos polifenóis, principalmente das catequinas, apoiando a hipótese de que os extratos de chá verde exercem efeitos anti-cariogénicos.³¹

4.1.2| *Vaccinium macrocarpon* Aiton

Considerações Gerais

Vaccinium macrocarpon é um arbusto que cresce em turfeiras de regiões frias da América do Norte. O seu fruto, o arando, é uma fonte rica de flavonóides, nomeadamente flavonóis, antocianidinas e proantocianidinas (PAC), compostos ativos que apresentam potencial terapêutico em doenças relacionadas com biofilmes. As PAC, também denominadas taninos condensados, presentes no arando, caracterizam-se estruturalmente como oligómeros ou polímeros de catequinas monoméricas (3-flavanóis) e de leucoantocianidinas (3,4-flavanodióis) e podem ser divididas em dois tipos: tipo A, possuem pelo menos uma dupla ligação interflavânica; e tipo B, só possuem ligações simples.³² Atualmente, o fruto está fortemente associado à prevenção de infeções urinárias, devido à capacidade que os polifenóis apresentam de inibirem a adesão da bactéria *Escherichia coli* à

mucosa do trato urinário. Alguma atenção tem sido dada à sua potencial atividade anti-cariogénica.^{33,34}

Ensaio

Hyun Koo³⁴ conduziu um estudo que pretendeu avaliar a influência de um extrato purificado e quimicamente definido de PAC no desenvolvimento de cáries dentárias *in vivo* e determinar o seu efeito inibitório na síntese de glucanos e na redução do pH pelo *Streptococcus mutans*, através de um ensaio *in vitro*.

Os resultados *in vitro*, realizados em discos de hidroxiapatite adsorvidos com saliva e posteriormente inoculados com *S. mutans* mostraram que, em resultado da aplicação do extrato (1 minuto, duas vezes ao dia, durante 4 dias), ocorreu uma redução significativa na formação do biofilme e na quantidade total de EPS (entre 35% a 40%), revelando este ser mais eficaz do que o flúor 250 ppm. A diminuição da quantidade total de EPS está diretamente relacionada com a redução da formação do biofilme, uma vez que estes são essenciais para a adesão e acumulação da bactéria na superfície da peça dentária, bem como para a integridade estrutural do biofilme. A redução da síntese de glucanos é consistente com a inibição eficaz das enzimas GTFs. O mecanismo pelo qual as PAC inibem as enzimas GTFs é desconhecido, porém sugere-se que esteja relacionado com as suas características estruturais únicas, nomeadamente a presença de uma ligação dupla do tipo A, (confere rigidez à molécula) e o seu grau de polimerização. Além disso, as PAC demonstraram possuir capacidade de se ligar a proteínas, formando complexos proteína-polifenol, podendo deste modo afetar a atividade enzimática, ligando-se irreversivelmente ao domínio catalítico da enzima. O extrato de PAC demonstrou ainda diminuir a capacidade acidogénica do *Streptococcus mutans*.

Relativamente aos resultados obtidos no modelo *in vivo*, ratinhos Sprague-Dawley com 14 dias de idade foram infetados com *Streptococcus mutans* e submetidos a uma dieta cariogénica – com elevados teores de glucose, por forma a promover a infeção. A exposição diária a uma fração purificada de PAC alterou o desenvolvimento da cárie dentária, diminuindo tanto a incidência como a severidade das lesões cariogénicas.³⁴

Apesar de apresentar resultados promissores, o extrato de PAC não foi tão eficaz na redução da cárie dentária, como o tratamento com flúor 250 ppm. Não obstante, os resultados apresentados demonstram uma alternativa auspiciosa que parece estar grandemente envolvida na sua inibição efetiva da atividade das enzimas GTFs e da glicólise bacteriana, impedindo a fermentação da sacarose e a formação de ácidos e polissacáridos, atenuando a patogenicidade do *Streptococcus mutans*.³⁴

4.1.3| *Stevia rebaudiana* Bertoni

Considerações Gerais

Stevia rebaudiana é um arbusto perene, originário do Paraguai e do Brasil, pertencente à família *Asteraceae*. As folhas são a parte mais utilizada da planta e possuem um elevado conteúdo de diterpenos doces, entre 4 a 20%, principalmente na forma de glucósidos, sendo o Steviósido e o Rebaudiósido A os mais representativos. Estruturalmente estes compostos são muito semelhantes: o Steviósido é constituído por três moléculas de glucose ligadas a um composto não glucídico (uma molécula de steviol) e é cerca de duzentas a trezentas vezes mais doce do que a sacarose (solução de 0,4%). Por outro lado, o Rebaudiósido A, com mais uma molécula de glucose na sua constituição, é duzentas e cinquenta a quatrocentas e cinquenta vezes mais doce do que a sacarose.³⁵ Os extratos de *Stevia rebaudiana* têm promovido inúmeras vantagens quando utilizados como suplemento alimentar, por exemplo, reduzem a pressão arterial em doentes hipertensos e têm efeitos benéficos no metabolismo da glucose em doentes diabéticos. Além disso, demonstraram também potencial na prevenção da cárie dentária, devido a possíveis propriedades antibacterianas e à redução da ingestão de hidratos de carbono fermentáveis.^{36,35}

Ensaio

O efeito de extratos de *Stevia rebaudiana* na formação de biofilmes pelo *Streptococcus mutans in vitro* e também sobre o valor de pH da placa bacteriana *in vivo* foi alvo de um estudo que conclui que estes possuem atividade não cariogénica.³⁵

Os resultados *in vitro*, realizados numa placa *microwell* de 96 poços, à qual foi adicionada *Streptococcus mutans* e três soluções – Steviósido, Rebaudiósido A e Sacarose, apresentaram colonização bacteriana em todos os poços, mas em maior grau naqueles em que tinha sido adicionada solução de sacarose. Sendo que a densidade ótica das colónias foi de 146.93 ± 5.44 , 137.85 ± 5.42 , 429 ± 59.93 , para o Steviósido, Rebaudiósido A e para a Sacarose, respetivamente. Estes dados sugerem que os extratos de *S. rebaudiana* não promoveram o crescimento do *Streptococcus mutans in vitro*, diminuindo a formação do biofilme do principal agente cariogénico.

Paralelamente, o estudo *in vivo* foi realizado em 20 voluntários saudáveis (12 do sexo masculino e 8 do sexo feminino) com idades entre os 19 e os 26 anos, selecionados de acordo com os critérios de inclusão. Os voluntários foram submetidos a três soluções – uma contendo Steviósido, outra Rebaudiósido A e outra Sacarose, seguindo o seguinte procedimento: bochechar durante 1 minuto a primeira solução e efetuar-se a medida do pH

aos 5, 10, 15, 30, 45 e 60 minutos. Após este procedimento, o voluntário faz uma pausa de 48 horas até se efetuar o ensaio com a segunda solução, que segue a mesma metodologia de medição de pH, e depois com a última solução. Os resultados mostraram diferenças significativas no pH, uma vez que, após os 5, 10, 15 e 30 minutos a solução de sacarose produziu valores significativamente mais baixos de pH comparativamente aos extratos de *Stevia*, sugerindo que ambos os extratos não promovem o metabolismo acidogénico, exercendo um efeito inibitório no processo de fermentação bacteriana de hidratos de carbono.

Podemos então concluir que a utilização de *Stevia rebaudiana* constitui uma alternativa na prevenção da cárie dentária.³⁵

4.1.4| *Zingiber officinale* Roscoe

Considerações Gerais

Zingiber officinale, ou gengibre, pertence à família *Zingiberaceae* e é originária do sudoeste asiático. É uma planta medicinal muito importante e bem estudada, sendo que, atualmente, é utilizada tanto na medicina tradicional como na medicina moderna, no tratamento de transtornos intestinais.³⁷ Além disso, possui também inúmeras propriedades farmacológicas, tais como, anti-inflamatória, anti-microbiana, analgésica, anti-oxidante e hepatoprotetora.²⁵ O rizoma é a parte mais utilizada da planta, cuja atividade biológica advém dos seus componentes ativos, os gingeróis – séries homólogas de compostos fenólicos, sendo o mais abundante o 6-gingerol.^{38,39,28}

Ensaio

A atividade *in vitro* do extrato bruto e da fração metanólica de rizomas de *Zingiber officinale* contra as propriedades cariogénicas do *Streptococcus mutans* foi alvo de análise num estudo²⁵, que sugeriu que estes extratos inibem fortemente uma variedade de propriedades virulentas importantes para a patogénese da bactéria. Ambos mostraram diminuir a formação e maturação do biofilme e inibir a atividade das enzimas GTFs, tendo este facto conduzido, conseqüentemente, a uma inibição da adesão bacteriana à superfície do dente. Demonstraram ainda perturbar a capacidade acidogénica e acidófila da bactéria *Streptococcus mutans*, uma vez que aumentaram o valor de pH do meio. Este aumento pode também estar relacionado com a inibição das enzimas GTFs bacterianas. Conclui-se então, através dos estudos *in vitro*, que os ambos os extratos possuem atividade anti-cariogénica.²⁵

Utilizando os extratos supracitados, foram também efetuados estudos *in vivo* em 30

ratinhos, os quais foram divididos em três grupos: um grupo de controle e dois grupos experimentais, um para o extrato bruto e outro para a fração metanólica. Numa fase inicial, todos os grupos foram testados para confirmar a ausência de *S. mutans* e, posteriormente, foram inoculados com uma estirpe da mesma bactéria associada a uma dieta rica em sacarose, com o objetivo de estimular a infecção. O tratamento com os extratos foi efetuado duas vezes por dia e foram retiradas amostras, por meio de esfregaço, no primeiro dia e nas 1^a, 3^a, 6^a, 8^a e 10^a semanas após a inoculação. Os resultados mostraram uma redução significativa na recuperação do *Streptococcus mutans* ao longo das várias semanas, bem como da severidade das lesões cariogénicas, com ambos os extratos. Contudo, o extrato bruto apresentou melhor desempenho comparativamente à fração metanólica, apresentando reduções na ordem dos 80% a 86%.²⁵

Conclui-se então, que *Zingiber officinale* apresenta potencial terapêutico na prevenção da cárie dentária.²⁵

4.1.5| *Withania somnifera* (L.) Dunal

Considerações Gerais

Withania somnifera é um subarbusto lenhoso pertencente à família *Solanaceae*, que vegeta na zona mediterrânica, África Austral e Índia. As partes mais utilizadas da planta são as folhas e as raízes, sendo que os seus compostos ativos principais são os alcalóides tropânicos – tropina, e outros alcalóides – isopeletierina, e os vitanólidos – vitanólido A, vitanólido B, vitanósido IV e vitaferina A, esteróides derivados do ergostano em que os carbonos 22 e 26 são oxidados formando um núcleo γ -lactónico.²⁸ Esta planta é utilizada tradicionalmente, em particular, na Índia, em situações de *stress*, para reduzir a ansiedade e facilitar o sono.²⁸ No entanto, são inúmeras as atividades biológicas que possui, como por exemplo, anti-inflamatória, anti-oxidante e imunomoduladora. Além disso, *Withania somnifera* apresenta também atividade no controlo de doenças da cavidade oral, como é exemplo a cárie dentária.^{17,40}

Ensaio

Santosh Pandit e colegas¹⁷ realizaram estudos *in vitro*, com o objetivo de avaliarem o efeito do extrato metanólico da raiz de *Withania somnifera* na adesão à superfície da peça dentária, na produção de ácido, na tolerância ao ácido e na formação de EPS pela bactéria *Streptococcus mutans*. Para avaliar a formação do biofilme, foi efetuado um ensaio em placas de 24 poços contendo discos de hidroxiapatite adsorvidos com saliva e foram observados os

seguintes resultados: em todos os poços onde foi adicionado extrato metanólico verificou-se uma redução, em cerca de 50%, do biovolume de *S. mutans* – volume de biomassa dividido pela área do disco de hidroxiapatite, apesar de não existir qualquer diferença na sua espessura. Este resultado revela claramente que a adesão da bactéria aos discos de HAP foi comprometida e que pode estar intimamente relacionada com a atividade das enzimas GTFs, responsáveis pela formação de EPS. No entanto, os resultados indicaram que a atividade do extrato metanólico não afeta diretamente a atividade das enzimas GTFs, mas sim a formação dos EPS, que apresentaram valores de biovolume e espessura mais baixos do que o grupo de controlo. Relativamente à capacidade acidogénica e acidófila do *Streptococcus mutans*, foram efetuados dois ensaios, um que analisa o pH no biofilme – *Glycolytic pH-Drop* – e outro que analisa a capacidade das bactérias do biofilme sobreviverem a um pH de 2.5 - *Acid Killing Assay*. No primeiro ensaio, o extrato metanólico de *Withania somnifera* reduziu a produção de ácido pela bactéria. No segundo ensaio, a tolerância ao ácido pelo *Streptococcus mutans* revelou-se menor na presença do extrato, facto demonstrado por uma redução na quantidade de *Streptococcus mutans* sobreviventes. O possível mecanismo pelo qual o extrato metanólico de *Withania somnifera* reduz a formação de EPS está relacionado com a sua capacidade de perturbar a tolerância do *Streptococcus mutans* a ambientes ácidos, afetando deste modo a síntese de GTFs e, por sua vez, a produção de EPS. Por último, foi ainda avaliada a síntese de EPS através de um ensaio de fluorescência, no qual foi utilizada uma molécula fluorescente que se liga às enzimas GTFs e que é, posteriormente, incorporada nas EPS sintetizadas, tendo-se observado uma redução na sua formação. Este resultado sugere que o extrato reduz o desenvolvimento e acumulação do biofilme bacteriano.

Apesar de ser necessária a realização de mais estudos, por forma a demonstrar quais os mecanismos e quais os componentes biológicos envolvidos nos vários processos, estes resultados revelam-se muito satisfatórios ao inibir as principais características virulentas do *Streptococcus mutans*: a adesão bacteriana, a produção de ácido, a tolerância ao ácido e a formação de EPS, revelando-se uma estratégia promissora na prevenção da cárie dentária.¹⁷

4.1.6| *Salvadora persica* L.

Considerações Gerais

Salvadora persica, pertencente à família *Salvadoraceae*, é uma árvore de pequeno porte que possui uma vasta distribuição geográfica, desde a Índia, Nepal, Malásia, Irão, Iraque, Arábia Saudita, Egipto até África. Trata-se de um planta bastante resistente a agressões do meio, conseguindo sobreviver em condições extremas, como por exemplo, altitudes

elevadas e secura extrema. As partes lenhosas e finas dos ramos e raízes desta árvore são utilizadas na Argélia como “escovas de dentes”, sendo comumente designadas de *miswak*. A análise química do *miswak* confirma a presença de β -sitosterol, ácido m-anísico, cloretos e outros compostos como a pirrolidina e os derivados de piperidina, glucósidos como o salvadósido e o salvadorasido e flavonóides, como o canferol e quercetina. As raízes e a casca de *Salvadora persica* são compostas por uma elevada quantidade de alcalóides, como a salvadorina e trimetilamina, cloretos e fluoretos. É uma planta promissora em variadas áreas, dado que possui atividade analgésica, anti-micótica, citotóxica, diurética e anti-convulsionante.⁴¹ No entanto, as atividades anti-bacteriana e anti-placa bacteriana são as principais, sendo por isso recomendada pela OMS como um meio efetivo de higiene oral a utilizar em países em desenvolvimento.^{42,43}

Ensaio

Ensaio *in vitro* e *in vivo*⁴³ realizados com o objetivo de avaliar a atividade anti-microbiana do extrato metanólico de *Salvadora persica* em estirpes bacterianas presentes na cavidade oral de crianças em idade escolar com e sem lesões cariosstáticas, demonstraram que este exibe um forte efeito anti-microbiano. No ensaio *in vitro*, o extrato apresentou maior ação anti-bacteriana contra bactérias Gram-negativas (halos de inibição entre 6.5 e 12 mm) do que contra bactérias Gram-positivas (halos de inibição entre 1 e 8 mm). No ensaio *in vivo* o extrato de *Salvadora persica* foi utilizado na preparação de um colutório que revelou exercer efeito anti-bacteriano, diminuindo os níveis de *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus* spp. em ambos os grupos – com e sem lesão cariogénica.

Um ensaio realizado no Zimbabué,⁴³ em crianças que utilizam diariamente *miswak* na sua higiene oral, demonstrou que estes apresentam menos cáries do que as crianças que utilizam a escova de dentes e pasta dentífrica convencional.

Outro estudo,⁴⁴ utilizando um colutório constituído por um extrato aquoso de ramos de *Salvadora persica*, resultou numa redução de 84% na adesão de *Streptococcus mutans* a células do epitélio bucal.

Os resultados apresentados concluíram que o extrato de *Salvadora persica*, isolado ou na forma de colutório, afeta o crescimento da placa bacteriana em crianças em idade escolar, sugerindo que este possa ser uma alternativa eficaz. No entanto, são necessários estudos fitoquímicos, por forma a detetar quais as substâncias responsáveis pelos efeitos anti-microbianos.⁴³

4.2| Óleos Essenciais

Os óleos essenciais (OEs) têm despertado atenção dentro dos compostos bioativos com atividade anti-microbiana. Constituem uma mistura de componentes voláteis, produzidos por plantas aromáticas como mecanismo de proteção contra predadores, microorganismos e adversidades ambientais. Tendo em conta a sua diversidade estrutural, os OEs podem incluir compostos maioritariamente divididos em dois grupos: terpenos, como os monoterpenos e os sesquiterpenos; e compostos aromáticos, nomeadamente fenilpropanóides.³² Os monoterpenos são os componentes maioritários encontrados nos OEs e têm demonstrado elevado potencial anti-bacteriano contra microorganismos envolvidos na cárie dentária.⁴⁵

4.2.1| *Lippia sidoides* Cham.

Considerações Gerais

Lippia sidoides, comumente chamada alecrim-pimenta, é um arbusto com folhas odoríferas geralmente encontrado no norte brasileiro e que pertence à família *Verbenaceae*. Este arbusto é tipicamente utilizado como antisséptico tópico, no entanto o seu óleo essencial possui também atividade anti-inflamatória, anti-oxidante e gastroprotetora.⁴⁵ A sua atividade anti-microbiana tem sido associada à presença de dois monoterpenos, o timol (50-59%) e o carvacrol (7-16%), os quais possuem um largo espectro de ação anti-microbiano.⁴⁶

Ensaio

Um óleo essencial obtido de folhas de *Lippia sidoides* (OELS) contendo 93.36% de conteúdo total de timol e carvacrol, foi avaliado em 48 crianças em idade escolar de ambos os sexos, com, no mínimo, uma lesão cariogénica, por forma a aferir sobre a dose e formulação do OELS aceitável para seguir para ensaios clínicos. As crianças foram divididas em 10 grupos, sendo que 22 receberam tratamento tópico com colutório de OELS de diferentes concentrações (0.6, 0.8, 1 e 1.2%), 16 receberam tratamento tópico com gel de OELS também de diferentes concentrações (0.8, 1, 1.2, 1.4%) e 11 receberam tratamento com gel (n=5) ou colutório (n=6) da mistura de timol/carvacrol. Todos os tratamentos foram efetuados numa clínica dentária e a saliva foi recolhida antes (T0) e após o tratamento (T1). Os resultados demonstraram que colutórios com concentrações acima de 0.8% causavam sensação de queimadura, apesar de não causarem qualquer lesão nos tecidos orais. Dos diferentes grupos submetidos às diferentes concentrações de colutório, foi o de concentração 0.8% o que apresentou maior percentagem de redução de *Streptococcus*

mutans, enquanto nos diferentes grupos submetidos ao gel de OELS, foi o de concentração 1.4% que se revelou mais eficaz. Nos grupos sujeitos aos colutórios com diferentes concentrações de OELS, comparando os grupos entre T0 e T1, as concentrações de 0.6% e 1% apresentaram a maior percentagem de redução de *S. mutans*. No grupo de voluntários submetidos ao colutório com mistura de timol/carvacrol existiu também uma redução significativa da bactéria após o tratamento. Os resultados confirmam a capacidade desta mistura reduzir significativamente o *Streptococcus mutans*, bem como do colutório de concentração 0.8% e do gel de concentração 1.4%. No entanto, apesar da elevada eficácia da mistura timol/carvacrol, esta não foi superior às formulações de colutório e gel, demonstrando uma estreita ligação entre a eficácia anti-microbiana do óleo essencial e a ação dos seus constituintes maioritários.⁴⁶

Botelho e colegas⁴⁶ realizaram um estudo comparativo acerca da atividade anti-microbiana *in vitro* do OELS e dos seus constituintes maioritários – timol e carvacrol – contra o *Streptococcus mutans*, *S. mitis*, *S. salivarius* e *S. sanguis*. Os resultados mostraram boa atividade anti-bacteriana, tanto do óleo essencial como do timol e carvacrol, contra todas as bactérias, sendo que os monoterpenos inibiram o crescimento bacteriano em concentrações muito mais baixas. Conclui-se, portanto, que o óleo essencial de *Lippia sidoides* apresenta potencial contra lesões cariogénicas.

4.2.2| *Curcuma longa* L.

Considerações Gerais

Curcuma longa, usualmente chamado açafrão-da-índia, é um arbusto perene pertencente à família *Zingiberaceae*, que se encontra distribuído mundialmente por regiões tropicais, sendo extremamente cultivado nos países asiáticos, maioritariamente na China e Índia. A parte mais utilizada da planta são os rizomas, cuja constituição em óleo essencial varia entre 3 a 5%. O óleo essencial de *Curcuma longa* é composto maioritariamente por cetonas sesquiterpénicas como a α -tumerona e hidrocarbonetos sesquiterpénicos como o α -zingibereno.²⁸ *C. longa* possui atividade anti-bacteriana, hipotensora, anti-oxidante e branqueadora e é ainda utilizada na medicina oriental no tratamento de gastrites e dor de dentes, entre outras condições.^{47,48}

Ensaio

Foi avaliada a capacidade inibitória do óleo essencial de *Curcuma longa* no crescimento, produção de ácido, adesão e formação do biofilme pelo *Streptococcus mutans*.

Os resultados sugeriram que o óleo essencial nas concentrações 0.25, 0.5, 1, 2 e 4 mg/ml inibe o crescimento de *S. mutans* de uma forma dose-dependente, sendo que existe uma inibição significativa nas concentrações superiores a 0.5 mg/ml. Relativamente à inibição da produção de ácido, o óleo essencial mostrou inibir substancialmente a diminuição do pH pelo *Streptococcus mutans*, sugerindo que este reduz a produção de ácidos pela bactéria. No que concerne à inibição da adesão, o óleo essencial na concentração 0.5, 1, 2 e 4 mg/ml reprimiu significativamente esta capacidade da bactéria, em poços adsorvidos com cristais de hidroxiapatite, mas não de uma maneira dose-dependente. A inibição da formação do biofilme foi observada através de coloração dos poços com safranina, sugerindo que o óleo é capaz de inibir a formação do biofilme, sendo as concentrações de 2 e 4 mg/ml as que inibiram mais significativamente. Por último, avaliou-se a formação de biofilme pelo *S. mutans* em dentes de resina, e os resultados demonstraram uma inibição da formação do biofilme na superfície do dente nas concentrações de 2 e de 4 mg/ml. Este estudo mostrou a capacidade do óleo essencial de *Curcuma longa* inibir o crescimento, a produção de ácido, a adesão à HAP e a formação de biofilme pelo *S. mutans*, fornecendo bases científicas para o uso do óleo essencial no tratamento da cárie dentária.⁴⁸

4.2.3| *Mentha spicata* L. e *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh

Considerações Gerais

Mentha spicata ou hortelã é uma planta herbácea vivaz com um odor aromático característico. Pertence à família *Lamiaceae* e é nativa da região mediterrânica. Segundo Iraj Rasooli,⁴⁹ o óleo essencial extraído das suas folhas é maioritariamente constituído por limoneno (48%), piperitona (20,27%) e mentol (4,7%). A planta e os seus óleos essenciais são largamente utilizados na indústria cosmética, alimentar e farmacêutica, possuindo propriedades antissépticas, espasmolíticas e estimulante de secreções gástricas. As suas propriedades anti-bacterianas contra uma vasta gama de bactérias também são conhecidas.⁵⁰

Eucalyptus camaldulensis, pertencente à família *Myrtaceae*, é uma espécie de eucalipto originária do continente australiano. São árvores perenes, majestosas, com folhagem aromática que constitui uma excelente fonte de óleo essencial, com ampla utilização na indústria farmacêutica e em perfumaria.⁵¹ Segundo Iraj Rasooli,⁴⁹ o seu óleo essencial é maioritariamente constituído por 1,8- cineol (64%), α -pineno (9.6%), mircenol (7.4%) e γ -terpineno (7%) e é caracterizado por possuir atividades antifúngica e anti-bacteriana.⁵¹

Ensaio

Os óleos essenciais de *Mentha spicata* e *Eucalyptus camaldulensis* foram avaliados acerca do seu potencial efeito anti-microbiano contra *Streptococcus mutans* e *Streptococcus pyogenes*, com particular foco na formação de biofilme, *in vitro* e *in vivo*.⁴⁹

A inibição da formação do biofilme *in vitro* foi avaliada utilizando três concentrações dos óleos essenciais (1, 2 e 4 mg/mL), tendo como elemento comparativo a clorohexidina. Os resultados mostraram que a clorohexidina mostrou ser mais efetiva na concentração de 1 mg/mL, enquanto o óleo essencial de *Eucalyptus camaldulensis* apresentou atividade inibitória mais forte na concentração de 2 e 4 mg/mL. O óleo essencial de *Mentha spicata* demonstrou possuir atividade inibitória mais baixa do que os restantes. Nos estudos *in vivo*, foram inoculadas diferentes pastas dentífricas em 100 voluntários, os quais foram divididos em 3 grupos principais: grupo 1 – pasta dentífrica normal não fluorada; grupo 2 – pasta dentífrica obtida através da mistura da pasta do grupo 1 com as diferentes concentrações do óleo essencial; grupo 3 – pasta dentífrica não fluorada com 0,2% de clorohexidina. Aos voluntários foi dada instrução para lavarem os dentes duas vezes por dia durante 4 semanas. Os resultados obtidos mostraram que a atividade inibitória do óleo essencial de *E. camaldulensis* foi significativamente maior do que a do óleo de *M. spicata* e clorohexidina, conforme comprovam os seguintes resultados: óleos essenciais de *Mentha spicata* nas concentrações de 2, 4, 6 e 8 mg/mL foram respetivamente, 2.43%, 7.20%, 7.44%, e **9.66%**; a clorohexidina na concentração de 2 mg/mL apresentou um máximo de inibição da formação do biofilme de **13,9%** e os óleos essenciais de *Eucalyptus camaldulensis*, nas concentrações de 2, 4, 6 e 8 mg/mL foram respetivamente de 14.46%, 20.25%, 22.93%, **39.24%**.

Os resultados sugerem que os dois óleos essenciais possuem potencial anti-microbiano nas concentrações de 2 e 4 mg/mL, no entanto, a capacidade inibitória do óleo de *Eucalyptus camaldulensis* foi significativamente maior do que a do óleo de *Mentha spicata* e da clorohexidina.⁴⁹

4.2.4| *Ocimum americanum* L.

Considerações Gerais

Ocimum americanum, comumente chamado manjeriço, é uma planta herbácea com um forte odor aromático pertencente à família *Lamiaceae* e nativa dos continentes asiático e africano. As suas folhas e partes áreas floridas são as partes mais utilizadas da planta e as principais fontes de óleo essencial. O óleo essencial *Ocimum americanum* é rico em estragol (87%), eugenol (20%), linalol, cineol, acetato de linalilo e hidrocarbonetos monoterpénicos

(pinenos) e parece estar diretamente ligado às atividades anti-inflamatória, anti-nociceptiva, anti-bacteriana e inseticida, características da planta.^{28, 45, 52}

Ensaio

Atualmente é conhecida a atividade anti-bacteriana do óleo essencial de *Ocimum americanum*, contudo existe pouca informação acerca da sua eficácia contra bactérias patogênicas orais, como o *Streptococcus mutans*. Como consequência, foi realizado um estudo *in vitro* que pretende avaliar a capacidade do OE contra *S. mutans*, *Lactobacillus casei* e *Candida albicans*, tanto isoladamente como em biofilme.⁵² Através do Método de Difusão em Agar, o óleo essencial demonstrou apresentar atividade anti-bacteriana contra todos os microorganismos, no entanto o *Streptococcus mutans* e a *Candida albicans* apresentaram halos de inibição maiores, 28 mm e >30 mm, respectivamente. Relativamente à concentração mínima bactericida, os resultados foram os seguintes 0,08% (v/v) de OE para o *S. mutans*, 0.3% (v/v) para o *L. casei* e 0.08% (v/v) para a *C. albicans*, mostrando que o *S. mutans* e a *C. albicans* são mais sensíveis ao óleo essencial do que *L. casei*. No modelo em biofilme, após 5 minutos de exposição ao OE (0.3% v/v) ocorreu uma redução tanto de *S. mutans*, como de *C. albicans*, enquanto numa concentração de 3% (v/v) o efeito foi semelhante à clorhexidina, ou seja, muito mais elevado. Todavia, o efeito do modelo em biofilme foi menos acentuado do que o obtido em células isoladas, isto porque nos biofilmes as bactérias estão mais protegidas e menos susceptíveis a agentes anti-microbianos.

Em resumo, os resultados do presente estudo sugerem que o óleo essencial de *O. Americanum* na concentração de 3% (v/v) pode ser um agente benéfico em produtos de higiene oral, como colutórios e pastas de dentes, que são utilizados na prevenção de lesões cariostáticas.⁵²

4.3| Produtos Comercializados

No mercado atual encontram-se disponíveis produtos de higiene oral que integram plantas medicinais na sua constituição e que ilustram o potencial de algumas das plantas supracitadas.

A título de exemplo refere-se a Splat[®],⁵³ uma empresa britânica cuja imagem assenta no fabrico de produtos com ingredientes naturais selecionados seguindo uma vertente ecológica, tais como:

- Pasta Dentífrica *Green Tea* – *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze;⁵⁴
- Pasta Dentífrica *Ginger* – *Zingiber officinale* Roscoe.⁵⁵

KISS MY FACE[®]⁵⁶ é outra empresa internacional - Estados Unidos da América, que segue diretrizes semelhantes à Splat[®], e que comercializa, entre outros produtos, pastas dentífricas para crianças e adultos e colutórios, nomeadamente:

- Pasta Dentífrica *Fluoride Free Triple Action* – *Stevia reabudiana* Bertoni;⁵⁷
- Pasta Dentífrica *Berry Smart Obsessively Kids* – *Vaccinium macrocarpon* Aiton;⁵⁸
- Colutório *Spearmint Breath Blast* – *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze e *Vaccinium macrocarpon* Aiton.⁵⁹

Existem ainda duas empresas, uma britânica – Sarakan[®], e outra americana – Young Living Essential Oils[®], que também comercializam produtos de origem vegetal. A empresa Sarakan[®] apresenta apenas um colutório e uma pasta dentífrica, tendo como base extrato de *Salvadora persica* L..^{60,61} A empresa Young Living Essential Oils[®] comercializa, entre a sua gama de produtos, um colutório que inclui na sua composição óleo essencial de *Mentha spicata* L..⁶²

5| Conclusão

A presença de placa bacteriana é um elemento fundamental no desenvolvimento da cárie dentária, sendo o principal alvo na sua prevenção.

A informação referente às plantas elencadas nesta monografia permite afirmar que a eficácia dos extratos de plantas e óleos essenciais na prevenção da cárie pode ser atribuída às suas propriedades anti-bacterianas. Alguns extratos não voláteis e óleos essenciais demonstraram promover o aumento do pH do biofilme, alterar a capacidade acidogénica e acidófila das bactérias Gram-positivas, reduzindo deste modo o metabolismo de hidratos de carbono e a formação de ácidos, e até mesmo reduzir a percentagem de bactérias constituintes do biofilme.

Novas estratégias para o desenvolvimento de produtos com base nestas plantas, cujas propriedades remontam ao uso tradicional, poderão proporcionar alternativas mais eficazes para a prevenção da cárie dentária. É uma área de interesse crescente, que merece a atenção da investigação farmacêutica, no sentido de contribuir para a redução da elevada prevalência da doença na população e, consequentes impactos sociais e económicos.

Apesar dos estudos revelarem potencial das plantas utilizadas na prevenção da cárie dentária, deve ter-se em conta que a informação disponível sobre estas é limitada, tanto em relação à qualidade, como à segurança e eficácia. Deste modo, torna-se pertinente alguma precaução, sugerindo-se a realização de mais ensaios.²

6| Referências Bibliográficas

1. SHEKAR, Byalakere Rudraiah Chandra *et al.* - Herbal extracts in oral health care - A review of the current scenario and its future needs. **Pharmacognosy Reviews**. 9:18 (2015) 87–92.
2. PALOMBO, Enzo A. - Traditional Medicinal Plant Extracts and Natural Products with Activity against Oral Bacteria: Potential Application in the Prevention and Treatment of Oral Diseases. **Evidence-based complementary and alternative medicine**. (2011) 15.
3. ZOHRABIAN, Vahe M.; POON, Colin S.; ABRAHAMS, James J. - Embryology and Anatomy of the Jaw and Dentition. **Seminars in Ultrasound, CT and MRI**. Missouri. 36:5 (2015) 397–406.
4. NORTON, Neil S. - Oral Cavity. Em **Netter's Head and Neck Anatomy for Dentistry**. 2. ed. Philadelphia: Saunders, 2012. p. 325–378.
5. BATH-BALOGH, Mary; J. FENRENBACH, Margaret - **Illustrated Dental Embryology, Histology, and Anatomy**. 3. ed. Philadelphia: Saunders, 2011.
6. LOW, I. M.; DURAMAN, N.; MAHMOOD, U. - Mapping the structure , composition and mechanical properties of human teeth. **Materials Science and Engineering C**. 28 (2008) 243–247.
7. ALMEIDA, Patrícia *et al.* - Saliva Composition and Functions: A Comprehensive Review. **The Journal of Contemporary Dental Practice**. 9:3 (2008) 72–80.
8. DAWES, C. *et al.* - The functions of human saliva: A review sponsored by the World Workshop on Oral Medicine VI. **Archives of Oral Biology**. 60:6 (2015) 863–874.
9. PAULA, Naiara De - Knowledge of dental caries and salivary factors related to the disease: influence of the teaching-learning process. **Brazilian Oral Research**. 29:1 (2015) 1–7.
10. MELO, Paulo; AZEVEDO, Álvaro; HENRIQUES, Marisa - Cárie dentária – a doença antes da cavidade. **Acta Pediátrica Portuguesa**. 39:6 (2008) 253–259.
11. PETERSEN, Poul Erik *et al.* - The global burden of oral diseases and risks to oral health. **Bulletin of the World Health Organization**. 83:9 (2005) 661–669.
12. WHO - **The World Oral Health Report 2003**.
13. PETERS, Brian M. *et al.* - Polymicrobial Interactions: Impact on Pathogenesis and Human Disease. **Clinical Microbiology Reviews**. 25:1 (2012) 193–213.
14. PAULA, Ana *et al.* - Effectiveness of plant-derived proanthocyanidins on demineralization on enamel and dentin under artificial cariogenic challenge. **Journal of Applied Oral Science**. 23:3 (2015) 302–309.
15. KOUIDHI, Bochra *et al.* - Drug resistance of bacterial dental biofilm and the potential use of natural compounds as alternative for prevention and treatment. **Microbial Pathogenesis**. 80 (2015) 39–49.
16. JEON, J. *et al.* - Natural Products in Caries Research: Current (Limited) Knowledge. **Caries Research**. 45 (2011) 243–263.

17. PANDIT, Santosh; SONG, Kwang-yeob; JEON, Jae-gyu - Withania somnifera Attenuates Acid Production, Acid Tolerance and Extra-Cellular Polysaccharide Formation of Streptococcus mutans Biofilms. **The American Journal of Chinese Medicine**. 42:1 (2014) 157–171.
18. SALLI, Krista M.; OUWEHAND, Arthur C. - The use of in vitro model systems to study dental biofilms associated with caries: a short review. **Journal of Oral Microbiology**. 1(2015) 1–7.
19. LEME, A. F. *et al.* - The Role of Sucrose in Cariogenic Dental Biofilm Formation. **Journal of Dental Research**. 85:10 (2008) 878–887.
20. HAMADAT, Shigeyuki; SLADE, Hutton D. - Biology, Immunology, and Cariogenicity of Streptococcus mutans. **Microbiological Reviews**. 44:2 (1980) 331–384.
21. KOO, H.; JEON, J. G. - Naturally Occurring Molecules as Alternative Therapeutic against Cariogenic Biofilms. **Adv Dent Res**. 21 (2009) 63–68.
22. BIOLOGY, Oral; ARBOR, Ann - Role of Streptococcus in Human Dental Decay. **Microbiological Reviews**. 50:4 (1986) 353–380.
23. BALAGOPAL, Shruti; ARJUNKUMAR, Radhika - Chlorhexidine: The Gold Standard Antiplaque Agent. **Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**. 5:12 (2013) 270–274.
24. P, Anita *et al.* - In vitro antibacterial activity of Camellia sinensis extract against cariogenic microorganisms. **Journal of Basic and Clinical Pharmacy**. 6:1 (2015) 35–39.
25. HASAN, Sadaf; DANISHUDDIN, Mohd; KHAN, Asad U. - Inhibitory effect of zingiber officinale towards Streptococcus mutans virulence and caries development: in vitro and in vivo studies. **BMC Microbiology**. 15:1 (2015) 1–14.
26. UJU, Dibua Esther; OBIOMA, Nnamani Petra - Anticariogenic potentials of clove, tobacco and bitter kola. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**. 4:10 (2011) 814–818.
27. **What is the plant extract** - [Em linha] [Consultado 17 junho 2016]. Disponível em WWW:<URL:<http://www.articlesfactory.com/articles/health/what-is-the-plant-extract.html>>.
28. CUNHA, A. Proença Da; SILVA, Alda Pereira Da; ROQUE, Odete Rodrigues - **Plantas e Produtos Vegetais em Fitoterapia**. 2ª. ed. Lisboa : Fundação Calouste Gulbenkian, 2006. ISBN 972-31-1010-5.
29. CABRERA, Carmen; ARTACHO, Reyes; GIMÉNEZ, Rafael - Beneficial effects of green tea - A review. **Journal of the American College of Nutrition**. 25:2 (2006) 79–99.
30. GOENKA, Puneet *et al.* - Camellia sinensis (Tea): Implications and role in preventing dental decay. **Pharmacognosy Review**. 7 (2013) 152–156.
31. FERRAZZANO, Gianmaria F. *et al.* - Antimicrobial Properties of Green Tea Extract Against Cariogenic Microflora: An In Vivo Study. **Journal of Medicinal Food**. 14:9 (2011) 907–911.
32. CUNHA, A. Proença Da - **Farmacognosia e Fitoquímica**. Lisboa : Fundação Calouste Gulbenkian, 2005. ISBN 972-31-1142-X.

33. XIAOJUN, YAN *et al.* - Antioxidant Activities and Antitumor Screening of Extracts from Cranberry Fruit (*Vaccinium macrocarpon*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 50 (2002) 5844–5849.
34. KOO, H. *et al.* - Influence of Cranberry Proanthocyanidins on Formation of Biofilms by *Streptococcus mutans* on Saliva-Coated Apatitic Surface and on Dental Caries Development in vivo. **Caries Research**. 44 (2010) 116–126.
35. BRAMBILLA, E. *et al.* - An in vitro and in vivo Comparison of the Effect of Stevia rebaudiana Extracts on Different Caries-Related Variables: A Randomized Controlled Trial Pilot Study. **Caries Research**. 48 (2014) 19–23.
36. LEMUS-MONDACA, Roberto; VEGA-GÁLVEZ, Antonio; AH-HEN, Kong - Stevia rebaudiana Bertoni , source of a high- potency natural sweetener: A comprehensive review on the biochemical, nutritional and functional aspects. **Food Chemistry**. 132 (2012) 1121–1132.
37. AGENCY, European Medicines - Community herbal monograph on *Zingiber officinale* Roscoe, rhizoma. (2012) 4–9.
38. ALI, Badreldin H. *et al.* - Some phytochemical , pharmacological and toxicological properties of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe): A review of recent research. **Food and Chemical Toxicology**. 46 (2008) 409–420.
39. YUDTHAVORASIT, Soparat; WONGRAVEE, Kanet; LEEPIPATPIBOON, Natchanun - Characteristic fingerprint based on gingerol derivative analysis for discrimination of ginger (*Zingiber officinale*) according to geographical origin using HPLC-DAD combined with chemometrics. **FOOD CHEMISTRY**. 158 (2014) 101–111.
40. SINGH, Betsy B.; DAGENAIS, Simon - Scientific Basis for the Therapeutic Use of *Withania somnifera* (Ashwagandha). 5:4 (2000) 334–346.
41. KHATAK, M. *et al.* - *Salvadora persica*. **Pharmacognosy reviews**. 4:8 (2010) 209–14.
42. HALAWANY, Hassan Suliman - A review on miswak (*Salvadora persica*) and its effects on various aspects of oral health. **The Saudi Dental Journal**. 24 (2012) 63–69.
43. CHELLI-CHENTOUF, Nadia *et al.* - In vitro and in vivo antimicrobial activity of Algerian Hoggar *Salvadora persica* L. extracts against microbial strains from children's oral cavity. **Journal of Ethnopharmacology**. 144:1 (2012) 57–66.
44. HAMMAD, M.; SALLAL, A. K. - Inhibition of *Streptococcus mutans*. Adhesion to Buccal Epithelial Cells by an Aqueous Twigs Extract of *Salvadora persica*. **Pharmaceutical Biology**. 43:2 (2005) 121–214.
45. FREIRES, Irlan Almeida *et al.* - Antibacterial activity of essential oils and their isolated constituents against cariogenic bacteria: A systematic review. **Molecules**. 20:4 (2015) 7329–7358.
46. LOBO, Patrícia Leal Dantas *et al.* - Dose-response evaluation of a novel essential oil against *Mutans streptococci* in vivo. **Phytomedicine**. 18:7 (2011) 551–556.
47. ARAÚJO, C. C.; LEON, L. L. - Biological activities of *Curcuma longa* L. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. 96:5 (2001) 723–8.
48. LEE, Kwang Hee *et al.* - Essential Oil of *Curcuma longa* Inhibits *Streptococcus mutans*

Biofilm Formation. **Journal of Food Science**. 76:9 (2011) 226–230.

49. RASOOLI, I.; SHAYEGH, S.; ASTANEH, S. D. A. - The effect of *Mentha spicata* and *Eucalyptus camaldulensis* essential oils on dental biofilm. **International Journal of Dental Hygiene**. 7:3 (2009) 196–203.

50. ZNINI, M. *et al.* - Chemical composition and inhibitory effect of *Mentha spicata* essential oil on the corrosion of steel in molar hydrochloric acid. **International Journal of Electrochemical Science**. 6:3 (2011) 691–704.

51. BATISH, Daizy R. *et al.* - *Eucalyptus* essential oil as a natural pesticide. **Forest Ecology and Management**. 256:12 (2008) 2166–2174.

52. THAWEBOON, Sroisiri; THAWEBOON, Boonyanit - *In Vitro* Antimicrobial Activity of *Ocimum Americanum* L. Essential Oil Against. 40:5 (2009) 1025–1033.

53. **Splat - Our Story** - [Em linha] [Consultado 23 junho 2016]. Disponível em WWW:<URL:https://www.splatoralcare.uk/pages/our-story>.

54. **Toothpaste Green Tea** - [Em linha] Disponível em WWW:<URL:https://www.splatoralcare.uk/products/toothpaste-green-tea-professional-series?variant=982298401>.

55. **Toothpaste Ginger** - [Em linha] [Consultado 23 junho 2016]. Disponível em WWW:<URL:https://www.splatoralcare.uk/products/toothpaste-ginger-special-series?variant=995320253>.

56. **KISS MY FACE** - [Em linha] [Consultado 23 junho 2016]. Disponível em WWW:<URL:http://kissmyface.com/>.

57. **Fluoride Free Triple Action Toothpaste** - [Em linha] [Consultado 23 junho 2016]. Disponível em WWW:<URL:http://kissmyface.com/natural-oral-care/item/345/Fluoride-Free-Triple-Action-Toothpaste>.

58. **Berry Smart Obsessively Kids Toothpaste with Fluoride** - [Em linha] [Consultado 23 junho 2016]. Disponível em WWW:<URL:http://kissmyface.com/natural-oral-care/item/155/Berry-Smart-Obsessively-Kids-Toothpaste-with-Fluoride>.

59. **Spearmint Breath Blast Mouthwash** - [Em linha] [Consultado 23 junho 2016]. Disponível em WWW:<URL:http://www.kissmyface.com/product/item/7>.

60. **Sarakan Toothpaste - Nature's toothpaste** - [Em linha] [Consultado 23 junho 2016]. Disponível em WWW:<URL:http://www.sarakan.co.uk/toothpaste.ashx>.

61. **Sarakan Anti-Plaque Mouthwash** - [Em linha] [Consultado 23 junho 2016]. Disponível em WWW:<URL:23-06-2016>.

62. **Thieves Fresh Essence Mouthwash** - [Em linha] [Consultado 23 junho 2016]. Disponível em WWW:<URL:https://www.youngliving.com/en_US/products/thieves-fresh-essence-mouthwash>.