

Ação antimicrobiana in vitro de extratos de plantas medicinais na inibição de *Streptococcus mutans*.

In vitro antimicrobial activity of medicinal plant extracts in the inhibition of *Streptococcus mutans*.

Dora Inés Kozusny Andreani¹
Camila Ribeiro Ferlin²
Tabata Hissae Nakao²
Ana Flávia Sanches Borges³
Roberto Andreani Júnior¹

Resumo

Visando futuras matérias primas para diversos produtos/materiais dentários restauradores, o objetivo deste estudo foi avaliar a atividade antimicrobiana in vitro de extratos etanólicos de plantas medicinais contra *Streptococcus mutans*. Foram empregados extratos etanólicos de *Cimbopongum nardus* (Citronela), *Azadirachta indica* A. Juss. (Nim), *Ruta graveolens* L. (Arruda) e *Pterodon pubescens* Benth. (Sucupira). A linhagem bacteriana foi cultivada em meio SB20 sólido, incubada a 37°C por 24 horas em microaerofilia. A atividade antibacteriana foi avaliada pelo método de difusão em ágar em meio sólido para a determinação da menor diluição, capaz de inibir o crescimento bacteriano, Concentração Inibitória Mínima (CIM) e, o número de colônias por placa foi calculado, a fim de determinar qual a menor concentração de cada extrato que apresentou 0,01% de bactérias viáveis, Concentração Mínima Bactericida (CMB). Foram confeccionados sete poços no meio SB20, com 6 mm de diâmetro cada. Nos poços foram colocados volumes crescentes dos extratos. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37°C em microaerofilia, por um período de 24 horas. Verificou-se a presença de atividade antibacteriana através do aparecimento de halos de inibição, mesurados com régua milimetrada. Os extratos etanólicos de *Cimbopongum nardus*, *Azadirachta indica* A. Juss., *Ruta graveolens* L. e *Pterodon pubescens* Benth. apresentaram CIM nas concentrações 25 µl para a primeira e 12,5 µl, para as restantes e, CMB nas concentrações de 50 µl, 12,5 µl, 12,5 µl, 25 µl, respectivamente. A ação antimicrobiana desses extratos sugere a possibilidade da sua utilização como meio alternativo na terapêutica odontológica.

Descritores: *Streptococcus mutans*, plantas medicinais, extratos hidroalcoólicos, ação antimicrobiana.

Abstract

Aiming at future raw materials for various products/dental restorative materials, the objective of this study was to evaluate the in vitro antimicrobial activity of ethanol extracts from medicinal plants against *Streptococcus mutans*. Were used ethanol extracts of *Cimbopongum nardus* (Citronella), *Azadirachta indica* A. Juss. (Nim), *Ruta graveolens* L. (Rue), and *P. pubescens* Benth. (Sucupira). The bacterial strain was grown in solid SB20, incubated at 37 °C for 24 hours in microaerophilic. Antibacterial activity was evaluated by agar diffusion method on solid medium to determine the lowest dilution capable of inhibiting bacterial growth, minimal inhibitory concentration (MIC), and the number of colonies per plate was calculated, in order to determine which was the lowest concentration of each extract presenting 0.01% of viable bacteria, Minimum Bactericidal Concentration (MBC). Seven wells were made through SB20, 6 mm in diameter each. Increasing volumes of the extracts were placed inside the wells. The plates were incubated in a bacteriological incubator at 37 °C in microaerophilic conditions for a 24 hours period. Was verified the presence of antibacterial activity through the appearance of inhibition zones, measured with a millimeter ruler. The ethanol extracts of *Cimbopongum nardus*, *Azadirachta indica* A. Juss., *Ruta graveolens* L., and *P. pubescens* Benth. MIC concentrations were 25 µl for the former and 12.5 µl, to the other, and CMB at concentrations of 50µl, 12.5 µl, 12.5 µl, 25 µl, respectively. The antimicrobial action of these extracts suggests the possibility of its use as an alternative mean on dental therapy.

Descriptors: *Streptococcus mutans*, medicinal plants, hydro alcoholic extracts, antimicrobial activity.

¹ Prof. Dr. da Unicastelo/campus Fernandópolis, SP.

² Discentes do curso de Odontologia da Unicastelo/campus Fernandópolis, SP.

³ Prof.ª de Materiais Dentários da FOB/USP.

Correspondência com o autor: afborges@fob.usp.br

Recebido em: 15/04/11

Aprovado em: 27/04/12

Introdução

A população microbiana sobre e entorno dos dentes é muito complexa; aproximadamente trezentas espécies foram identificadas, no entanto, a bactéria cariogênica mais importante é a espécie *Streptococcus mutans*, um coco Gram-positivo. Algumas outras espécies de *Streptococcus* também são cariogênicas, mas desempenham um papel menor no início do processo cariioso²⁵. A prevalência de *S. mutans* é encontrada tanto em pessoas com moderada ou alta incidência de cárie, assim como nas populações com baixa incidência ou ausência da mesma¹⁷.

A antibioticoterapia tem sido utilizada de forma indiscriminada para o controle de microrganismos, no entanto, o aparecimento de patógenos resistentes aos antibióticos tem se tornado um problema na medicina e na Odontologia, levando a busca de métodos de controle alternativo. A utilização de plantas com atividades terapêuticas é uma das práticas mais antigas empregadas pelo homem para cura das enfermidades²². Recentemente, as plantas medicinais tem sido foco de estudos sobre o potencial farmacológico dos princípios ativos extraídos das mesmas por diferentes métodos^{3,4,9,11,12,19}. A atividade antibacteriana das plantas medicinais pode ser atribuída à redução ou inibição do crescimento, diminuição da capacidade de aderência e da atividade da glicosil transferase¹⁶.

Estudos mostraram que extratos de *Azadirachta indica* A. Juss. (Nim) possuem efeitos inibitórios sobre *Escherichia coli*; *Staphylococcus aureus*, *S. pyogenes* e *Pseudomonas aeruginosa*, mostrando potencial terapêutico e podendo ser utilizado como uma nova fonte de antibiótico¹⁰. Segundo Gonçalves et al. (2005)¹⁴, o extrato hidroalcoólico do fruto de *Pterodon emarginatus* (Sucupira) apresenta atividade antimicrobiana contra *Proteus mirabilis*.

A utilização de chá de folhas de romã (*Punica granatum*) reduziram a aderência de microrganismos da saliva às ligaduras elásticas ortodôntica²¹. Extratos vegetais de *Malva sylvestris*, *Myracrodruon urundeuva* All e *Psidium guajava* Linn. apresentaram potencial de atividade antimicrobiana e antiaderente sobre os microrganismos formadores de biofilme dental, e demonstraram atividade antifúngica sobre cepas de *Cândidas* isoladas da cavidade oral.

Apesar das inúmeras pesquisas envolvendo plantas medicinais terem crescido significativamente, são muitas as espécies vegetais que ainda necessitam de estudos²³. A partir do exposto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro* de extratos hidroalcoólicos de plantas medicinais na inibição de *Streptococcus mutans*.

Material e métodos

Este estudo foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da universidade, tendo sido iniciado

após a aprovação, sob o protocolo (3312332/10).

Obtenção dos extratos vegetais

Foram empregadas folhas das seguintes espécies vegetais: *Cimbopongum nardus* L. Rendle (Citronela), *Azadirachta indica* A. Juss. (Nim) e *Ruta graveolens* L. (Arruda), e sementes *Pterodon emarginatus* Vogel (Sucupira branca). Para obtenção dos extratos foram empregadas as metodologias descritas por Soares et al.²³ (2007). As folhas de cada planta foram lavadas com água destilada e o material foi seco a temperatura ambiente durante 24 horas. O material vegetal foi colocado em estufa com circulação de ar forçado a 33°C por uma semana, sendo posteriormente triturado. De cada planta, utilizou-se 300g para extração hidroalcoólica a 70% de etanol para 30% de água destilada. Após um mês de maceração foi obtido o extrato bruto por filtração. O extrato foi filtrado e levado a uma temperatura de 45°C para evaporação do solvente. No final da quinta semana, o extrato bruto obtido foi colocado em estufa (40°C) para secagem, obtendo-se assim, o extrato bruto de cada planta.

Os extratos brutos de cada planta foram reconstituídos em Tween 20 e água destilada estéril, atingindo uma concentração de 100mg mL⁻¹. Os extratos foram esterilizados por filtração em membrana de acetato de celulose de 0,45µm (Milipore).

Cepas bacterianas e preparação do inóculo

Foram utilizadas seis cepas de *Streptococcus mutans* isoladas de saliva, pertencentes à coleção do Laboratório de Microbiologia da Unicastelo/campus Fernandópolis. As linhagens foram reativadas meio SB20 sólido, incubada a 37°C por 24 horas em condições de microaerofilia.

O preparo dos inóculos para os testes de suscetibilidade foram realizados pelo método de microdiluição seguindo as recomendações do NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2000)¹⁸. Culturas de 24 horas em meio SB20 foram transferidas para meio *Tryptic Soy Broth* (TSB, Oxoid®) e a 37°C por 24 horas em condições de microaerofilia. Posteriormente, suspensões bacterianas foram preparadas em solução fisiológica estéril e ajustadas ao tubo 0,5 da escala de McFarland, ajustando-se a absorvância entre 0,08 a 0,10 a 625nm que corresponde aproximadamente a 1,5 x 10⁸ UFC mL⁻¹. A partir dessa solução, foram realizadas diluições seriadas, resultando uma concentração de 1,5x 10⁶ UFC mL⁻¹.

Avaliação da atividade antimicrobiana

Para determinação da atividade antimicrobiana dos extratos foi empregado o método de difusão em ágar. Placas Petri contendo Mueller-Hinton ágar (MH, Oxoid®) foram inoculadas com 1 mL de uma

cultura *S. mutans* de 24h, ajustada para uma concentração de $1,5 \times 10^6$ UFC mL⁻¹. Foram confeccionados poços de 4 mm de diâmetro, para receber 5µL dos extratos nas concentrações 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,17 e 0,79 mg mL⁻¹. As placas foram deixadas por 30 minutos a temperatura ambiente para permitir a difusão dos extratos no ágar e, em seguida, foram incubados a 37°C por 24h em condições de microaerofilia. Foram considerados ativos, os extratos que produziram zonas de inibição igual ou superior a 10 mm.

A atividade antibacteriana foi avaliada pela medida do diâmetro da zona de inibição do desenvolvimento bacteriano, medidas por meio de régua milimetrada. O experimento foi conduzido em triplicata e a média das zonas de inibição foi determinada.

Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos extratos foi determinada pelo método de dupla diluição descrito por Sahm; Washington²⁰ (1990). Inicialmente, 1 mL do extrato reconstituído (100mg mL⁻¹) foi adicionado em 1 mL de caldo Mueller-Hinton (MH, Oxoid®) estéril. A partir desta diluição inicial, 1 mL foi transferido para um outro contendo 1 mL de caldo MH, as diluições se sucederam até o oitavo tubo e, desta forma, as concentrações resultantes foram de 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,13, 1,57 e 0,79 mg mL⁻¹. Cada tubo foi inoculado com 1 mL do inóculo de *S. mutans* contendo $1,5 \times 10^6$ UFC mL⁻¹, sob agitação. Utilizou-se como controle positivo 1 mL do inóculo + 1mL do meio MH e controle negativo 1mL do extrato + 1mL do meio MH. A seguir, foram incubados a 37°C por 24h em condições de microaerofilia. Todos os tratamentos foram realizados em triplicata. A CIM foi considerada como a menor concentração do extrato capaz de inibir o desenvolvimento bacteriano.

Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM)

A Concentração Mínima Bactericida (CMB) foi determinada após determinação da CIM. Os tubos contendo crescimentos visíveis ou não, foram agitados vigorosamente e, seguidamente, foram retirados 100µL da solução de cada tubo e transferidos para placas de Petri contendo Mueller-Hinton e incubados a 37°C por 24h em condições de microaerofilia. Foi determinado o número de colônias por placa e calculada a CBM, a qual foi definida como a menor concentração do extrato que apresentou 0,01% de bactérias viáveis.

Análise estatística

A Concentração Bactericida Mínima e a Concentração Inibitória Mínima foram comparadas por meio da ANOVA, com correção do teste Bonferroni.

Resultados

Os quatro extratos avaliados foram capazes de eliminar e inibir a cultura *S. mutans*, sem diferença estatística. As concentrações dos extratos hidroalcoólicos das quatro espécies testadas começaram a produzir efeitos antibacterianos a partir das concentrações 6,25 mg mL⁻¹, sendo as concentrações 3,13 mg mL⁻¹ e 1,57 mg mL⁻¹ insuficientes para tal ação. No entanto, foram consideradas ações antibacterianas efetivas aquelas que apresentaram halos de inibição maiores que 10 mm, as menores concentrações para inibir o crescimento bacteriano (CIM), sendo estas 25 mg mL⁻¹ para *Cimbopongum nardus* e 12,5 mg mL⁻¹ para *Azadirachta indica*, *Ruta graveolens* L. e *Pterodon emarginatus*. (Tabelas 1 e 2). A partir da CIM de cada espécie, quanto maior a concentração de cada uma, maior o halo de inibição, sendo para *Cimbopongum nardus*, halos de inibição de 20 e 28 mm para as concentrações 50 e 100 mg mL⁻¹, respectivamente; *Azadirachta indica*, halos de inibição de 16, 22 e 30 mm; *Ruta graveolens* L, halos de inibição de 17, 20 e 35 mm; *Pterodon emarginatus*, halos de inibição de 15, 22 e 28 mm, todas para as concentrações 25, 50 e 100 mg mL⁻¹, respectivamente (Tabelas 1 e 2). As concentrações de 12,5 mg mL⁻¹ para *Cimbopongum nardus*, 6,25 mg mL⁻¹ para *Azadirachta indica*, *Ruta graveolens* L. e *Pterodon emarginatus* foram desconsideradas para efeito antibacteriano.

As concentrações mínimas que produziram efeitos bactericidas (CMB) foram 50 mg mL⁻¹ para *Cimbopongum nardus* e 12,5 mg mL⁻¹ para *Azadirachta indica* e *Ruta graveolens* L. e 25 mg mL⁻¹ para *Pterodon emarginatus*. (Tabela 2).

Discussão

As plantas que apresentam atividades terapêuticas são utilizadas desde a antiguidade e muitas das informações foram obtidas a partir do conhecimento popular². No entanto, trabalhos científicos tem mostrado que extratos de diferentes plantas medicinais podem atuar como antimicrobianos. As plantas medicinais representam uma fonte importante de princípios ativos, utilizados frequentemente na medicina popular e, posteriormente, comprovadas cientificamente, favorecendo o crescimento mundial da fitoterapia¹². As plantas possuem várias vias metabólicas secundárias, denominadas metabólitos secundários, os quais estão relacionados com o mecanismo de defesa da planta, em resposta ao ataque de predadores como bactérias, fungos, vírus, parasitas, insetos entre outros²².

Os extratos utilizados no presente trabalho foram eficientes no controle de cepas de *S. mutans* isoladas da cavidade oral, verificando-se que a inibição do desenvolvimento foi homogênea. De acordo com

o grau de concentração do extrato, houve diminuição proporcional da zona de inibição à medida que a concentração do extrato foi diminuindo (Tabela 1). Em relação à Concentração Inibitória Mínima dos extratos, verificou-se que *Azadirachta indica*, *Ruta graveolens* e *Pterodon emarginatus* apresentaram valores de CIM de 12,5 mg mL⁻¹, enquanto que *Cimbopongum nardus* de 25 mg mL⁻¹.

Segundo Abubakar¹ (2010), uma das formas mais eficientes para avaliar a atividade antimicrobiana de extratos de plantas são os valores da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e da Concentração Bactericida Mínima (CBM), permitindo correlacionar o efeito de extratos de plantas com diversos microrganismos, verificando-se assim, o grau de suscetibilidade destes (Banso;Mann, 2006)⁶. Os valores de CIM e CBM apresentados na Tabela 2 mostram que os valores encontrados para extratos de *Azadirachta indica* e *Ruta graveolens* foram iguais, o que permite afirmar que as plantas avaliadas possuem ação bacteriostática e bactericida sobre *S. mutans*. O extrato de *Cimbopongum nardus* apresentou CIM (25 mg mL⁻¹) menor que o CMB (50 mg mL⁻¹), assim como *Pterodon emarginatus*, que apresentou CIM (12,5 mg mL⁻¹) menor que o CMB (25 mg mL⁻¹), o que pode ser sanado utilizando-se a maior concentração de extrato para estas duas plantas, uma vez que as maiores concentrações foram bactericidas, inviabilizando as colônias em 99,9%.

A atividade antimicrobiana de *Pterodon emarginatus* não é encontrada com frequência, no entanto, Gonçalves et al. (2005)¹⁴ descreveram o efeito de extratos hidroalcoólico de frutos desta planta sobre *Proteus mirabilis*. Já Bustamante et al.⁷ (2010) descrevem eficiência de extratos da casca sobre as

bactérias Gram-positivas *Rhodococcus equi*, *Micrococcus luteus*, *M. roseus* e sobre as Gram-negativas *Serratia marescens* e *Pseudomonas aeruginosa* na concentração de 0,18 mg mL⁻¹, diferindo dos resultados obtidos neste trabalho, onde a CIM foi de 12,5 mg mL⁻¹.

A espécie *Ruta graveolens* L. pode apresentar diversas atividades terapêuticas ou de controle, tais como analgésica, anti-hemorrágica, anti-inflamatória, microbicida, repelente, entre outras¹⁵. Estudos para avaliar a atividade antifúngica de extratos desta planta sobre *Trichophyton mentagrophytes* mostraram falta de eficiência no controle deste dermatofito¹³. No presente trabalho, extratos desta planta apresentaram efeito bactericida sobre *S. mutans* (CIM e CMB de 12,5 mg mL⁻¹).

Um dos problemas usualmente encontrados quanto do uso de plantas medicinais é a quantidade requerida do extrato para induzir à cura efetiva. A quantidade de extratos é desconhecida em muitos casos em relação ao uso tradicional de plantas nativas pela população. No entanto, a utilização não é um problema sério já que produtos extraídos de plantas são relativamente seguros quando comparados com outros antimicrobianos sintéticos¹.

De acordo com os resultados observados, todos os extratos estudados apresentam características promissórias para formulação de materiais dentários capazes de combater as causas primárias da cárie, podendo também ser utilizados na rotina profilática, na forma de colutórios e dentifrícios bucais. No entanto, estudos *in vitro* e *in vivo* devem ser realizados para comprovação da eficácia das novas formulações de materiais e/ou produtos odontológicos.

Tabela 1 - Atividade antibacteriana de extratos hidroalcoólico de *Cimbopongum nardus*, *Azadirachta indica*, *Ruta graveolens* e *Pterodon emarginatus* sobre *Streptococcus mutans*.

Tratamentos	Zona de inibição (mm)						
	Concentração de extratos (mg mL ⁻¹)						
	100	50	25	12,5	6,25	3,13	1,57
<i>Cimbopongum nardus</i>	28	20	12	8	0	0	0
<i>Azadirachta indica</i>	30	22	16	12	8	0	0
<i>Ruta graveolens</i>	25	20	17	14	8	0	0
<i>Pterodon emarginatus</i>	28	22	15	10	7	0	0

Tabela 2 - Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida mínima (CBM) de extratos hidroalcoólico de *Cimbopongum nardus*, *Azadirachta indica*, *Ruta graveolens* e *Pterodon emarginatus* sobre *Streptococcus mutans*.

Tratamentos	Concentração de extratos (mg mL ⁻¹)	
	CIM	CBM
<i>Cimbopongum nardus</i>	25	50
<i>Azadirachta indica</i>	12,5	12,5
<i>Ruta graveolens</i>	12,5	12,5
<i>Pterodon emarginatus</i>	12,5	25

Conclusão

Os resultados deste trabalho demonstram que os extratos hidroalcoólicos de *Cimnopogon nar-dus*, *Azadirachta indica*, *Ruta graveolens* e *Pterodon emarginatus* possuem atividade bacteriostática e bactericida sobre *Streptococcus mutans*.

Referências bibliográficas

1. Abubakar E.M. Antibacterial potential crude leaf extracts of Eucalyptus camaldulensis against some pathogenic bacteria. African J. Plant Sci., v.4, n.6, p.202-209, 2010.
2. Agra M.F., França P.F., Barbosa-Filho J.M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. Rev. Bras. Farmacogn., v. 17, p.114-140, 2007.
3. Akin M., Oguz D., Saracoglu H.T. Antibacterial effects of some plant extracts from Labiate (Lamiaceae) growing naturally around sirnak-Silopi, Turkey. Int. J. Pharm. Appl. Scienc., v.1; n.1, p.44-47, 2010.
4. Alves P.M., Queiroz L.M.G., Pereira J.V., Pereira M.S.V. Atividade antimicrobiana, antiaderente e antifúngica in vitro de plantas medicinais brasileiras sobre microrganismos do biofilme dental e cepas do gênero Candidas. Rev. Soc. Bras. Med. Trop., v.42, n.2, p.222-224, 2009.
5. Babbour E., Abdolhamid Angaji A., Mahdi Angaji S. Antimicrobial effects of four medicinal plants on dental plaque. J. Med. Plant. Res., v.33, n.3, p.132-137.
6. Bansa A., Mann A. Antimicrobial alkaloid fraction from Commiphora africana (A. Rich). J. Pharm. Biores., v.3, n. 2, p.98-102, 2006.
7. Bustamante K.G.L., Lima A.D.F., Soares M.L., Fiuza T.S., Tresvenzol L.M.F., Bara M.T.F. et al. Avaliação da atividade antimicrobiana do extrato etanólico bruto da casca de sucupira branca (Pterodon emarginatus Vogel) – Fabaceae. Rev. Bras. Pl. Med., v.12, n.3, p.341-345, 2010.
8. Dalirsani Z., Aghazadeh M., Adibpour M., Amirchaghmaghi M., Pakfetrat A., Mosannen Mozaffari P. et al. In vitro comparison of an antimicrobial activity of herbal extracts against Sptretococcus mutans with chlorhexidine. J. Appl. Sci., v.11, n. 5, p.878-882, 2011.
9. Deus R.J.A., Alves C.N., Arruda M.S.P. Avaliação do efeito antifúngico do óleo essencial de copaíba (Copaifera multijuga Hayne). Rev. Bras. Pl. Méd., v.13, n.1, p.1-7, 2011).
10. El-Mahmood A.M., Ogbonna O.B., Raji M. The antibacterial activity of Azadirachta indica A. Juss. (neem) seeds extracts against bacterial pathogens associated with eye and ear infections. J. Med. Plants Res., v.3, n.14, p.1414-1421, 2010.
11. Feronatto R., Marchesan E.D., Bednarski F., Ribas T.T.Z., Onofre S.B. Efeitos do óleo essencial produzido por Baccharisdracunculifolia D. C. (Asteraceae) sobre bactérias cariogênicas. Arq. Ciênc. Saúde UnipA.; v.11, n.1, p. 15-18, 2007.
12. Francisco K.S.F. Fitoterapia: uma opção para o tratamento odontológico. Rev. Saúde, v.4, n.1, p.18-24, 2010.
13. Frias D.F.R., Kozusny-Andreani D.I. Avaliação in vitro de extratos de plantas medicinais e óleo de eucalipto sobre Trichophyton mentagrophytes. Rev. Bras. Pl. Med., v.11, n.2, p.216-220, 2009.
14. Gonçalves A.L., Alves Filho A., Menezes H. Estudo comparativo da atividade antimicrobiana de extratos de algumas árvores. Arq. Inst. Biol., v.72; n.3; p.353-358, 2005.
15. Merji J., Abderrabba M., Merji M. Chemical composition of essential oil of Ruta graveolens L.: influence of drying, hidrodistillation duration and plants. Industrial Crops and Products, v.32, p.671-673, 2010.
16. Nalina T., Rahim Z.H.A. The crude aqueous extract of Piper betle L. and its antibacterial effect towards Streptococcus mutans. Am. J. Biochem. & Biotech., v.3, n.1, p.10-15, 2007.
17. Napimoga M.H., Kamiya R.U., Rosa R.T., Hofling J.F., Mattos-Graner R.O., Gonçalves R.B. Genotypic diversity and virulence traits of Streptococcus mutans in caries-free and -caries-active individuals. J. Med. Microbiol., v.53, p.697-703, 2004.
18. NCCLS. National Committee For Clinical Laboratory Standar-

ds. Approved standard M7-A5: Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically. 5.ed, Wayne, PA, 2000.

19. Oliveira C.B., Soares D.G.S., Bomfim I.P.R., Drumond M.R.S., Paulo M.Q., Padilha W.W.N. Avaliação da eficácia da descontaminação de escovas dentárias pelo uso do spray de óleo essencial de Eugenia uniflora l. (Pitanga). Ciênc. Odontol. Brás., v.12, n.2, p.29-34, 2009.
20. Sahn D.F., Washington D.A. Antimicrobial susceptibility test dilution methods. In: Lennette E.H. Manual of Clinical of Microbiology, 5a ed., America-Society for Microbiology Washington D.C., 1105-1106p.
21. Schreiner F., Retzlaff G., Siqueira M.F.R., Rezende E.C., Simão L.C., Kozlowski-Junior V.A. et al. Uso de chá de Punica granatum (romã) no controle da aderência de bactérias orais em ligaduras ortodônticas. Robrac, v.18, n.45, p.56-61, 2009.
22. Silva L.L.S., Lima E.O., Nascimento S.C., Motta D.L., Silva N.H., Almeida E.R. et al. Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos de Dioclea grandiflora Mart. Ex. Benth, Fabaceae. Rev. Bras. Farmacogn., v.20, n.2, p.208-214, 2010.
23. Soares D.G.S., Oliveira C.B., Leal C., Drumond M.R.S., Padilha W.W.N. Atividade in vitro da tintura de aroeira (Schinus terebinthifolius) na descontaminação de escovas dentais contaminadas pelo S.mutans. Pesq. Bras. Odontoped. Clin. Integr., v.7, n.3, p.253-257, 2007.
24. Soares S.P., Vinholis A.H.C., Casemiro L.A., Silva M.L.A., Cunha W.R., Martins C.H.G. Atividade antibacteriana do extrato hidroalcoólico bruto de Stryphnodendron adstringens sobre microrganismos da cárie dental. Rev. Odonto. Ciênc., v.23, n.2, p.141-144, 2008.
25. Tortora G.J., Funke B.R., Case C.L. Microbiologia. Ed. ART-MED, Porto Alegre, RS. 2002. 827p.