

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA  
MESTRADO EM CLÍNICA INTEGRADA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA *IN VITRO* DO  
DENTIFRÍCIO À BASE DO EXTRATO ALCOÓLICO DE *Rosmarinus  
officinalis* Linn. (ALECRIM) SOBRE CEPAS PADRÃO DE *S. mutans*,  
*S. aureus* e *L. casei***

MARCELA AGNE ALVES VALONES

RECIFE-PE

2008

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA  
MESTRADO EM CLÍNICA INTEGRADA  
MARCELA AGNE ALVES VALONES

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA *IN VITRO* DO  
DENTIFRÍCIO À BASE DO EXTRATO ALCOÓLICO DE *Rosmarinus  
officinalis* Linn. (ALECRIM) SOBRE CEPAS PADRÃO DE *S. mutans*,  
*S. aureus* e *L. casei***

Dissertação apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Mestrado em Clínica Integrada do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do grau de mestre em Clínica Integrada.

Orientadora: Profa.Dra. Alessandra de A. T. Carvalho

Co-orientadora: Profa.Dra. Jane Sheila Higino

RECIFE – PE

2008

**Valones, Marcela Agne Alves**

**Avaliação da atividade antimicrobiana *in vitro* do dentifrício à base do extrato alcoólico de *Rosmarinus Officinalis* Linn. (ALECRIM) sobre cepas padrão de *S. mutans*, *S. aureus* e *L. casei* / Marcela Agne Alves Valones. – Recife : O Autor, 2008.**

**60 folhas : il., fig., tab.;**

**Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCS. Clínica integrada, 2008.**

**Inclui bibliografia e anexos.**

**1. Fitoterapia. 2. Alecrim. 3. *Rosmaninus officinalis*. 4. Dentifrício . I. Título.**

**616.31  
617.601**

**CDU ( 2.ed.)  
CDD ( 22.ed.)**

**UFPE  
CCS2008-13**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

REITOR

Prof. Dr. Amaro Henrique Pessoa Lins

VICE-REITOR

Prof. Dr. Gilson Edmar Gonçalves e Silva

PRÓ-REITOR DA PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Dr. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

DIRETOR

Prof. Dr. José Thadeu Pinheiro

COORDENADOR DA PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

Prof. Dr. Jair Carneiro Leão

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

MESTRADO EM CLÍNICA INTEGRADA

COLEGIADO

Profa. Dra. Alessandra Albuquerque T. Carvalho

Prof. Dr. Anderson Stevens Leônidas Gomes

Prof. Dr. Cláudio Heliomar Vicente da Silva

Prof. Dr. Etenildo Dantas Cabral

Prof. Dr. Geraldo Bosco Lindoso Couto

Prof. Dr. Jair Carneiro Leão

Profa. Dra. Jurema Freire Lisboa de Castro

Profa. Dra. Lúcia Carneiro de Souza Beatrice

Profa. Dra. Renata Cimões Jovino Silveira

SECRETARIA

Oziclere de Araújo Sena

**TÍTULO DO TRABALHO:** AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA *IN VITRO* DO DENTIFRÍCIO À BASE DO EXTRATO ALCOÓLICO DE *Rosmarinus officinalis* Linn. (ALECRIM) SOBRE CEPAS PADRÃO DE *S. mutans*, *S. aureus* e *L. casei*

**NOME DO ALUNO:** MARCELA AGNE ALVES VALONES

**DISSERTAÇÃO APROVADA EM:** 29/03/2008

MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Cláudio Heliomar Vicente e Silva

Profa. Dra. Sílvia Regina Jamelli

Profa. Dra. Maria Carmeli Correia Sampaio

Recife –PE

2008

*“Quando prestamos atenção à música da  
natureza, descobrimos que tudo na terra  
contribui para a sua harmonia.”*

Gerard Manley Hopkins

## DEDICATÓRIA

*Não sei se a vida é curta  
ou longa demais para nós.  
Mas sei que nada do que vivemos  
tem sentido,  
se não tocarmos o coração das pessoas.*

Cora Coralina

Aos meus pais Xisto e Neide, minhas maiores referências, pela sua prioridade em relação ao estudo e pelas lições de coragem e fé na vida.

Ao meu irmão Marcelo e tios Jonas, Jorge, Zezo, Nelbe e Nelma, pelo testemunho de fraternidade e de solidariedade nas tristezas e nas alegrias.

Ao meu noivo Luiz Felipe, companheiro dedicado e compreensivo, pelo incentivo para enfrentar o curso de mestrado, acreditando nos meus sonhos e desejos de aprendizagem.

A vovó Neuza, avó e mãe, pela presença, carinho e estímulo nesta caminhada.

## AGRADECIMENTOS

*“E dar as mãos e dar de si além do  
próprio gesto...”*

À Universidade Federal de Pernambuco, na pessoa do Pró-Reitor da Pós-Graduação Prof. Dr. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado, pela qualidade do espaço da formação, enaltecendo o processo de construção de conhecimentos em benefício da ciência.

Ao Coordenador da Pós-Graduação Prof. Dr. Jair Carneiro Leão, pela presença constante nesta Coordenação, oferecendo apoio rigoroso e objetivo aos alunos e alunas que enveredam pelo caminho da pesquisa científica.

À Professora Alessandra de Albuquerque Tavares Carvalho, minha orientadora, por ter me proporcionado a presença constante, segura e de qualidade singular durante toda a elaboração da pesquisa.

À Professora Doutora e co-orientadora Jane Sheila Higino, por estar sempre suave, rigorosa e substancialmente participando do processo de minha formação como pesquisadora.

À professora do Departamento de Antibióticos Janete Magali de Araújo, pelo auxílio dedicado e carinhoso no desenrolar das dificuldades encontradas.

Ao meu irmão Marcelo Valones, pelo cuidado, carinho e apoio, em todos os sentidos, durante o curso.

À mamãe e papai, pelo amor e colaboração ao meu trabalho.

À vovó Neuza, pela acolhida calorosa e incentivadora nos momentos difíceis.

Aos professores e às professoras, aos alunos e às alunas que passaram na minha vida de estudante de graduação e pós-graduação, pelos momentos significativos lembrados e esquecidos de ensino e aprendizagem.

Aos meus amigos e às amigas do curso de mestrado- Alan Bruno, Andreza Lira, Anizabele Milet, Ana Karla, Bruno Cabral, Camila Beder, Cristiana da Fonte, Daniela Capri, Élvia Barros, Glauce Zamorano, Ísis Cedro (*in memorian*), Jouse Bezerra, Manuela Lopes, Renata Pedroza- pelas sugestões e trocas de idéias, experiências e preocupações comuns voltadas para a realização do curso.

À funcionária do Departamento de Antibióticos Fátima Regina, pelo auxílio enriquecedor nos testes laboratoriais da pesquisa.

À amiga do mestrado Renatinha, companheira jovem, criativa, inteligente e atenciosa, pela ajuda, pelo estímulo e pelas contribuições efetivas no meu trabalho.

Às amigas do mestrado Élvia e Cristiana, pela amizade e companheirismo no desenrolar de trabalhos em grupo durante o curso de mestrado.

À minha sócia Flavinha, pela compreensão, carinho e paciência na jornada de trabalho no consultório.

A todos do Departamento de Antibióticos da UFPE, pessoas que se tornaram inesquecíveis pelo trabalho associado à solidariedade, carinho e dedicação.

Aos funcionários da Pós-graduação e da Biblioteca da UFPE, pela disponibilidade no seu atendimento.

A todos e a todas que, de algum modo, participaram desta minha conquista.

## SUMÁRIO

LISTA DE QUADROS E TABELAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE ABREVIATURAS

APRESENTAÇÃO

<b>ARTIGO 1</b> .....	15
Resumo .....	16
Abstract .....	17
Introdução .....	18
Materiais e métodos .....	20
Resultados .....	21
Discussão .....	24
Conclusão .....	27
Referências Bibliográficas .....	28
<b>ARTIGO 2</b> .....	32
Resumo .....	33
Abstract .....	35
Introdução .....	37
Materiais e métodos .....	40
Resultados .....	43
Discussão .....	46
Conclusão .....	49
Referências Bibliográficas .....	51
Anexos.....	55
Norma da Revista Microbiological Research.....	55
Normas da Revista Oral Health & Preventive Dentistry.....	60

## LISTA DE QUADROS E TABELAS

### ARTIGO 1

**Tabela 1:** Halo de inibição (mm) do extrato alcoólico de *Rosmarinus officinalis* Linn (Alecrim) para *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus* e *Lactobacillus casei*..... 22

**Tabela 2:** Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) ( $\mu\text{g/ml}$ ), em meio sólido, do extrato alcoólico de *Rosmarinus officinalis* Linn (Alecrim) para *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus* e *Lactobacillus casei*..... 24

### ARTIGO 2

**Tabela 1:** Composição, função e quantidade da formulação do dentifrício à base do extrato de *Rosmarinus officinalis* Linn. (p/100g do produto).....40

**Tabela 2:** Comparação entre as médias dos halos de inibição (mm) dos CDA, CDB, CDC<sup>+</sup> e CDC<sup>-</sup> controlando o tipo de bactéria.....44

**Tabela 3:** Comparação entre as médias do halo de inibição (mm) dos CDA e CDB controlando o tipo de bactéria e a diluição do sobrenadante .....46

## LISTA DE FIGURAS

### ARTIGO 1

- Figura 1:** Halo de inibição do extrato alcoólico de *Rosmarinus officinalis* Linn. (Alecrim) para *S. aureus*.....23
- Figura 2:** Halo de inibição do extrato alcoólico de *Rosmarinus officinalis* Linn. (Alecrim) para *S. mutans*.....23

## LISTA DE ABREVIATURAS

### ARTIGO 1

<b>RDC</b> (Resolução de Diretoria Colegiada).....	18
<b>CIM</b> (Concentração Inibitória Mínima).....	20

### ARTIGO 2

<b>CRD</b> (Creme dental).....	39
<b>CDA</b> (Creme dental A: à base de alecrim).....	40
<b>CDB</b> (Creme dental B: Sorriso Herbal com Própolis®).....	40
<b>CDC<sup>+</sup></b> (Creme dental controle positivo: Colgate Total 12®).....	41
<b>CDC<sup>-</sup></b> (Creme dental controle negativo: Philips®).....	41

## APRESENTAÇÃO

Esta dissertação foi estruturada sob a forma de artigos científicos para serem enviados a revistas especializadas na área de Odontologia. Para tal, foram utilizados e explorados bancos de dados disponíveis em rede (on line), além de revistas impressas e livros didáticos. Foram escritos dois artigos o primeiro constitui uma pesquisa intitulada **AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO EXTRATO ALCOÓLICO DE *Rosmarinus officinalis* Linn. (ALECRIM) SOBRE BACTÉRIAS DA CAVIDADE ORAL (*S. mutans*, *S. aureus* e *L. casei*)**, a ser encaminhado para a Revista Microbiological Research. Nesse artigo, abordou-se a atividade do extrato de alecrim sobre bactérias importantes na etiologia de afecções bucais através da realização de teste laboratorial antimicrobiano. A relevância do estudo evidencia-se na possibilidade da criação de terapia natural para o combate de tais doenças.

O segundo artigo, também de pesquisa, é intitulado **AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA *IN VITRO* DO DENTIFRÍCIO À BASE DO EXTRATO ALCOÓLICO DE *Rosmarinus officinalis* Linn. (ALECRIM) SOBRE CEPAS PADRÃO DE *S. mutans*, *S. aureus* e *L. casei***. O mesmo extrato, anteriormente testado, foi incorporado a um dentifrício e avaliado em laboratório para verificar se existem propriedades antimicrobianas sobre as bactérias testadas. Este artigo será encaminhado para a Revista Oral Health & Preventive Dentistry. Este estudo torna-se relevante, pois sabe-se da importância da utilização de plantas com propriedades medicinais nas ciências médicas e odontológicas, vez que alguns extratos e derivados desses vegetais, ao serem incorporados aos dentifrícios, apresentam efeito inibitório sobre a formação do biofilme dentário e, conseqüentemente, da cárie.

## ARTIGO 1

# AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO EXTRATO ALCOÓLICO DE *Rosmarinus officinalis* Linn. (ALECRIM) SOBRE BACTÉRIAS DA CAVIDADE ORAL (*S. mutans*, *S. aureus* e *L. casei*)

Marcela Agne Alves **VALONES**\*

Janete Magali de **ARAÚJO**\*\*

Jane Sheila **HIGINO**\*\*\*

Alessandra de Albuquerque Tavares **CARVALHO**\*\*\*\*

\*Aluna da Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE);

\*\*Profª. Dra. do Departamento de Antibióticos da UFPE

\*\*\*Profª. Dra. do Curso de Farmácia da UFPE;

\*\*\*\*Profª. Dra. do Curso de Mestrado em Odontologia da UFPE;

---

\*Marcela Agne Alves Valones; Rua Quarenta e oito, 395, apto.201, Espinheiro, Recife, Pernambuco, Brazil; CEP 52020-060; [mavalona@hotmail.com.br](mailto:mavalona@hotmail.com.br); Phones: 0xx8134260449, 8132222883, 8192528488

## RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antimicrobiana do extrato alcoólico de *Rosmarinus officinallis* Linn. (Alecrim) sobre bactérias da cavidade oral, causadoras de patologias desta região. Para o estudo, utilizaram-se cepas padrão de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175), *Lactobacillus casei* (ATCC 7469) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 9811), tendo como controle positivo a clorhexidina 0,12%. Folhas de alecrim foram tratadas com etanol, obtendo-se um extrato, e esse, rotaevaporado até a secura e diluído até 1:8 para a realização do Teste de Difusão em Ágar. Neste teste, placas de Petri foram semeadas com as bactérias e discos de papel embebidos com o extrato e suas diluições colocados sobre as placas. Em seguida, tais placas foram incubadas de acordo com as exigências de crescimento das bactérias, sendo os halos de inibição analisados. Observaram-se halos para *S. mutans* e *S. aureus* similares ao controle positivo clorhexidina, enquanto a CIM foi 30µg/ml para *S. aureus* e 50µg/ml para *S. mutans* e *L. casei*, resultados esses melhores do que os da literatura para o extrato de *Rosmarinus officinalis* Linn. Assim, o extrato alcoólico de alecrim apresenta atividade antimicrobiana sobre bactérias da cavidade bucal e pode ser empregado como apoio à prevenção e terapia das doenças cárie e periodontal.

**PALAVRAS-CHAVE:** Fitoterapia; Alecrim; *Rosmarinus officinalis*

## ABSTRACT

The aim of the present study was to assess the antimicrobial activity of a rosemary alcohol extract on pathology-causing bacteria in the oral cavity. Standard strains of *Streptococcus mutans* (ATCC 25175), *Lactobacillus casei* (ATCC 7469) and *Staphylococcus aureus* (ATCC 9811) were used, with 0.12% chlorhexidine as the positive control. Rosemary leaves were treated with ethanol, thereby obtaining an extract, which was rotaevaporated until safe and diluted to 1:8 for the diffusion test in agar. Petri dishes were sown with the bacteria and paper disks soaked in the extract and its dilutions were placed on the dishes. The dishes were then incubated in accordance with the growth requirements of the bacteria and inhibition halos were analyzed. Halos for *S. mutans* and *S. aureus* were similar to the chlorhexidine positive control. Minimal inhibitory concentration was 30µg/ml for *S. aureus* and 50µg/ml for *S. mutans* and *L. casei*. These results are better than those reported in the literature for *Rosmarinus officinalis* extracts. Thus, the rosemary alcohol extract exhibits antimicrobial activity on oral cavity bacteria and can be employed as support to therapy in caries and periodontal disease.

**KEY WORDS:** Phytotherapy; Rosemary; *Rosmarinus officinalis*

## INTRODUÇÃO

Etimologicamente, Fitoterapia vem do grego *phytos*, que significa plantas e terapia, “cuidado” ou “tratamento”. Segundo Sarti e Carvalho (2004), ela é um ramo da ciência médica alopática, que utiliza plantas, drogas vegetais e emulsões para o tratamento de enfermidades. As plantas medicinais possuem metabólitos secundários bioativos utilizados para prevenir, mitigar ou curar doenças (Sallé, 1996).

Os fitoterápicos encontrados no mercado farmacêutico nas formas líquidas (tinturas, extratos, xaropes, emulsões); semi-sólidas (pomada, cremes e géis) e sólidas (cápsulas, comprimidos e drágeas) devem conter marcadores fitoquímicos e farmacológicos, como referência para atender à Resolução-RDC (Resolução de Diretoria Colegiada) nº17 (fevereiro/2000) de medicamentos fitoterápicos (Carvalho, 2004).

Durante o processamento, verifica-se que os extratos brutos de plantas contêm uma mistura complexa de compostos e altas concentrações de componentes específicos extraídos da planta (Johnson et al., 2001).

O uso de extrato de plantas e fitoquímicos, com propriedades antimicrobianas, têm um grande significado no tratamento terapêutico. Nos últimos anos, várias pesquisas têm comprovado a eficiência desses extratos, em decorrência principalmente da ação antimicrobiana de seus metabólitos secundários (Artizzu et al., 1995; Izzo et al., 1995; Shapoval et al., 1994; Kubo et al., 1993; Sousa et al., 1991). Entre essas plantas, *Rosmarinus officinallis*

Linn., popularmente conhecida como “alecrim” exibe propriedades antioxidantes, antimicrobianas e anticárie (Aruoma et al., 1997; Kikuzari e Nikatani, 1993). Dietas que incluem tal antioxidante natural são reconhecidas pela redução do risco de certas doenças crônicas, como câncer e doença cardiovascular (Priyadarsini, 1997). Essas propriedades ocorrem naturalmente, não só no processamento de alimentos, mas também, em misturas funcionais formuladas para uso farmacêutico e para a indústria cosmética.

O extrato de alecrim apresenta um ótimo potencial antimicrobiano, indicativo da sua utilização no tratamento de doenças infecciosas causadas por microrganismos resistentes. O efeito sinérgico da associação de antibióticos com extratos de plantas contra bactérias resistentes induz a novas chances de tratamento de doenças infecciosas (Del-Campo et al., 2000; Nascimento et al., 2000).

Na Odontologia, vêm sendo utilizadas substâncias naturais com propriedades terapêuticas com o objetivo de controlar o biofilme dentário composto por predominantemente *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus sobrinus* e *Lactobacillus casei*, além de *Staphylococcus aureus*, patógeno oportunista da cavidade bucal. O *S. mutans* e o *L. casei* estão envolvidos no processo de formação e progressão da cárie dentária, respectivamente, e o *S. aureus*, com a gênese de abscessos periapicais (Martins et al., 2002; Buischi, 2000).

Dessa forma, substâncias com potente atividade antimicrobiana, capazes de interferir no desenvolvimento do biofilme, e que apresentem efeitos colaterais reduzidos, são importantes para a Odontologia. Nesse contexto, surgem os agentes naturais, tais como os extratos vegetais, que são

economicamente viáveis e constituem alternativas eficazes para afecções bucais (Pereira, 2002; Moran et al., 1992).

Assim, baseado nas considerações acima, o presente estudo teve a proposta de avaliar a atividade antimicrobiana do extrato alcoólico do alecrim sobre bactérias bucais, como *S. mutans*, *S. aureus* e *L.casei*.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### **Preparo do extrato de *Rosmarinus officinalis* Linn. (Alecrim)**

O material botânico foi adquirido no Mercado Central de São José (Recife-PE) e identificado através de comparação com material já depositado por Bento Pickel nº1641 no Herbário do Instituto de Pesquisas Agrícolas de Pernambuco (IPA).

Após serem lavados e secados à temperatura ambiente, folhas e caules foram pesados (320g) e macerados em 1L de etanol durante 30 dias, sob refrigeração. Em seguida, o extrato foi filtrado e rotaevaporado até a secura, sob uma temperatura de 40°C, obtendo-se um extrato seco, o qual foi dividido para testes microbiológicos, toxicológicos e fitoquímicos e mantido sob refrigeração durante os intervalos dos testes.

### **Avaliação microbiológica do extrato de *Rosmarinus officinalis* Linn (Alecrim)**

A atividade antimicrobiana do extrato etanólico de *Rosmarinus officinalis* Linn. foi determinada através do método de Difusão em Ágar, seguida da determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) utilizando as bactérias *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Staphylococcus aureus* ATCC 9811 e

*Lactobacillus casei* ATCC 7469 da Coleção do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ).

### **Teste antimicrobiano do extrato**

Para o teste antimicrobiano, adotou-se a técnica de Difusão em Ágar segundo Bauer et al., (1966). Foram utilizadas placas de Petri contendo 10ml de meio BHI (Brain Heart Infusion – DIFCO®), inoculadas com suspensões das bactérias *S. mutans*, *S. aureus* e *L. casei*. Solução do extrato alcoólico da planta na concentração de 3000mg/ml foi diluída (1:2, 1:4 e 1:8) e adicionados 60µl aos discos de antibiograma estéreis. Em seguida, colocaram-se os discos nas placas já inoculadas com as bactérias-testes. Como controle, utilizou-se gluconato de clorhexidina (Periogard®). Em seguida, as placas foram cultivadas na estufa a 37°C por 48 horas, o *S. mutans* colocado em condições de microaerofilia e os demais, em condições de aerobiose. O teste foi realizado em duplicata para cada cultura utilizada, seguido da leitura do halo de inibição.

### **Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)**

Determinou-se a quantificação da atividade antimicrobiana do extrato alcoólico da planta através da Concentração Inibitória Mínima (CIM) sobre as mesmas bactérias utilizadas e concentrações variadas adicionadas em Placas de Petri. Em seguida, foi realizada a inoculação, por estria, das bactérias padrões. O cultivo realizado nas mesmas condições do experimento anterior.

## **RESULTADOS**

Os resultados da atividade antimicrobiana do extrato alcoólico de alecrim e da clorhexidina sobre bactérias bucais podem ser observados nas tabelas 1 e 2. As figuras 1 e 2 são representativas da ação antimicrobiana do extrato e da clorhexidina sobre *S. aureus* e *S. mutans*, respectivamente.

**Tabela 1:** Halo de inibição (mm) do extrato alcoólico de *Rosmarinus Officinalis* Linn. (alecrim) para *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus* e *Lactobacillus casei*

LINHAGENS DE BACTÉRIAS	DILUIÇÕES DO EXTRATO				CLORHEXIDINA 0,12%
	EP <sup>1</sup>	1:2	1:4	1:8	
<i>S. mutans</i>	16 <sup>2</sup>	16	15	14	14
<i>S. aureus</i>	16	15	15	13	17
<i>L. casei</i>	17	16	14	12	25

<sup>1</sup> Extrato puro

<sup>2</sup> Halo de inibição em mm

Os resultados obtidos com o extrato alcoólico de *Rosmarinus officinalis* Linn. mostram ser ele tão eficiente quanto o controle positivo. Como pode ser observado pelo halo de inibição, apresentado para *S. mutans* e *S. aureus*, que foram de 16mm, e até a diluição de 1:8 ainda foram observados halo de 14 e 13mm, respectivamente. Para clorhexidina estes halos foram, respectivamente, 14 e 17mm para *S. mutans* e *S. aureus*.

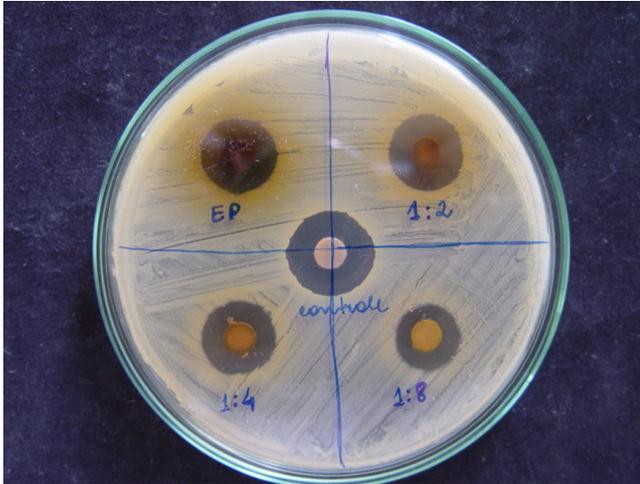


Figura 1: Halo de inibição do extrato alcoólico de *Rosmarinus officinalis* Linn.(Alecrim) para *S. aureus*

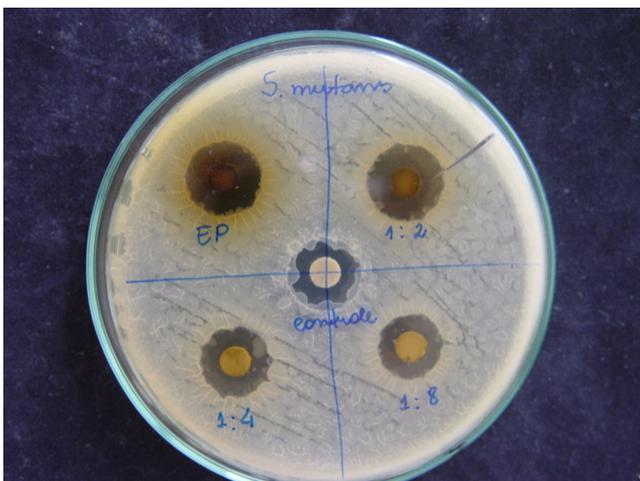


Figura 2: Halo de inibição do extrato alcoólico de *Rosmarinus officinalis* Linn.(Alecrim) para *S. mutans*

Os resultados da CIM do extrato alcoólico de *Rosmarinus officinalis* Linn. para as bactérias estão expressos na tabela 2.

**Tabela 2:** Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) ( $\mu\text{g/ml}$ ), em meio sólido, do extrato alcoólico de *Rosmarinus Officinalis* Linn (alecrim) para *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus* e *Lactobacillus casei*.

LINHAGENS BACTERIANAS	CONCENTRAÇÃO DO EXTRATO ( $\mu\text{g/ml}$ )				
	20	30	50	100	200
<i>S. mutans</i>	+	+	-	-	-
<i>S. aureus</i>	+	-	-	-	-
<i>L. casei</i>	+	+	-	-	-

(+) Crescimento      (-) Ausência de crescimento

A CIM do extrato alcoólico mostrou uma boa atividade para *S. aureus*, com uma CIM de  $30\mu\text{g/ml}$ , enquanto para *S. mutans* e *L. casei* a CIM foi de  $50\mu\text{g/ml}$ .

## DISCUSSÃO

O extrato alcoólico de *Rosmarinus officinalis* Linn. se mostrou tão eficiente quanto o controle positivo, pois os halos de inibição, apresentado para *S. mutans* e *S. aureus* foram de 16mm, e até a diluição de 1:8 ainda foram observados halo de 14 e 13mm, respectivamente. Para clorhexidina estes halos foram, respectivamente, 14 e 17mm para *S. mutans* e *S. aureus*.

A CIM do extrato alcoólico mostrou uma boa atividade para *S. aureus*, com uma CIM de  $30\mu\text{g/ml}$ , enquanto para *S. mutans* e *L. casei* a CIM foi de

50µg/ml. Comparando tal resultado com o estudo de Del-Campo, Amiot, Nguyen-The (2000), que avaliaram a CIM de extrato semelhante para várias bactérias gram-positivas, verifica-se a CIM de 0,25% e 0,5% para *S. mutans* e *S. aureus*, respectivamente, ou seja, 2,5mg/ml e 5mg/ml. Os autores utilizaram um extrato de alecrim disponível comercialmente para tal estudo.

O efeito antimicrobiano ocorrido no estudo de Del-Campo, Amiot, Nguyen-The (2000), evidenciou-se mais em baixa temperatura. Um total de 0,5% do extrato foi necessário para inibir *S. aureus* em 30<sup>0</sup>C, ao passo que 0,13% inibiu bactérias em 10<sup>0</sup>C.

Observou-se que o extrato de alecrim apresenta significativa capacidade de inibir o crescimento de bactérias bucais, como *S. mutans*, *S. aureus* e *L. casei*, sendo *S. aureus* a mais sensível quando comparada à clorhexidina. Essa afirmação torna o alecrim um agente natural com potente atividade antimicrobiana, capaz de constituir uma alternativa eficaz para as afecções bucais. Soares et al., (2006) realizaram estudos semelhantes utilizando tinturas fitoterápicas (própolis, jucá, aroeira, gengibre, alfavaca e hortelã) contra bactérias bucais e obtiveram uma maior susceptibilidade do *S. aureus* a esses fitoterápicos de uma maneira geral. O *S. mutans* e o *L. casei* foram inibidos pelas tinturas de jucá, aroeira, própolis e hortelã.

De acordo com Matos (1998), o alecrim é composto por flavonóides, fenóis, óleos voláteis e terpenóides. Cada componente apresenta uma função, o que caracteriza o vegetal em foco como planta medicinal. Seu extrato apresenta alta atividade antimicrobiana e antioxidante provavelmente devido à presença de compostos fenólicos em sua composição (Del-Campo et al., 2000; Zhu et al., 1998; Basaga et al., 1997; Frankel et al., 1996; Moujir et

al., 1993; Colins e Charles, 1987). Os óleos voláteis apresentam atividades antibacterianas, antifúngicas e espasmolíticas, os terpenóides são antibacterianos e os flavonóides têm ação antioxidante. Cowan (1999), por sua vez, também mostrou a atividade antimicrobiana do alecrim através de um trabalho de revisão. Ele demonstrou a atividade antimicrobiana de várias espécies vegetais, relacionando as classes de substâncias químicas presentes em extratos obtidos com diferentes solventes. Esse considera ainda relevante o óleo essencial do alecrim e sua atividade sobre bactérias gram-positivas e negativas, vírus, fungos e protozoários e, atribui tal atividade principalmente aos terpenóides.

Entre todos os microrganismos testados por Del-Campo et al., (2000), as bactérias gram-positivas revelaram-se as mais sensíveis ao extrato de alecrim, corroborando com o presente estudo. Farbood et al., (1976) e Shelef (1983) também verificaram que esse extrato e o de outras plantas da família Labiatae foram inativos sobre bactérias gram-negativas. De acordo com Davidson (1993), as Gram-positivas são geralmente mais susceptíveis a compostos fenólicos apolares existentes nestas plantas do que as gram-negativas.

Nascimento et al., (2000) avaliaram a atividade do extrato alcoólico de alecrim associado a antibióticos sobre diversos microrganismos resistentes, dentre eles, *S. aureus*. Observaram eles que apresentou atividade quando utilizado isoladamente e quando associado a pequenas concentrações aos antibióticos inativos.

## **CONCLUSÃO**

O extrato alcoólico de alecrim apresentou atividade antimicrobiana satisfatória sobre as bactérias da cavidade bucal, *S. mutans*, *S. aureus* e *L. casei*, envolvidas na gênese e progressão de patologias como a cárie e abscessos periapicais. Esse achado demonstra a eficácia do alecrim contra bactérias bucais, sugerindo que os ingredientes de origem vegetal podem ser empregados como apoio à terapia das doenças cárie e periodontal, por serem economicamente viáveis e redutores dos efeitos colaterais das substâncias administradas na cavidade bucal.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1) ARTIZZU N, BONSIGNORE L, COTTGLIA F, LOY G. Studies of the diuretic and antimicrobial activity of *Cynodon dactylon* essential oil. *Fitoterapia*. 1995; 66:174-75.
- 2) ARUOMA OI, SPENCER JPE, WARREN D, JENNER P, BUTLER J, HALLIWELL B. Characterization of food antioxidants, illustrated using commercial garlic and ginger preparations. *Food Chem*. 1997; 60:149-56.
- 3) BASAGA H, TEKKAYA C, ACIKEL F. Antioxidative and free radical scavenging properties of rosemary extract. *Lebensmittel-Wiss. Technol.* 1997;30:105-108.
- 4) BUISCHI YP. Promoção de saúde bucal na clínica odontológica. São Paulo: Artes Médicas; 2000. p.45-50.
- 5) BAUER AW, KIRBY WMM, SHERRIS JC, TURC M. Antibiotics susceptibility test by a standardized single disk method. *Am. J. Clin. Pathol*. 1966; 45: 493-96.
- 6) CARVALHO JCT. Considerações gerais sobre fitoterápicos. In: CARVALHO, JCT. *Fitoterápicos antiinflamatórios: Aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas*. São Paulo:Tecmedd; 2004. p.43-47.
- 7) COLLINS M and CHARLES HP. Antimicrobial activity of carnosol and ursolic acid: two anti-oxidant constituents of *Rosmarinus officinalis* L. *Food Microbiol*. 1987; 4:311-315.
- 8) COWAN MM. Plants products as antimicrobial agents. *Clin. Microbiol. Rev*. 1999; 12:564-582.
- 9) DAVIDSON PM. Parabens and phenolic compounds. In: DAVIDSON, PM; BRANEN, AL. *Antimicrobial in foods*. New York: Marcel Dekker, Inc., 1993.

- 10) DEL CAMPO J, AMIOT MJ, NGUYEN-THE C. Antimicrobial Effect of Rosemary Extracts. J. Food Prot. 2000; 63:1359-68.
- 11) FARBOOD MI, MAcNEIL JH, OSTOVAR K. Effect of rosemary spice extractive on growth of microorganisms in meats. J. Milk Food Technol. 1976; 39: 675-679.
- 12) FRANKEL EN, HUANG SW, AESCHBACH R, PRIOR E. Antioxidant activity of a rosemary extract and its constituents, carnosic acid, carnosol, and rosmarinic acid, in bulk oil and oil-in-water emulsion. J. Agric. Food Chem. 1996; 44:131-135.
- 13) IZZO AA, Di CARLO G, BISCARDI D, FUSCO R, MASCOLO N, BORRELI F, CAPASSO F, FASULO MP, AUTORE G. Biological screening of Italian medicinal plants for antibacterial activity. Phytother. Res. 1995; 9:281-86.
- 14) JOHNSON BM, BOLTON JL, VAN BREEMEN RB. Screening Botanical Extracts for Quinoid Metabolites. Chem. Res. Toxicol. 2001; 14:1546-51.
- 15) KIKUZARI H and NIKATANI N. Antioxidants effects of some ginger constituents. J. Food Sci. 1993; 58:1407-10.
- 16) KUBO L, MUROI H, HIMEJIMA M. Structure-antibacterial activity relationships of anacardic acids. J. Agri. Food Chem. 1993; 41:1016-19.
- 17) MARTINS CAP, KOGA-ITO CY, JORGE C. Presence of *Staphylococcus* spp. and *Candida* spp. In the human oral. Braz j Microbiol. 2002; 33: 236-40.
- 18) MATOS FJA. Farmácias vivas. Fortaleza: UFC, 1998. p.18-20.
- 19) MORAN J, ADDY M, ROBERTS S. A comparison of natural product, triclosan and clorexidine muthrinses on 4-day plaque regrowth. J Clin Periodont. 1992; 19:578-82.

- 20) MOUJIR L, GUTIERREZ-NAVARRO AM, SAN ANDRES L, LUIS JG. Structure-antimicrobial activity relationships of abietane diterpenes from *Salvia* species. *Phytochemistry*. 1993; 14:1493-95.
- 21) NASCIMENTO GGF, LOCATELLI J, FREITAS PC, SILVA GL. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemical on antibiotic-resistant bacteria. *Braz J Microbiol*. 2000;31:247-56.
- 22) PEREIRA JV. Estudos com o extrato da *Punica granatum* Linn. (romã): efeito antimicrobiano *in vitro* e avaliação clínica de um dentifrício sobre microorganismos do biofilme dental. João Pessoa, 2002. [Tese de Doutorado- Universidade Federal da Paraíba, Universidade Federal da Bahia].
- 23) PRIYADARSINI KI. Free radical reactions of Curcumin in membrane models. *Free Radical Biol Med*. 1997; 23:838-43.
- 24) SALLÉ JL. O Totum em Fitoterapia: abordagem de fito-bioterapia. São Paulo: Robe, 1996. p.15-20.
- 25) SARTI SJ and CARVALHO JCT. Fitoterapia e Fitoterápicos. In: CARVALHO JCT. Fitoterápicos anti-inflamatórios: Aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas. São Paulo: Tecmedd, 2004. p.13-38.
- 26) SHAPOVAL EES, SILVEIRA SM, MIRANDA ML, ALICE CB, HENRIQUES AT. Evaluation of some pharmacological activities of *Eugenia uniflora*. *J. Ethnopharmacol*. 1994; 44:136-42.
- 27) SHELEF LA. Antimicrobial effects of spices. *J. Food Safety*. 1983; 6: 29-44.
- 28) SOARES DGS, OLIVEIRA CB, LEAL C, DRUMOND MRS, PADILHA WWN. Susceptibilidade *in vitro* de bactérias bucais a tinturas fitoterápicas. *Revista Odonto Ciência-Fac. Odonto/PUCRS*. 2006; 21:232-37.

29) SOUSA M, PINHEIRO C, MATOS MEO, MATOS FJ, LACERDA MI, CRAVEIRO AA. Constituintes químicos de plantas medicinais brasileiras. Fortaleza: Universidade Federal do Ceará, 1991. p.385-88.

30) ZHU BT, LODER DP, CAI MX, HO CT, HUANG MT, CONNEY AH. Dietary administration of an extract from Rosemary leaves enhances the liver microsomal metabolismo of endogenous estrogens and decreases their uterotrophic action in CD-1 mice. Carcinogenesis. 1998; 19:1821-27.

## ARTIGO 2

### AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA *IN VITRO* DO DENTIFRÍCIO À BASE DO EXTRATO ALCOÓLICO DE *Rosmarinus officinalis* Linn. (ALECRIM) SOBRE CEPAS PADRÃO DE *S. mutans*, *S. aureus* e *L. casei*

Marcela Agne Alves **VALONES**\*

Janete Magali de **ARAÚJO**\*\*

Jane Sheila **HIGINO**\*\*\*

Alessandra de Albuquerque Tavares **CARVALHO**\*\*\*\*

\*Aluna da Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE);

\*\*Profª. Dra. do Departamento de Antibióticos da UFPE

\*\*\*Profª. Dra. do Curso de Farmácia da UFPE;

\*\*\*\*Profª. Dra. do Curso de Mestrado em Odontologia da UFPE;

---

\*Marcela Agne Alves Valones; Rua Quarenta e oito, 395, apto.201, Espinheiro, Recife, Pernambuco, Brazil; CEP 52020-060; [mavalona@hotmail.com.br](mailto:mavalona@hotmail.com.br); Phones: 0xx8134260449, 8132222883, 8192528488

## RESUMO

### Objetivo

Avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro* do dentifrício à base do extrato alcoólico de *Rosmarinus officinalis* Linn. (Alecrim) sobre bactérias orais.

### Métodos

Foram utilizadas cepas padrão de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175), *Staphylococcus aureus* (ATCC 9811) e *Lactobacillus casei* (ATCC 7469), dentifrício à base de alecrim (CDA), dentifrício à base de própolis (CDB), dentifrício com triclosan (controle positivo) (CDC<sup>+</sup>) e dentifrício sem flúor (controle negativo) (CDC<sup>-</sup>). Após a manipulação do CDA, todos foram pesados e centrifugados para obtenção de sobrenadante, que foi diluído para a realização do teste antimicrobiano. Placas de Petri foram semeadas com as bactérias, e discos de papel embebidos com o sobrenadante e suas diluições colocados sobre as placas, sendo então incubadas de acordo com as exigências de crescimento das bactérias. Analisaram-se os halos de inibição estatisticamente através de suas média e desvio padrão. Utilizou-se o teste t de Student para amostras independentes, a fim de comparar o diâmetro médio do halo.

### Resultados

Observou-se que o CDA não apresentou diferença estatística em relação ao CDB para inibição de *S. mutans* (CDA:média 14.0; CDB:média 15.1; p= 0,420) e *S. aureus* (CDA:média 17,3; CDB: média 18,5; p=0,463). Em relação ao *L. casei* (CDA:média 16.5; CDB:média 23.8; p<0,001), verificou-se diferença estatisticamente significativa para o CDB.

### Conclusões

O dentifrício à base do extrato de alecrim apresentou capacidade de inibir o crescimento de *S. mutans*, *S. aureus* e *L. casei*, revelando um potencial antimicrobiano semelhante ao do creme dental disponível comercialmente para a inibição de *S. mutans* e *S. aureus*.

**PALAVRAS-CHAVE:** Fitoterapia; Dentifrício; Alecrim; *Rosmarinus officinalis*

## ABSTRACT

### Purpose

Assess the antimicrobial activity *in vitro* of a dentifrice with an alcohol base extracted from *Rosmarinus officinalis* Linn. (rosemary) on oral bacteria.

### Methods

Standard strains of *Streptococcus mutans* (ATCC 25175), *Staphylococcus aureus* (ATCC 9811) and *Lactobacillus casei* (ATCC 7469), a rosemary-based dentifrice (CDA), a propolis-based dentifrice (CDB), a dentifrice with triclosan (positive control) (CDC<sup>+</sup>) and a dentifrice without fluoride (negative control) (CDC<sup>-</sup>) were used. Following the mixing of the CDA, the dentifrices were weighed and centrifuged to obtain the supernatant, which was then diluted for the antimicrobial test. Petri dishes were sown with the bacteria and paper disks soaked in the supernatant and its dilutions were placed on the dishes and incubated in accordance with the growth requirements of the bacteria. Inhibition halos were statistically analyzed using means and standard deviations. The Student's t-test for independent samples was employed to compare mean halo diameters.

### Results

CDA revealed no statistical difference in relation to CDB for the inhibition of *S. mutans* (CDA: mean 14.0; CDB: mean 15.1;  $p=0.420$ ) and *S. aureus* (CDA: mean 17.3; CDB: mean 18.5;  $p=0.463$ ). There was a statistically significant difference favoring CDB with regard to *L. casei* (CDA: mean 16.5; CDB: mean 23.8;  $p<0.001$ ).

### Conclusions

The rosemary extract-based dentifrice exhibited a capacity of inhibiting the growth of *S. mutans*, *S. aureus* and *L. casei*, exhibiting an antimicrobial potential similar to commercially available toothpastes for the inhibition of *S. mutans* and *S. aureus*.

**KEY WORDS:** Phytotherapy; Dentifrice; Rosemary; *Rosmarinus officinalis*

## INTRODUÇÃO

Por um longo período de tempo, as plantas têm sido uma valiosa fonte de produtos naturais para a manutenção da saúde humana, especialmente na última década, quando as pesquisas sobre este tema foram intensificadas (Nascimento et al, 2000). A título de exemplo, o mercado mundial de fitoterápicos movimenta anualmente um montante de 20 a 40 bilhões de dólares (Perecin, 2001). De acordo com a Organização Mundial de Saúde (Santos et al, 1995), as plantas medicinais seriam as melhores fontes para a obtenção de várias drogas. Nos países desenvolvidos, cerca de 80% da população faz uso de componentes de plantas medicinais na medicina tradicional. Assim, cada uma deveria ser investigada para a melhor compreensão de suas propriedades, segurança de seu uso clínico e sua eficiência (Ellof, 1998).

Apesar do grande desempenho alcançado pela síntese química, as plantas medicinais são arsenais valiosos de substâncias e princípios ativos, constituindo uma forma de medicamento vegetal e de matéria prima para a indústria farmacêutica. É o caso do alecrim (*Rosmarinus officinalis* Linn.), conhecido por várias nomenclaturas em todo o mundo (Martin et al, 2004), como por exemplo, alecrim-de-jardim, alecrim-rosmarinho, libanotis, alecrinzeiro, dentre outros (Matos, 1998).

O alecrim é um arbusto perene, muito comum na vegetação da região mediterrânea e apresenta crescimento frente à diversidade de condições ecológicas. É bastante ramoso e densamente foliado, e seu caule pode atingir 1 a 2 metros de altura. As folhas são sésseis, lineares, inteiras, coriáceas e

persistentes, verdes e pontuagudo – rugosas (Herrera, 2005; Johnson et al, 2001; Matos, 1998).

A abrangência da utilização de fitoterápicos e de plantas medicinais é vasta e engloba fins variados, também em relação à saúde bucal (Monteiro et al, 2002). Dentro dessa perspectiva, volta-se atenção para um mal a ser combatido incessantemente: a cárie dentária, doença infecciosa crônica que para o seu desenvolvimento necessita de alguns fatores interagindo conjuntamente, como a presença de microrganismos, de substrato (sacarose) e do hospedeiro (dente) (Höfling et al, 1999). Ela se mostra como uma das patologias mais freqüentes nos seres humanos, caracterizando-se como uma alteração de grande importância epidemiológica para a Odontologia, atingindo todas as faixas etárias (Cardoso et al, 2000).

Patologias bucais, como a cárie dentária e doença periodontal, resultam diretamente da colonização bacteriana, seguida de infecções, embora outros fatores possam influenciar no curso desses males. O agente etiológico predominante, no entanto, é a presença de microrganismos depositados na superfície dentária, que formam uma massa aderente conhecida como biofilme dentário ou placa bacteriana. A presença do *S. mutans* é prevalente nas etapas iniciais da cárie, ao passo que o *L. casei* é encontrado na evolução da cavitação (Buisch, 2000). O *S. aureus*, considerado um microrganismo patogênico oportunista relevante na cavidade bucal, tem a capacidade de atuar como um microrganismo suplementar, freqüentemente encontrado em abscessos periapicais e estomatites protéticas (Martins et al, 2002). A remoção mecânica desta placa representa o meio mais difundido, comprovado e de maior efetividade na prevenção da cárie e doença periodontal (Lascale,

Moussalli, 1999; Addy et al, 1987). Existem, porém, dificuldades na remoção feita pelo próprio paciente (Addy et al, 1987). Ao se reconhecerem as limitações dos métodos mecânicos de higiene, realizaram-se pesquisas com agentes químicos visando o controle da placa (Addy et al, 1992).

O uso de escova com um dentífrico é a forma de higiene bucal mais amplamente praticada e reconhecida na maioria das regiões para o controle de placa supragengival. Como consequência, o creme dental proporciona um veículo ideal de agentes químicos. Dessa forma, a associação da escova com o dentífrico facilita a remoção de placa e promove a aplicação de agentes químicos nas superfícies dentárias com fins terapêuticos e preventivos da cárie e doença periodontal (Pannuti et al, 2003).

Recentemente, extratos de plantas têm sido incorporados nas fórmulas dos dentífricos, os quais além de apresentarem funções cosméticas, têm o objetivo principal de melhorar a ação antimicrobiana, atuando como agentes terapêuticos. Essa ação não está relacionada unicamente à presença do flúor na composição, que visa à prevenção e à reversão de cáries incipientes, mas também à de outras substâncias incorporadas nas fórmulas (Fernandes, Assunção, 1997).

Baseado no exposto, o objetivo do presente trabalho foi produzir um dentífrico experimental à base do extrato de *Rosmarinus officinalis* Linn. (alecrim) e avaliar sua atividade antimicrobiana *in vitro* sobre bactérias envolvidas na etiologia de processos patológicos bucais, como *S. mutans*, *S. aureus* e *L. casei*, comparando-o com outros dentífricos disponíveis comercialmente.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Preparação do Dentifrício

A manipulação do dentifrício foi realizada obedecendo à tecnologia específica, conforme dados da Tabela 1, e a dose terapêutica definida por uma concentração eficaz e a 1/6 da DL<sub>50</sub> do *Rosmarinus officinalis* Linn. publicada por Sena et al, (1993). A eficácia foi determinada pelos estudos laboratoriais de padronização da atividade antimicrobiana do extrato sobre bactérias bucais, como *S. mutans*, *L. casei* e *S. aureus*. No desenvolvimento tecnológico do dentifrício, foram avaliados grau de abrasividade, pH, capacidade espumante e características organolépticas.

**Tabela 1:** Composição , função e quantidade da formulação do dentifrício à base do extrato de *Rosmarinus officinalis* Linn. (p/100g do produto)

Formulações Constituintes	CRD									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<b>Carbonato de Cálcio</b> (Abrasivo)	35,0	35,0	40,0	40,0	40,0	45,0	45,0	45,0	50,0	40,0
<b>Sorbitol</b> (Umectante)	15,0	20,0	20,0	5,0	25,0	30,0	35,0	40,0	40,0	20,0
<b>C.M.C</b> (Aglutinante/ espessante)	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
<b>Carbopol940</b> (Aglutinante/ espessante)	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
<b>Laurilsulfato de Sódio</b> (Espumante)	1,0	1,5	2,0	2,0	2,5	3,0	3,5	3,5	4,0	4,0
<b>Sacarina</b> (Edulcorante)	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1,0	1,5	1,5	1,5	1,0
<b>Benzoato de sódio</b> (Conservante)	0,1	0,1	0,1	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,1	0,1
<b>Mentol</b> (Aromatizante)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0

<b>Extrato vegetal</b> (Antimicrobiano)	9,53	9,53	9,53	9,53	9,53	9,53	9,53	9,53	9,53	9,53	9,53
<b>H<sub>2</sub>O dest.q.s.p</b> (Diluyente)	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100

Misturou-se o aglutinante/espessante mais o umectante e o edulcorante em água destilada. Agitou-se vigorosamente até formação de uma mucilagem homogênea, à qual acrescentou-se o corpo polidor ou abrasivo, devidamente peneirado, e o espumante. Adicionou-se o restante da água, agitando-se lentamente para evitar a formação de espumas e, após a obtenção da pasta homogênea, o extrato foi colocado e agitou-se vigorosamente até a consistência de um creme macio e brilhante. O creme dental obtido, que tem coloração castanho -esverdeada, foi envasado rapidamente para evitar ressecamento.

### **Linhagens bacterianas**

Para o estudo, foram utilizadas cepas padrão de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175), *Staphylococcus aureus* (ATCC 9811) e *Lactobacillus casei* (ATCC 7469), obtidas mediante solicitação no Laboratório de Materiais de Referências do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ). As cepas foram reativadas no Laboratório de Coleção de Culturas do Departamento de Antibióticos da UFPE.

### **Seleção dos dentifrícios**

Para este teste, foram utilizados os seguintes dentifrícios:

- Creme dental A (CDA): dentifrício à base do extrato de alecrim;
- Creme dental B (CDB): dentifrício à base de própolis (Sorriso Herbal com Própolis®);

- Creme dental C<sup>+</sup> (CDC<sup>+</sup>): dentifrício com triclosan (Colgate Total 12<sup>®</sup>) como controle positivo;
- Creme dental C<sup>-</sup> (CDC<sup>-</sup>): dentifrício sem flúor ou outro antimicrobiano (Philips<sup>®</sup>) como controle negativo;

Inicialmente, foram pesados 10g de cada dentifrício e diluídos em 10ml de solvente (etanol). As misturas agitadas em vortex por 3 minutos para obtenção de solução homogênea foram, em seguida, centrifugadas durante 10 minutos a 1000rpm, com o objetivo de precipitar as partículas sólidas dos dentifrícios. Diluíram-se os sobrenadantes resultantes nas proporções de 1:2, 1:4 e 1:8.

### **Teste antimicrobiano dos dentifrícios**

Adotou-se a técnica de Difusão em Ágar, segundo Bauer et al, (1966), para verificação da atividade antimicrobiana do dentifrício de alecrim sobre cepas padrão de *S.mutans*, *S. aureus* e *L.casei*. Inicialmente, placas de Petri, contendo 10ml de meio BHI (Brain Heart Infusion – DIFCO<sup>®</sup>) estéreis, foram inoculadas com suspensões das bactérias *S. mutans*, *S. aureus* e *L. casei*. Discos estéreis foram embebidos com 60 µl de cada solução obtida e diluída dos sobrenadantes dos dentifrícios e colocados nas placas, obedecendo a uma disposição que evitasse a sobreposição dos halos de inibição. Realizou-se o mesmo procedimento para os controles positivo e negativo do estudo. As placas foram adequadamente identificadas e colocadas na estufa a 37°C por 48 horas, e o *S. mutans* colocado em condições de microaerofilia. Os demais foram postos em condições de aerobiose. Com a finalidade de reduzir a variabilidade, controlar o estudo e obter resultados fidedignos, optou-se por fazer o teste em duplicata para cada cultura utilizada.

## **Análise estatística**

Os dados foram resumidos através de média e desvio padrão. Os dentifrícios foram comparados dois a dois, em duas ocasiões: controlando-se o tipo de bactéria e controlando-se o tipo de bactéria e diluição. Em cada uma delas, utilizou-se o teste t de Student para amostras independentes, a fim de comparar o diâmetro médio do halo. Em cada teste, adotou-se o nível de significância de 0,05. A análise estatística foi realizada com o “software” Stata 9.2.

## **RESULTADOS**

Os resultados da atividade antimicrobiana *in vitro* do CDA sobre as bactérias *S. mutans*, *S. aureus* e *L.casei*, bem como os resultados da sua comparação com os CDB, CDC<sup>+</sup> e CDC<sup>-</sup> estão expostos nas tabelas 2 e 3.

**Tabela 2:** Comparação entre as médias dos halos de inibição (mm) dos CDA, CDB, CDC<sup>+</sup> e CDC<sup>-</sup> controlando o tipo de bactéria

BACTÉRIA	COMPARAÇÃO	MÉDIA ± DP	VALOR DE P (*)
<i>S. mutans</i>	CDA x CDB	A 14.0 ± 2.4 B 15.1 ± 3.0	0,420
	CDA x CDC <sup>+</sup>	A 14.0 ± 2.4 C <sup>+</sup> 14.0 ± 2.2	1,000
	CDA x CDC <sup>-</sup>	A 14.0 ± 2.4 C <sup>-</sup> 6.8 ± 4.8	0,005
<i>S. aureus</i>	CDA x CDB	A 17.3 ± 2.8 B 18.5 ± 3.7	0,463
	CDA x CDC <sup>+</sup>	A 17.3 ± 2.8 C <sup>+</sup> 29.3 ± 3.6	< 0,001
	CDA x CDC <sup>-</sup>	A 17.3 ± 2.8 C <sup>-</sup> 8.5 ± 6.2	< 0,006
<i>L.casei</i>	CDA x CDB	A 16.5 ± 3.0 B 23.8 ± 3.5	< 0,001
	CDA x CDC <sup>+</sup>	A 16.5 ± 3.0 C <sup>+</sup> 16.8 ± 2.8	0,891
	CDA x CDC <sup>-</sup>	A 16.5 ± 3.0 C <sup>-</sup> 10.3 ± 7.1	0,052

(\*) Foram realizadas oito observações com o CDA; oito com o CDB; quatro com o CDC<sup>+</sup> e quatro com o CDC<sup>-</sup>  
P < ou = 0,05 (significância estatística)

Considerando o *S. mutans*, patógeno responsável pela iniciação da cárie, não houve diferença significativa quando se comparou o CDA com o CDB e o CDC<sup>+</sup>, o que mostra atividade antimicrobiana semelhante entre os cremes dentais. Ao comparar o CDA com o CDC<sup>-</sup>, verificou-se diferença significativa, mostrando atividade melhor para o CDA.

Considerando o *S. aureus*, patógeno relacionado com a gênese dos abscessos, não se identificou diferença significativa quando da comparação do CDA com o CDB, mostrando atividade antimicrobiana semelhante. Ao fazê-lo, no entanto, CDA com o CDC<sup>+</sup> e CDA com o CDC<sup>-</sup>, houve diferença significativa, comprovando atividade superior para o CDC<sup>+</sup> e inferior para o CDC<sup>-</sup> em relação ao CDA.

Considerando o *L. casei*, patógeno responsável pela progressão da cárie, constatou-se diferença significativa quando da comparação do CDA com o CDB, mostrando atividade antimicrobiana superior para o CDB. No entanto, ao comparar o CDA com o CDC<sup>+</sup>, essa diferença significativa não foi verificada. O mesmo ocorrendo, ao comparar o CDA com o CDC<sup>-</sup>.

**Tabela 3:** Comparação entre as médias do halo de inibição (mm) dos CDA e CDB controlando o tipo de bactéria e a diluição do sobrenadante

BACTÉRIA	DILUIÇÃO	CREME DENTAL		VALOR DE P
		A	B	
<i>S. mutans</i>	SP	17± 2.8	19 ± 0.0	0,423
	1:2	14± 1.4	16 ± 1.4	0,293
	1:4	13± 1.4	14± 0.0	0,493
	1:8	12 ± 0	11.5±0.7	0,423
<i>S. aureus</i>	SP	20.5±2.1	22±1.4	0,493
	1:2	17.5±2.1	20.5±0.7	0,198
	1:4	17±1.4	18±0.0	0,423
	1:8	14±1.4	13.5±3.5	0,870
<i>L. casei</i>	SP	20.5±2.1	28.5±0.7	0,037
	1:2	17±1.4	25±0.0	0,015
	1:4	15±0.0	21.5±0.7	0,006
	1:8	13.5±0.7	20±0.0	0,006

P < ou = 0,05 (significância estatística)

Não houve diferença significativa entre CDA e CDB ao observar as diferentes diluições realizadas e os patógenos utilizados, com exceção da comparação ao considerar o *L. casei*, para o qual o CDB se mostrou mais ativo em todas as diluições realizadas.

## DISCUSSÃO

De acordo com este estudo, observou-se que o dentifrício à base do extrato de alecrim apresentou uma relevante capacidade de inibir o

crescimento bacteriano de *S. mutans*, *S. aureus* e *L. casei*, demonstrando potencial antimicrobiano semelhante ao do creme dental Sorriso Herbal com Própolis® para a inibição de *S. mutans* e *S. aureus*.

Barreto et al, (2005) analisaram o potencial antimicrobiano *in vitro* de 7 dentifrícios contendo fitoterápicos sobre bactérias orais tanto recuperadas da saliva, quanto sob a forma de cepas padrão. Corroborando o presente estudo, os autores obtiveram soluções concentradas dos dentifrícios através de centrifugação. Os sobrenadantes foram diluídos e embebidos em discos de papel e realizado o teste de difusão em Ágar. Todos os dentifrícios apresentaram atividade antimicrobiana contra as cepas padrão e bactérias recuperadas da saliva, exceto os dentifrícios Gessy Cristal® e Parodontax®, respectivamente.

A eficácia de plantas medicinais, como componentes tanto nos géis dentifrícios, como nos enxaguatórios bucais, tem sido investigada para o tratamento de gengivites. Os resultados sugerem que os ingredientes de origem vegetal podem ser empregados como apoio à terapia das doenças periodontais e como profilaxia de rotina (Willershausen et al,1994).

Os dentifrícios compostos por extratos de plantas, também chamados de herbários, vêm sendo investigados e aplicados há muitos anos em vários países (Gusmão et al, 2004). Nunes et al, (2006) produziram e avaliaram um creme dental e um colutório à base do extrato hidroalcoólico de *Lippia sidoides* Cham. Os autores incorporaram o extrato em preparações odontológicas para uso diário em escovação e bochechos, com vistas a avaliar parâmetros tecnológicos e os efeitos dessas preparações. Isso objetivava determinar a viabilidade dessa planta como coadjuvante eficiente no controle do biofilme

dentário. Após um período de 28 dias de uso, o creme dental e o colutório demonstraram ser eficientes como coadjuvantes na higiene bucal, por reduzirem de forma significativa o Índice de Biofilme Dentário.

Este estudo buscou comparar um dentifrício à base de alecrim com um de marca comercial contendo própolis. Os resultados obtidos mostraram que, em relação ao *S. mutans* e ao *S. aureus*, houve atividade antimicrobiana semelhante entre os dentifrícios citados, o que não ocorreu com *L. casei*, pois o dentifrício à base de própolis se mostrou com atividade antimicrobiana superior à de alecrim.

Estudos com própolis incorporado em dentifrícios são encontrados na literatura como o de Panzeri et al, (1999), que desenvolveram um dentifrício na forma de gel com 3% de própolis verificando características de pH, abrasividade, densidade, viscosidade e índice de espuma. O dentifrício foi clinicamente testado e comparado a um semelhante, porém sem própolis, em um ensaio duplo-cego. O primeiro mostrou-se mais efetivo do que aquele destituído do agente terapêutico no controle do índice gengival, sendo uma alternativa viável como agente preventivo ou terapêutico da doença periodontal.

Avaliar o efeito de dentifrício Parodontax<sup>®</sup> na redução de placa e gengivite constituiu-se o objetivo do ensaio clínico realizado por Pannuti et al, (2003). Após aferição dos Índices de Placa e Gengival, os participantes foram orientados a escovar os dentes com o dentifrício 3 vezes ao dia por 21 dias. Não houve redução significativa dos índices nos grupos teste e controle, não havendo assim diferença entre os dentifrícios Parodontax<sup>®</sup> e controle. Contrariamente a estes achados, Gusmão et al (2004) concluíram em seus

estudos que o dentifrício Parodontax<sup>®</sup> apresentou melhor comportamento em relação aos demais testados. Os autores tinham como objetivo analisar dois diferentes dentifrícios disponíveis no mercado (Parodontax<sup>®</sup> e Colgate Herbal<sup>®</sup>) cujos componentes ativos são produtos naturais, na redução dos graus de gengivite e da condição gengival, comparativamente a um dentifrício convencional (Colgate<sup>®</sup>). Independente dos dentifrícios utilizados para o tratamento da gengivite, houve redução significativa do índice gengival inicial para o final e o dentifrício Parodontax<sup>®</sup> se mostrou mais efetivo.

Komiyama et al, (2004) avaliaram *in vitro* o efeito de dentifrícios comercialmente disponíveis no Brasil sobre o crescimento de *S. mutans* utilizando metodologia semelhante ao presente estudo. Com base nos resultados obtidos, os autores concluíram serem os dentifrícios contendo triclosan ou combinação de extratos herbais os mais eficazes na inibição do crescimento de *S. mutans* em relação aos demais testados. No entanto, Fisher, (1999), afirmou que os dentifrícios compostos de ervas medicinais não demonstraram efeitos clínicos satisfatórios a curto e longo prazo no controle de placa. É importante a existência de novas pesquisas sobre o tema para que haja mais evidências científicas acerca do poder dos dentifrícios à base de fitoterápicos.

## **CONCLUSÃO**

Os resultados obtidos nesta pesquisa mostram que o dentifrício à base do extrato de alecrim apresenta capacidade de inibir o crescimento de bactérias bucais estudadas, demonstrando que a eficácia de plantas medicinais nesse contexto é um ideal alcançado e que pode ser aprimorado a cada

estudo. Criar produtos de higiene bucal com ingredientes naturais se mostra como uma alternativa viável para o controle da placa bacteriana e da cárie, além de promover o uso dos benefícios proporcionados pela natureza e à disposição no próprio habitat. Os melhores resultados com o dentifrício à base do extrato alcoólico de *Rosmarinus officinalis* Linn. foram com os patógenos *S. mutans* e *S. aureus*, onde a atividade antimicrobiana do dentifrício à base de alecrim se mostrou semelhante a atividade do dentifrício Sorriso Herbal com Própolis®. Para a inibição do *L. casei*, este último dentifrício se mostrou mais eficaz do que o à base de alecrim.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1) ADDY M, GRIFFITHS G, DUMMER P, KINGDOM A, SHAW WC. The distribution of plaque and gingivitis and the influence of tooth brushing in a group of South Wales 11-12 years old children. *J. Clin. Periodontol.* 1987;14: 564-72.
- 2) ADDY M, SLAYNE MA, WADE WG. The formation and control of dental plaque-an overview. *J. Appl. Bacteriol.* 1992; 73: 269-79.
- 3) BARRETO VL, FEITOSA AMSC, ARAÚJO TJ, CHAGAS FK, COSTA LK. Acción antimicrobiana *in vitro* de dentífrices contiendo fitoterápicos. *Av. Odontoestomatol.* 2005; 21: 195-201.
- 4) BAUER AW, KIRBY WMM, SHERRIS JC, TURC M. Antibiotics susceptibility test by a standardized single disk method. *Am. J. Clin. Pathol.* 1966; 45: 493-96.
- 5) BUISCHI, YP. Promoção de saúde bucal na clínica odontológica. São Paulo: Artes Médicas, 2000. p.45-50.
- 6) CARDOSO L, ROSING CA, KRAMER TF. Doença periodontal em crianças- levantamento epidemiológico através dos índices de placa visível e de sangramento gengival. *J. Bras. Odontoped. Odontol. Bebê.* 2000; 3: 55-61.
- 7) DEL CAMPO J, AMIOT MJ, NGUYEN-THE C. Antimicrobial Effect of Rosemary Extracts. *J. Food Prot.* 2000; 63:1359-68.
- 7) ELLOF JN. Which extractant should be used for the screening and isolation of antimicrobial components from plants? *J. Ethnopharmacol.* 1998; 60:1-6.
- 8) FERNANDES LMAG, ASSUNÇÃO IV. Dentífrícios. In: OLIVEIRA AGRC, ALBUQUERQUE AJ, REGO DM, SILVA EM, SOUZA ECF, COSTA ICC. et al.

Odontologia preventiva e social: textos selecionados. Natal (RN): EDUFRN; 1997. p.179-90.

9) FISHER RG. Controle mecânico e químico do biofilme dental. In: TUNES UR, RAPP GE. Atualização em periodontia e implantodontia. São Paulo: Artes Médicas, 1999.

10) GUSMÃO ES, JOVINO-SILVEIRA RC, ARAÚJO ACS, SANTOS RL. Tratamento da gengivite com dentifrícios herbais. Rev. Periodont. 2004;14: 5-9.

11) HERRERA J. Flower size variation in *Rosmarinus officinalis*: Individuals, populations and habitats. Ann. Bot. 2005;95: 431-37.

12) HÖFLING JF, SPOLIDÓRIO DMP, PEREIRA CV, ROSA EAR, MOREIRA D. Presença de *Streptococcus mutans* e *Streptococcus mutans* associado a *Streptococcus sobrinus* em escolares de diferentes classes sócio econômicas e sua relação com a atividade cariogênica dessas populações. Rev. Odontol. Univ. São Paulo, 1999; 13: 44-58.

13) JOHNSON BM, BOLTON JL, VAN BREEMEN RB. Screening botanical extracts for quinoid metabolites. Chem. Res. Toxicol. 2001;14: 1546-51.

14) KOMIYAMA EY, MARTINS CAP, JORGE AOC, KOGA-ITO CY. Estudo *in vitro* de dentifrícios comercialmente disponíveis no Brasil: efeito inibitório sobre *Streptococcus mutans*. Rev. Odontol. UNICID. 2004;16:21-7.

15) LASCALA NT, MOUSSALLI NG. Higienização bucal. In: \_\_\_\_\_ Compêndio terapêutico periodontal. 3<sup>o</sup> ed. São Paulo: Artes Médicas, 1999.

16) MARTIN SMM, NARANJO JLP, SALVADÓ AC, RUIZ CM. Actividad diurética y antipirética de um extracto fluido de *Rosmarinus officinalis* L. em ratas. Rev. Cubana Plant. Med. 2004; 9:19-24.

- 17) MARTINS CAP, KOGA-ITO CY, JORGE C. Presence of *Staphylococcus* spp. and *Candida* spp. In the human oral. Braz j Microbiol. 2002; 33: 236-40.
- 18) MATOS FJA. Farmácias vivas. 3ed, Fortaleza: UFC, 1998. p.18-20.
- 19) MONTEIRO AMD, ARAÚJO RPC, GOMES FILHO IS. Diabetes Mellitus tipo 2 e doença periodontal. Rev. Gaúcha Odontol. Porto Alegre. 2002; 50: 50-54.
- 20) NASCIMENTO GGF, LOCATELLI J, FREITAS PC, SILVA GL. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemical on antibiotic-resistant bactéria. Braz J Microbiol. 2000; 31: 247-56.
- 21) NUNES RS, LIRA AAM, LACERDA CM, SILVA DOB, SILVA JÁ, SANTANA DP. Obtenção e avaliação de dentifrícios à base do extrato hidroalcoólico da *Lippia sidoides* Cham (Verbenaceae) sobre o biofilme dentário. Rev. Odontol. UNESP. 2006; 35: 275-83.
- 22) PANNUTI CM, MATTOS JP, RANOYA PN, JESUS MA, LOTUFO RFM, ROMITO GA. Clinical effect of a herbal dentifrice on the control of plaque and gingivitis. A double-blind study. Pesqui. Odontol. Bras. 2003;17:314-8.
- 23) PANZERI H, PEDRAZZI V, OGASAWARA MS, ITO IY, LARA EHG, GABARA FR. Um dentifrício experimental contendo própolis: avaliações físicas, microbiológicas e clínicas. Rev. ABO Nac. 1999;7:26-30.
- 24) PERECIN MB. Produção e mercado de plantas medicinais, aromáticas e condimentares: perspectivas para o pequeno produtor. Anais, Congresso Brasileiro de Horticultura Orgânica, Natural e Biodinâmica, Botucatu, SP: 2001. p.245.
- 25) SANTOS PRV, OLIVEIRA ACX, TOMASSINI TCB. Controle microbiológico de produtos fitoterápicos. Rev. Farm. Bioquim. 1995; 31:35-38.

26) SENA KXFR, ANDRADE MSAS, LIMA RC, SANTOS ER. Atividades biológicas da *Rosmarinus officinalis* L. (R. Latifolius Mill.), Bol. Soc. Brot. Ser. 1993;2:97-109.

27) WILLERSHAUSEN B, GRUBER I, HAMM G. Índice de placa e sangramentos gengivais: a influência de ingredientes herbários. Rev. Assoc. Paul. Cir. Dent. 1994;48,335-40.

## ANEXOS

### Normas da Revista Microbiological Research

**1. Microbiological Research** is devoted to publishing reports on prokaryotic and eukaryotic microorganisms such as yeasts, fungi, bacteria, archaea and protozoa. Research on interactions between pathogenic microorganisms and their environment or hosts are also covered. The research should be original and include molecular aspects to generate a significant contribution of broad interest. Papers of very specialised or of preliminary and descriptive content will normally not be considered. Studies in the following sections are included:

- Reviews/Minireviews on all aspects
- Microbiology and Genetics
- Molecular and Cell Biology
- Metabolism and Physiology
- Signal transduction and Development
- Biotechnology
- Phytopathology
- Environmental Microbiology and Ecology

**2. Copyright** Once a paper is accepted, authors will be asked to transfer copyright (for more information on copyright, see <http://www.elsevier.com/authorsrights>). A form facilitating transfer of copyright will be provided after acceptance. If material from other copyrighted works is included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article.

**3. Electronic submission:** All manuscripts should be submitted electronically through **Elsevier Editorial System (EES)** which can be accessed at <http://ees.elsevier.com/micres>.

**4.** Each manuscript submitted to Microbiological Research will be reviewed independently by two members of the editorial board or by experts covering the field of the article. Authors may suggest up to five colleagues with expertise in the scientific field of the contribution, which do not and did not belong to the authors' institution. These might be considered as referees. The corresponding authors are informed on the editorial procedure. Papers may be returned for modification or revision within 90 days or shall be treated as new submissions.

**5.** Papers should be written in English (double spaced throughout with wide margins and aligned to the left). Lines should be numbered.

**6.** It is expected that all microbial strains, mutants and plasmids described in an accepted paper will be made available to the non-profit orientated scientific community.

**7.** Manuscripts should include:

**Title page.** It should contain in this order: title, names of authors, affiliations of authors, an abstract of 200 words maximum, 3-5 key words, and, on the bottom of the first page, the corresponding author ideally together with an e-mail address.

**Introduction.** It should provide sufficient information on the topic to allow the reader to understand and evaluate the research of the presented study. Previous work should be cited correctly without providing a lengthy review on the topic. The introduction should clearly outline the scientific hypothesis that was analyzed and the rationale for the study and the experiments undertaken.

**Materials and methods.** This section must be detailed enough to allow reproduction of the experiments described. Novel methods and relevant modifications as well as genuine technical innovations have to be described completely, but there is no need for repeating methods that are published in detail elsewhere. Basic principle of this section is to allow reproducibility of the experimental work.

**Results.** This section should present the data as clearly as possible. Authors are encouraged to describe the rationale for the experimental design, but extensive interpretations must be reserved for the Discussion. Please avoid redundancy in the presentation of data. Results in the form of a figure may not be presented additionally as a table or *vice versa*.

**Discussion.** It should give the main conclusions from the experimental data without repeating them in length, and should interpret them with respect to relevant literature. The discussion may be followed by Acknowledgements of personal, institutional and financial assistance.

**References.** Citations in the text are given by author and year (Cavalier-Smith, 1998). In case of two authors both are named (Wendland and Walther, 2005). Publications by three or more authors are cited by the first author's name plus *et. al.* (Neumann et al., 1998). In taxonomic papers complete species citations including authors and year of description are required. Please list the publications in alphabetical order in the References section according to the following examples.

**Journals:**

Wendland J and Walther A. *Ashbya gossypii*: a model for fungal developmental biology. Nat Rev Microbiol 2005;3:421–429. Wendland J, Vaillancourt LJ,

Hegner J, Lengeler KB, Laddison KJ, Specht CA, Raper CA, Kothe E. The mating-type locus *B alpha 1* of *Schizophyllum commune* contains a pheromone receptor gene and putative pheromone genes. EMBO J 1995;14(21):5271–5278.

**Books:**

Banuett F. Life cycle determinants of the plant pathogen *Ustilago maydis*. In: Bennett JW, Lasure LL, editors. More gene manipulations in fungi. London: Academic Press; 1991. p. 217–233.

**Endnote users:** A template for download is available under [www.elsevier.de/micres](http://www.elsevier.de/micres) at the Instructions to authors' page.

**8. Figures and Tables** are justified only if they are needed to understand the data; mere illustrations are not acceptable. Redundancy of figures and tables must be avoided. Figures must be submitted ready for reproduction. Microphotographs need to contain space bars. Figures must be supplied in digital format (EPS or TIFF format, resolution for final size of figure 300 dpi for halftones, 600–1200 dpi for black/white line drawings). Legends are provided separately from the figures and should provide a short title followed by sufficient information to avoid frequent reference to the text.

**Free colour reproduction.** If, together with your accepted article, you submit usable colour figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in colour on the web (e.g., Science Direct and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in colour in the printed version. For colour reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article. Be aware, quality and information could be lost if colour figures will be print in black

and white. For further information on the preparation of electronic artwork, please see [www.elsevier.com/locate/authorartwork](http://www.elsevier.com/locate/authorartwork).

**9.** Gene symbols (*lexA*), scientific names of organisms of all taxonomic ranks (*Parasitella parasitica*, *Mucorales*, *Zygomycota*) as well as non-English words (*in situ*, *in vitro*, *sensu stricto*) are printed in italics. The extensive use of abbreviations is discouraged. Abbreviations should be used only if they help to improve clarity of the text. Please refer to a recent issue of the journal with respect to details of journal style. A sample manuscript in PDF-format can be seen on Science Direct. Authors are requested to use English spelling and to seek help of a native speaker with respect to English style, grammar and expression.

**10.** There are **no page charges**. The corresponding author, at no cost, will be provided with a PDF file of the article via e-mail or, alternatively, 30 free paper off prints. The PDF file is a watermarked version of the published article and includes a cover sheet with the journal cover image and a disclaimer outlining the terms and conditions of use. Additional reprints may be ordered. Until publication of the print edition, corrected proofs will be available at online first ([www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)).

#### **11. Funding body agreements and policies**

Elsevier has established agreements and developed policies to allow authors who publish in Elsevier journals to comply with potential manuscript archiving requirements as specified as conditions of their grant awards. To learn more about existing agreements and policies please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies>.

---

## Oral Health & Preventive Dentistry

### GUIDELINES FOR AUTHORS

---

**Oral Health & Preventive Dentistry** is a quarterly journal conveying scientific progress to clinicians, general practitioners, teachers, researchers and public health administrators in the field of oral health and prevention of caries, periodontal diseases, oral mucosal diseases and dental trauma. It includes oral hygiene, oral epidemiology, oral health promotion and public health aspects as central topics of the scope.

**Within the scope** the Journal publishes peer-reviewed original articles as mentioned below:

1. **Clinical and basic science research reports of high scientific standard.**
2. **Reviews on topics related to oral health and prevention.**
3. **Invited focus articles** - presenting a position or a hypothesis based on existing scientific contributions. The Editorial Board invites the authors of these articles.
4. **Invited commentaries** - addressing controversial aspects of invited focus articles. These commentaries are published in the same issue of the Journal as the Invited focus articles to which they are related. The Editorial Board invites authors of commentaries.
5. **Invited guest editorials** - as solicited by the Editorial Board.
6. **Proceedings of symposia, workshops, or conferences.**
7. **Case reports** - illustrating new important clinical aspects.
8. **Letters to the Editor(s).**

#### SUBMISSION INSTRUCTIONS

Submission via online submission service ([www.manuscriptmanager.com/ohpd](http://www.manuscriptmanager.com/ohpd)). Manuscript texts should be uploaded as PDF or PC-word files with tables and figures preferably embedded within the PC-word document. High resolution images (300 dpi) will be requested on acceptance of the manuscript.

Alternatively, submit via e-mail as a PC-word document ([info@quintpub.co.uk](mailto:info@quintpub.co.uk)). Illustrations can be attached in any format that can be opened using Adobe Photoshop, (TIF, GIF, JPG, PSD, EPS etc.) or as Microsoft PowerPoint Documents (ppt).

#### Mailing address:

##### Manuscript Editor

##### Oral Health & Preventive Dentistry

Andrew Johnson

Quintessence Publishing Co., Ltd., Grafton Road,

New Malden, Surrey KT3 3AB, Great Britain

Tel.: + 44(0)20 8949 6087.

Fax: + 44(0)20 8336 1484.

Email: [info@quintpub.co.uk](mailto:info@quintpub.co.uk).

Illustrations that cannot be sent electronically will be scanned at the editorial office so that they can be sent to reviewers via e-mail along with the manuscript to expedite the evaluation process. Resubmitted manuscripts should also be submitted in the above manner. Please note that supplying electronic versions of your tables and illustrations upon resubmission will assure a faster publication time if the manuscript is accepted.

**Number of Authors.** Authors listed in the byline should be limited to 6. Secondary contributors can be

acknowledged at the end of the article (Special circumstances will be considered by the editors).

**Review/editing of manuscripts.** Manuscripts will be reviewed by the editors, and at least two reviewers with expertise within the scope of the article. The publisher reserves the right to edit accepted manuscripts to fit the space available and to ensure conciseness, clarity, and stylistic consistency, subject to the author's final approval.

**Adherence to guidelines.** Manuscripts that are not prepared in accordance with these guidelines will be returned to the author before review.

#### MANUSCRIPT PREPARATION

• The Journal will follow as much as possible the recommendations of the International Committee of Medical Journal Editors (Vancouver Group) in regard to preparation of manuscripts and authorship (Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals. *Ann Intern Med* 1997;126: 36-47).

• **Title page.** The first page should include the title of the article (descriptive but as concise as possible) and the names, degrees, title, professional affiliation, and full address of all authors. Phone, fax, and e-mail address must also be provided for the corresponding author, who will be assumed to be the first-listed author unless otherwise noted. If the paper was presented before an organised group, the name of the organisation, location, and date should be included.

• **3-5 keywords.**

• **Structured abstract.** Include a maximum 250-word structured abstract (with headings Purpose, Materials and Methods, Results, Conclusion).

• **Introduction.** Summarise the rationale and purpose of the study, giving only pertinent references. Clearly state the working hypothesis.

• **Materials and Methods.** Present materials and methods in sufficient detail to allow confirmation of the observations. Published methods should be referenced and discussed only briefly, unless modifications have been made. Indicate the statistical methods used, if applicable.

• **Results.** Present results in a logical sequence in the text, tables, and illustrations. Do not repeat in the text all the data in the tables or illustrations; emphasise only important observations.

• **Discussion.** Emphasise the new and important aspects of the study and the conclusions that follow from them. Do not repeat in detail data or other material given in the Introduction or Results section. Relate observations to other relevant studies and point out the implications of the findings and their limitations.

• **Acknowledgments.** Acknowledge persons who have made substantive contributions to the study. Specify grant or other financial support, citing the name of the supporting organisation and grant number.

• **Abbreviations.** The full term for which an abbreviation stands should precede its first use in the text unless it is a standard unit of measurement.

• **Trade names.** Generic terms are to be used whenever possible, but trade names and manufacturer should be included parenthetically at first mention.

#### REFERENCES

• **All references must be cited** in the text, (Author, year) according to the alphabetical and numerical reference list. More than two authors use et al (Author et al, year).

• **The reference list** should appear at the end of the article, in alphabetical and numerical sequence.

• Do not include unpublished data or personal communications in the reference list. Cite such references parenthetically in the text and include a date.

• **Avoid using abstracts** as references.

• **Provide complete information** for each reference, including names of all authors (up to six). If the reference is to part of a book, also include title of the chapter and names of the book's editor(s).

• **For journal abbreviations** please use the NCBI Journal Browser at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=Journals>

#### Journal reference style:

1. Bertacchini SM, Abate PF, Blank A, Baglieto MF, Macchi RL. Solubility and fluoride release in ionomers and compomers. *Quintessence Int* 1999;30:193-197.

#### Book reference style:

1. Hannam AG, Langenbach GEJ, Peck CC. Computer simulations of jaw biomechanics. In: McNeill C (ed). *Science and Practice of Occlusion*. Chicago: Quintessence 1997;187-194.

#### ILLUSTRATIONS

• All illustrations must be numbered and cited in the text in order of appearance. Electronic submission preferred.

• **Line drawings** - Figures, charts, and graphs should be professionally drawn and lettered large enough to be read after reduction.

• **Legends** - Figure legends should be grouped on a separate sheet or at the end of the text file, and typed double-spaced.

#### TABLES

• Each table should be logically organised, on a separate sheet or at the end of the text file, and numbered consecutively.

• The title and footnotes should be typed on the same sheet/page as the table.

#### MANDATORY SUBMISSION AND COPYRIGHT FORM

The Mandatory Submission and Copyright Form, signed by all authors, must accompany all submitted manuscripts before they can be reviewed for publication. This form can be downloaded from the journals homepage:

<http://ohpd.quintessenz.de>

Electronic submission: scan the signed form and submit as JPG or TIF file.

#### PERMISSIONS & WAIVERS

• Permission of author and publisher must be obtained for the direct use of material (text, photos, drawings) under copyright that does not belong to the author.

• If a patient may be identified from a case report, illustration or papers we ask for a written consent of the patient to allow publication. A consent form can be downloaded from <http://ohpd.quintessenz.de>

• Grant support or any other indirect involvement or commercial interest must be specified.

• For clinical studies the approval of the ethical committee must be presented.

#### REPRINTS

The corresponding author is given 25 free reprints of the article. If additional reprints are desired, they must be ordered from the publisher when the page proofs are reviewed by the authors. The publisher does not stock reprints; however, back issues can be purchased.

---

Oral Health and  
Preventive Dentistry

MANDATORY SUBMISSION FORM

**Title of article:** \_\_\_\_\_

**A signature below certifies compliance with the following statements:**

**Copyright transfer.** In consideration of the acceptance of the above work for publication, I do hereby assign and transfer to Quintessence Publishing Company all rights, title, and interest in and to the copyright in the above-titled work. This assignment applies to all translations of said article as well as to preliminary display/posting of the abstract of the accepted article in electronic form before publication. If any changes in authorship (order, deletions, or additions) occur after the manuscript is submitted, agreement by all authors for such changes must be on file with the Publisher. An author's name may be removed only at his/her request. (Note: material prepared by employees of the US government in the course of their official duties cannot be copyrighted.)

**Author responsibilities.** I attest that:

The manuscript is original work without fabrication, plagiarism, or fraud;

The manuscript is not currently under consideration elsewhere and the research reported will not be submitted for publication elsewhere unless a final decision is made by the Journal that the manuscript is not acceptable;

I have made a significant scientific contribution to the study and I am thoroughly familiar with the primary data outlined in the manuscript;

I have read the complete manuscript and take responsibility for the content and completeness of the final submitted manuscript and understand that if the manuscript, or part of the manuscript, is found to be faulty or fraudulent, I share responsibility.

**Conflict of interest disclosure.** All institutional or corporate affiliations of mine and all funding sources supporting the work are acknowledged. Except as disclosed in the separate enclosed letter, I certify that I have no commercial associations (eg, consultancies, patent-licensing arrangements, equity interests) that might represent a conflict of interest in connection with the submitted manuscript (letter attached).

**Experimental procedures in humans and animals.** The Journal endorses the principles embodied in the Declaration of Helsinki and insists that all investigations involving human beings reported in articles in the Journal be carried out in conformity with these principles and with similar principles such as those of the American Physiological Society, eg, see *J Neurophysiol* 1997;78(6). In the case of animal experiments reported in the Journal, these should also conform to these latter principles or with analogous principles such as those of the Canadian Council on Animal Care or The International Association for the Study of Pain. In articles reporting experiments involving surgical procedures on animals, the type and dosage of anesthetic agent used must be specified in the Materials and Methods section, and evidence must be provided that anesthesia of suitable grade and duration was achieved. Authors reporting on their experimental work in humans, or animals, should also cite evidence in the Materials and Methods section of the article that this work has been approved by, respectively, an institutional clinical/human experimentation panel or an institutional animal care and use panel (or equivalent). The editor-in-chief and associate editors are expected to refuse articles in which there is no clear evidence that these principles have been adhered to, and they reserve the right to judge the appropriateness of the use of human beings and animals in experiments reported in articles submitted to the Journal.

**Signature of each author required in the same order as on the manuscript title page** (Fax signatures, multiple forms are acceptable). For more than 5 authors, use an extra sheet.

Signature (1) \_\_\_\_\_ Print name \_\_\_\_\_ Date \_\_\_\_\_

Signature (2) \_\_\_\_\_ Print name \_\_\_\_\_ Date \_\_\_\_\_

Signature (3) \_\_\_\_\_ Print name \_\_\_\_\_ Date \_\_\_\_\_

Signature (4) \_\_\_\_\_ Print name \_\_\_\_\_ Date \_\_\_\_\_

Signature (5) \_\_\_\_\_ Print name \_\_\_\_\_ Date \_\_\_\_\_

**Corresponding author** \_\_\_\_\_ **Mailing address** \_\_\_\_\_

Phone \_\_\_\_\_

Fax \_\_\_\_\_

E-mail \_\_\_\_\_