



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA CENTRO DE CIÊNCIAS
DA SAÚDE DEPARTAMENTO DE ODONTOLOGIA PROGRAMA DE PÓS-
GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

**ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E ANTIBIOFILME DO ÓLEO
ESSENCIAL DE *COLA NITIDA* E DO ESPILANTOL DE
ACMELLA CILIATA SOBRE *STREPTOCOCCUS MITIS* -
ESTUDO *IN VITRO*.**

ADRIANA RODRIGUEZ RIVA

Florianópolis

2017

ADRIANA RODRIGUEZ RIVA

**ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E ANTIBIOFILME DO ÓLEO
ESSENCIAL DE *COLA NITIDA* E DO ESPILANTOL DE
ACMELLA CILIATA SOBRE *STREPTOCOCCUS MITIS* -
ESTUDO *IN VITRO*.**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Odontologia, área de concentração: Implantodontia.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo de Souza Magini
Co-orientador: Prof. Dr. Julio C.M. Souza

Florianópolis

2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária
da UFSC.

Adriana, Rodriguez Riva
Atividade Antibacteriana e Antibiofilme do Óleo Essencial de *Cola Nitida* e do Espilantol de *Acmella Ciliata* sobre *Streptococcus Mitis*-
Estudo *in vitro*.

Adriana Rodriguez Riva;
Orientador, Ricardo de Souza Magini;
Coorientador, Júlio César Matias de Souza. -
Florianópolis, SC, 2017.
83 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós
Graduação em Odontologia.

Inclui referências

1.Odontologia. 2. Streptococcus mitis. 3. Biofilmes 4.
Implante dentario. 5. Acmella ciliata. 6. Cola nitida
I.Magini de Souza, Ricardo. II. Souza,
Júlio César Matias. III. Universidade Federal de Santa
Catarina. Programa de Pós-Graduação em Odontologia. IV.
Atividade Antibacteriana e Antibiofilme do Óleo Essencial de *Cola Nitida* e
do Espilantol de *Acmella Ciliata* sobre *Streptococcus Mitis*- Estudo *in vitro*.

ADRIANA RODRIGUEZ RIVA

**ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E ANTIBIOFILME DO ÓLEO
ESSENCIAL DE *COLA NITIDA* E DO ESPILANTOL DE
ACMELLA CILIATA SOBRE *STREPTOCOCCUS MITIS*- ESTUDO
IN VITRO.**

Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de Mestre em Odontologia – Área de concentração Implantodontia, e aprovada na sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal de Santa Catarina.

Florianópolis, 26 de Abril 2017

Profa. Dra. Elena Riet Correa Rivero
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Odontologia / UFSC

Banca examinadora:

Prof. Dr. Ricardo Magini de Souza

Profa. Dra. Ariadne Cristiane Cabral da Cruz

Profa. Dra. Maique Biavatti

Profa. Dra. Andrea de Lima Pimenta

A mi hermano Giscard Rodríguez Riva por
haber sido mi mayor ejemplo.

A mi papá Eleazar por tener el corazón noble y ser un padre ejemplar.

A mi mamá María por ser la mujer que más admiro.

A Julián por su amor incondicional.

Todo tiene su tiempo, y todo lo que se quiere debajo del cielo tiene su hora:

Tiempo de nacer
y tiempo de morir,
tiempo de plantar
y tiempo de arrancar lo plantado,

tiempo de matar
y tiempo de curar,
tiempo de destruir
y tiempo de edificar,

tiempo de llorar
y tiempo de reír,
tiempo de hacer duelo
y tiempo de bailar,

tiempo de esparcir piedras
y tiempo de juntarlas,
tiempo de abrazar
y tiempo de abstenerse de abrazar,

tiempo de buscar
y tiempo de perder,
tiempo de guardar
y tiempo de tirar,

tiempo de rasgar
y tiempo de coser,
tiempo de callar
y tiempo de hablar,

tiempo de amar
y tiempo de aborrecer,
tiempo de guerra,
y tiempo de paz.

(Eclesiastés 3-4)

AGRADECIMIENTOS

A meu orientador, Professor Ricardo de Souza Magini, por ter me brindado a oportunidade de estudar no CEPID, obrigado por ser um apoio constante.

A meu co-orientador, o Prof. Júlio Souza, por ter tido paciência comigo e me ensinar sobre Microbiologia.

Aos Professores Cesar Benfatti, Marco Aurélio Bianchini e Antônio Carlos Cardoso por ter me ensinado a questionar sempre o conhecimento. Tomo vocês como o exemplo do que eu desejo me converter algum dia, por serem incríveis pessoas que dedicam seu tempo a compartilhar seus conhecimentos.

A Professora Maique Biavatti agradeço pela parceria e por compartilhar seu valioso tempo me ensinando sobre Farmacognosia.

A Mariane Sordi, por ser a minha professora de Microbiologia e de comida vegetariana brasileira. Muito obrigada 'duplita' teu coração é imenso, sempre disposta a ajudar a quem

precise. Este trabalho não poderia ter sido possível sem teu apoio.

A mi 'roomie' María Elisa Galarraga, por ser una persona súper especial para mí, gracias por estar siempre presente en el día a día del Mestrado, por compartir nuestro cumpleaños y por lograr que la mitad de mi corazón sea ecuatoriano.

A mis padres, que son mi ejemplo de dedicación, trabajo y amor. Por siempre ser la fuerza que me levanta. Los amo.

A Julián Rosselló, por me acompañar en esta aventura y porque vengan más aventuras juntos. Te amo con todo mi corazón

A mis hermanas Pilar y Anita y a mi cuñado Jorge por ser personas ejemplares y convertirme en la tía más feliz del mundo.

A mis sobrinos Gonzalo, Emilia y Catalina por habernos traído tanta felicidad cuando más lo necesitábamos.

A meus melhores amigos Milagros Sueiro, Ximena Rodríguez, Hugo Dalesio e Ila de la Flor, por sempre estar presentes na minha vida sem importar o longe que nos encontremos.

A meus colegas do CEPID que amo com todo mi coração, Karin Apaza, Carol Morsch, Madalena Engler, Javier Salazar, Edwin Ruales, Nicolás Aguilera, Miguel Noronha, Juan Felipe Dumes, Patrícia Pauletto, Gabriella Peñarrieta, Renata Brum e

Gabriel Magrin.

A minha banca por estar presente em um momento muito importante de mi vida pessoal e profissional, obrigada por estar presente.

Por ter se convertido em minha família no Brasil.

Agradeço a Universidade Federal de Santa Catarina por ter recebido nesta Instituição por a qual tenho um carinho enorme, por ter sido onde conheci a minha família brasileira e onde aprendi a ser uma melhor pessoa e profissional.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Estádios da formação do biofilme em superfícies orais, adaptado de <http://biology.binghamton.edu/davies/images/biofilm.jpg> 35
- Figura 2 - Esquema sobre a Classificação de *Streptococcus mitis*, Grupos Filogenéticos adaptado de Ferrándiz et al. 2011 36
- Figura 3. *Acmella ciliata*. Voucher depositado no Herbarium do Jardim Botânico (Rio de Janeiro/RJ, Brazil) do material vegetal utilizado no presente estudo 41
- Figura 4. Esquema descrevendo a estrutura química do Espilantol (C₁₄H₂₃NO, 221.339 g/mol)(BARBOSA et al., 2016a) 42
- Figura 5. Voucher do Herbário onde mostra material vegetal de *Cola nitida*. 44
- Figuras do artigo:
- Figure 1. Cellular pellet obtained through centrifugation at 5000 rpm, 4°C and 8000 g for 10 min 49
- Figure 2. 96-well plate distribution for MIC assay, different shades of blue shows different concentrations (5000 to 0,0001 µg/mL) tested of Spilanthol, green for different concentrations (5000 to 0,0001 µg/mL) of *Cola nitida* EO, red for chlorhexidine, yellow for positive control (BHI medium with *s.mitis*) and purple for negative control (BHI liquid medium) 51
- Figure 3. 20-well plate distribution for testing the effect of Essential Oils (*Cola nitida* and Spilanthol from *Acmella ciliata*) at minimum inhibitory concentration (87,5 µg/mL) on stablished biofilms of *Streptococcus mitis*. Single specie biofilms were cultivated in Brain Heart Infusion liquid medium on top of titanium discs medium for 24 h in 96-well plate and treated with Eos 51
- Figure 4. Spilanthol from *Acmella ciliata* Minimum inhibitory concentration (MIC), concentrations tested ranging from 5000 to 0,0001 µg/mL. (a)Percentage of inhibition for Planktonic growth (b)for biofilm growth. *Streptococcus mitis* was grown in brain heart infusion liquid medium

overnight in 96-well plate and treated with different concentrations of Eos..
..... 55

Figure 5. *Cola nitida* Minimum inhibitory concentration (MIC), concentrations tested ranging from 5000 to 0,0001 µg/mL. (a) Percentage of inhibition for Planktonic growth (b)for biofilm growth. *Streptococcus mitis* was grown in Brain heart infusion liquid medium overnight in 96-well plate and treated with different concentrations of Eos..... 56

Figure 6. (a) Effect of Essential Oils (*Cola nitida* and Spilanhol from *Acmella ciliata*) at minimum inhibitory concentration (87,5 µg/mL) on established biofilms of *Streptococcus mitis*. Single specie biofilms were cultivated in brain heart infusion liquid medium on top of titanium discs medium for 24 h in 96-well plate and treated with EOs. The values of absorbance are mean SEM of three independent assays. The data were statistically analyzed by the Student's *t*-test (**p*<0,05). (b) Inhibition percentage compared to positive control 57

Figure 7. (a) Effect of Essential Oils (*Cola nitida* and Spilanhol from *Acmella ciliata*) at minimum inhibitory concentration (87,5 µg/mL) on planktonic *Streptococcus mitis*. Planktonic bacteria were cultivated in Brain Heart Infusion liquid medium for 24 h in 96-well plate and treated with EOs. The values of absorbance are mean SEM of three independent assays. The data were statistically analyzed by the Student's *t*-test (**p*<0,05) (b). Inhibition percentage compared to positive control. 58

Figure 8. SEM images of titanium disc surfaces after being exposed to tested substances. right Spilanhol (2000x), left *Cola nitida* EO(2000x)..... 59

LISTA DE TABELAS

Tabelas no artigo

Table 1. p values of Student's t-test.....	59
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

OE- Óleo Essencial

CEPID- Centro de Ensino e Pesquisa em Implantes Dentários

MEV- Microscópio Eletrônico de Varredura

CMI – Concentração Mínima de Inibição

BHI – Meio Brain Heart Infusion

MPE - Matriz polimérica extracelular

® - Registrado com direitos utoraís

Artigo em Ingles

EO – Essential Oil

CEPID - Center for Research on Dental Implants

SEM- Scanning Electron Microscopy

MIC- Minimum Inhibitory Concentration

BHI- Brain Heart Infusion Medium

PCR- Polymerase Chain Reaction

UFSC- Federal University of Santa Catarina

SUMÁRIO

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO.....	25
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	29
2.1 Histórico da Microbiologia na Peri-implantite	29
2.2 Biofilmes orais.....	33
2.2.1 <i>Streptococcus mitis</i>	35
2.3. Uso terapêutico de óleos essenciais em Odontologia	37
2.3.1 Spilanthol de <i>Acmella ciliata</i>	40
2.3.2 Óleo essencial de <i>Cola nitida</i>	44

CAPÍTULO II

ARTIGO – ENGLISH VERSION	47
--------------------------------	----

CAPÍTULO III

REFERÊNCIAS	60
-------------------	----

RESUMO

Streptococcus mitis é um microrganismo frequentemente encontrado na cavidade oral, sendo um colonizador primário. Os óleos essenciais (OE) são substâncias de plantas aromáticas conhecidos por suas propriedades antimicrobianas. A busca por novas substâncias que sejam capazes de inibir a formação de biofilmes orais pode levar a importantes alternativas de tratamento. O OE de *Cola nitida* e a alcamida espilantol foram testados *in vitro* para verificar a capacidade de inibição de biofilme formado por *S. mitis* NCIMB 13770, sobre superfícies de discos de titânio. A clorexidina foi usada como controle positivo. Os biofilmes bacterianos foram quantificados mediante o uso de coloração cristal violeta e analisados por o espectrofotômetro a 570 nm. A análise estatística dos resultados foi realizada pelo teste de *t*-Student, considerando $p < 0,05$ como significância estatística. A Concentração Mínima de Inibição (CMI) foi analisada testando concentrações de 5000 a 0,0001 µg/mL. A CMI foi estabelecida em 87,5 µg/mL para ambas as substâncias testadas. O espilantol demonstrou inibição do biofilme O OE de *Cola nitida* não inibiu nem o crescimento planctônico nem o biofilme. Estes resultados não foram estatisticamente significativos. A Clorexidina demonstrou uma inibição de 50,8% para o biofilme e 49,2% para o planctônico, sendo estatisticamente significativo. Estes achados sugerem que o espilantol demonstrou atividade antibacteriana e anti-biofilme baixa e *Cola nitida* não mostrou atividade antibacteriana nem anti-biofilme.

Keywords: *Streptococcus mitis*; biofilmes; implante dentário; titânio, *Acmella ciliata*; *Cola nitida*.

ABSTRACT

S. mitis is a frequent organism in the oral cavity and a primary colonizer. Essential oils (EO) are naturally occurring compounds in aromatic plants, they are known to possess antimicrobial properties. Exploring novel substances to inhibit biofilm formation can lead to important alternative treatment measures. One EO (*Cola nitida*) and Spilanthol were tested *in vitro* against *S. mitis* NCIMB 13770 biofilm using chlorhexidine as a control group on surface of titanium discs. The bacterial biofilms were quantified by crystal violet staining and analyzed with a Spectrophotometer at 570 nm. The statistical analysis of the results was accomplished using the *t*- Student test, considering $p < 0,05$ statistically significant. Minimum Inhibitory Concentration (MIC) assay with concentrations ranging from 5000 to 0.0001 $\mu\text{g/mL}$. The MIC was estimated as 87.5 $\mu\text{g/mL}$ for the substances tested. The results were not significantly different from the control for spilanthol. The EO of *Cola nitida* did not inhibit the growth of planktonic bacteria or biofilm. Chlorhexidine showed inhibition of 50,8% for biofilm and 49,2% for planktonic bacteria. These findings suggest that spilanthol displays a low antibacterial and antibiofilm activity and *Cola nitida* did not showed antibacterial or antibiofilm activity.

Keywords: *Streptococcus mitis*; biofilms; dental implants; titanium; *Acmella ciliata*; *Cola nitida*.

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos 40 anos, os implantes dentais têm sido utilizados com êxito como uma alternativa de tratamento para o edentulismo. O número de pacientes sendo tratados com implantes tem aumentado e tem se reportado algumas patologias, tais como a mucosite, onde existe uma inflamação dos tecidos ao redor do implante, e pode levar a uma peri-implantite (PI) onde existe uma destruição dos tecidos duros e moles ao redor do implante. A microbiota que se apresenta nestas doenças é muito similar aquela encontrada na periodontite. As doenças peri-implantares tem sido relacionadas à presença de bactérias Gram - anaeróbicas ausentes nos sítios saudáveis (KOYANAGI et al., 2010). Pacientes com periodontite que recebem implantes tem maior risco de PI já que pode ter uma transmissão de bactérias de dentes a implantes (AOKI et al., 2012).

As bactérias presentes na cavidade oral são muito diversas e se organizam em biofilmes, comunidades que crescem em cima de uma superfície e se rodeiam de matriz extracelular com função protetiva e estrutural (DAVEY, M. E. E O'TOOLE, 2000). Mais de 100 espécies têm sido reportadas mediante a análise por reação em cadeia da polimerase (PCR). Sítios com PI apresentam biofilmes mais complexos

comparados com sítios saudáveis e com periodontite (KOYANAGI et al., 2010).

O gênero *Streptococcus* é formado por um grupo de bactérias que podem causar infecções graves que causam morbidade e mortalidade em humanos (JOHNSBORG et al., 2008). *Streptococcus mitis* é uma bactéria comumente encontrada na cavidade oral e nas vias aéreas, em níveis maiores no biofilme dental e menores na saliva (LI et al., 2004). É classificada como colonizador primário, já que tem a função de colonizar as superfícies orais e ser o ponto de partida para outras espécies formarem o biofilme. Porém, pouca informação se encontra disponível sobre a sua função na PI.

O tratamento da PI inclui a descontaminação da área e em muitos casos os pacientes podem ser tratados com antibioticoterapia. É conhecido que os antibióticos têm um efeito mínimo a longo prazo na prevenção de biofilmes já estabelecidos. A grande maioria dos antibióticos tem sido projetada para ter como alvo células bacterianas planctônicas metabolicamente ativas, sendo as células bacterianas embebidas em matriz polimérica extracelular (MPE) não alcançadas ou resistentes por os antimicrobianos (HALL-STOODLEY; COSTERTON; STOODLEY, 2004). As bactérias quando organizadas em biofilmes são capazes de sobreviver a tratamentos com concentrações até 1000 vezes

maiores do que as utilizadas para matar a mesma espécie bacteriana quando em estado plantônico (Newman 1999). É de extrema importância encontrar novas alternativas de tratamento que levem a introdução de novas e efetivas estratégias para o controle dos biofilmes.

Óleos essenciais (OE) são substâncias produzidas por diferentes espécies de plantas aromáticas. Podem ser extraídos por diferentes métodos, mas é a destilação o método mais usado comercialmente. A composição dos OEs varia dependendo das condições de crescimento da planta (temperatura, composição do solo e estação do ano) Mesmo duas plantas da mesma espécie submetidas a diferentes condições, produzem OEs com diferentes composições (BENABDELKADER et al., 2011).

Estudos relacionados com a indústria alimentícia demonstram que os OEs apresentam propriedades antibacterianas e são de uso rotineiro. Estima-se que dos cerca de 3000 OEs conhecidos, 300 são comercialmente importantes e destinados principalmente aos mercados de sabores e fragrâncias. (BURT, 2004)

Espilantol é derivado de uma planta chamada comumente Jambú que é utilizada como anestésico para dor de dente (BARBOSA et al., 2016b; NASCIMENTO et al., 2013; SILVEIRA et al., 2016).

O objetivo deste estudo foi testar as propriedades anti-biofilme de um OE derivado do extrato de *Cola nitida* e um componente isolado do OE de *Acmella ciliata* sobre o biofilme de *Streptococcus mitis in vitro* formado sobre a superfície de discos de titânio.

A hipótese testada é que devido a sua natureza como OE exista um efeito inibitório sobre o biofilme mono espécie de *S. mitis*, um colonizador primário, poderia levar a uma interrupção da formação do biofilme oral.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 HISTÓRICO DA MICROBIOLOGIA NA PERI- IMPLANTITE

A curiosidade do ser humano é uma fonte para os grandes descobrimentos. Assim foi com Antoni van Leeuwenhoek, o inventor do microscópio, que descreveu em 1676 pela primeira vez as bactérias (BARDELL, 1983) em uma carta enviada a la Royal Society of London, através de suas observações pelo microscópio da placa bacteriana removida dos seus próprios dentes. O prêmio Nobel de 1882, conferido a Robert Koch, relacionou a presença de bactérias com doenças transmissíveis estabelecendo a etiologia da infecção (ROBERT KOCH, 1890).

Bactérias são responsáveis por muitas doenças que põem em risco nossas vidas, sendo causadores de doenças como a pneumonia (*Streptococcus pneumoniae*), salmonelose (*Salmonella typhi*), gripe (*Haemophilus influenzae*), Cólera (*Vibrio cholerae*) entre muitas outras. Apesar das medidas modernas para controlar as infecções relacionadas com bactérias (diagnóstico, tratamento (antibióticos) e vacinas) estas ainda são problemas de grande magnitude para a saúde pública.

Alexander Flemming descobriu a penicilina em 1928 e devido a esta descoberta foi premiado com o premio Nobel da Medicina em 1945, salvando milhões de vidas a nível mundial. O que foi observado anos depois foi que muitas bactérias que podiam ser controladas com antibióticos converteram se em resistentes. A OMS publicou um relatorio em 2014 alertando sobre os riscos da resistência antimicrobiana, quanto a redução da susceptibilidade à penicilina detectada para a *S. pneumoniae* excedia os 50% (WHO, 2014). Este é o caso de muitos antibióticos, convertendo a resistência aos antimicrobianos tradicionais em um problema de saúde publica mundial. Microrganismos patógenos como bactérias podem ter mudanças genéticas rápidas, levando ao aparecimento de novas propriedades fenotípicas permitindo obter vantagem das oportunidades ambientais e do hóspede (MORENS; FAUCI, 2013).

O corpo humano tem a capacidade de rejeitar materiais que não são próprios do organismo. Em 1969, o médico ortopedista Per-Ingvar Branemark, que fazia experimentos em coelhos, descobriu que o titânio não provocava esta rejeição e que possuía a propriedade de unir-se ao osso. Brånemark 1983 denominou este fenômeno de osseointegração. Assim, com o descobrimento da osseointegração, foram desenvolvidas

próteses intraósseas de titânio que poderiam também ser utilizadas na cavidade oral. Em 1986, publicou-se um artigo onde um paciente edêntulo total com defeitos maxilares congênitos foi reabilitado com êxito com o uso de implantes osseointegrados, os quais forneceram ancoragem adequada e promoveram estabilidade protética (STEPHEN M. PAREL, P.I. BRANEMARK, 1986).

Nos anos 80, começou-se a utilizar os implantes dentários na prática odontológica. Assim, começaram a aparecer casos de falhas em implantes osseointegrados por infecções ao redor dos mesmos, o que gerou interesse sobre quais bactérias poderiam estar ocasionando esta infecção. Pesquisas iniciaram-se então neste sentido, como o estudo de Mombelli e colaboradores, em 1987, onde foram avaliados pacientes com implantes com boa saúde peri-implantar e foram comparados com pacientes com sinais clínicos (dor, profundidade de sondagem maior que 6 mm e/ou supuração) e radiográficos (perda óssea alveolar) de peri-implantite. Foram coletadas amostras com pontas de cones de papel absorvente do sulco peri-implantar de 4 pacientes edêntulos totais com implantes carregados com *o rings* e sobredentaduras. No grupo da PI, observou-se grande quantidade de microrganismos Gram-negativos anaeróbicos, particularmente fusobactérias, espiroquetas e organismos

pigmentados de preto, como *Prevotella intermedia*. Os resultados deste estudo indicam que a perimplantite (PI) pode àqueles encontrados em doenças periodontais (MOMBELLI et al., 1987), cárie dental e PI. Koyanagi e colegas usaram a biblioteca de clones 16s RNA para comparar mediante análises de PCR as bactérias encontradas em pacientes com PI, periodontites e pacientes saudáveis, encontrando um total de 112 espécies bacterianas diferentes (KOYANAGI et al., 2010). Uma das maiores dificuldades no tratamento de infecções orais é a sua natureza poli-microbiana, onde é difícil estabelecer as principais bactérias envolvidas é de interesse trabalhar na prevenção da formação do biofilme.

Óleos essenciais são misturas complexas de substâncias líquidas, voláteis, lipofílicas e geralmente odoríferas, extraídos de plantas. A grande maioria são classificados como fenolpropanóides ou como terpenos (OLIVEIRA C, SCHENKEL E, GOSMANN G, PALAZZO J, MENTZ L, 1999). Pesquisas *in vitro* e *in vivo* tem mostrado o potencial dos OE contidos em colutórios orais no controle das doenças relacionadas com biofilme oral e sua efetividade na eliminação de bactérias por meio da ruptura da parede celular e inibição da atividade enzimática (ALLAKER; DOUGLAS, 2009;

FILOCHE; SOMA; SISSONS, 2005; FINE et al., 2000; FINE; FURGANG; BARNETT, 2001; SLIEPEN et al., 2010; VAN LEEUWEN; SLOT; VAN DER WEIJDEN, 2014). O colutório comercialmente disponível é uma mistura de 4 terpenos: eucaliptol, mentol, timol e salicilato de metilo.

Pesquisas recentes (MOHAMMADI; ROHLOFF, 2016; MURATA et al., 2010a; SAVIUC et al., 2015) tem se focado não na eliminação das bactérias (efeito bactericida) mas no uso de substâncias químicas que interrompam e perturbem a aderência bacteriana (KOO et al., 2003), sínteses de exopolímeros e a formação de biofilme (MURATA et al., 2010a). Estas substâncias podem ser chamadas de antibiofilmes.

2.2 BIOFILMES ORAIS

A cavidade oral se encontra exposta constantemente a uma variedade de micro-organismos que interagem entre si e com as células que compõem os tecidos moles e duros. Muitas pesquisas têm mostrado que as bactérias do gênero *Streptococcus* são os colonizadores primários do biofilme sobre o esmalte, em particular *Streptococcus mitis*, sendo esta bactéria uma espécie predominante na

saliva e superfícies teciduais (mucosa bucal, vestíbulo anterior, palato duro e lábios superior e inferior) (MARSH, 2006).

Biofilmes são sistemas estruturalmente complexos e dinâmicos que tem atributos primordiais de organismos multicelulares e um ecossistema multifacetado. A formação de biofilmes representa um modo de proteção que permite que as células sobrevivam em ambientes hostis e também dispersem-se e colonizem novos sítios (HALL-STOODLEY; COSTERTON; STOODLEY, 2004).

De acordo com Lemon et al., em 2008, a formação do biofilme se dá em 3 fases, dependendo das espécies envolvidas, conforme resumo na Figura 1.

As propriedades dos materiais, como a superfície do implante dentário (titânio), influenciam a adesão bacteriana inicial. Os colonizadores primários criam um ambiente propício para a chegada dos colonizadores tardios (SUBRAMANI et al., 2009).

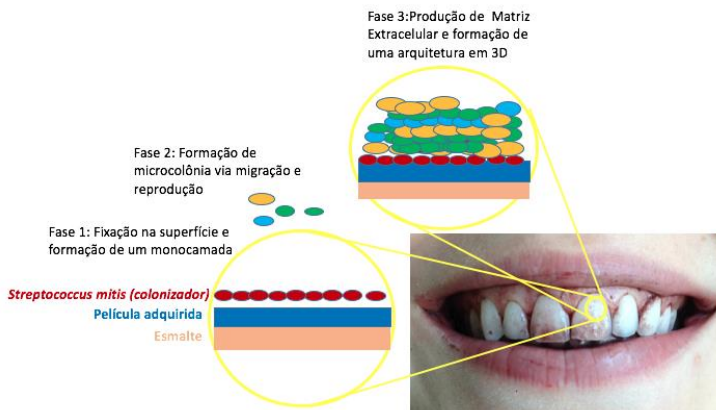


Figura 1. Estádios da formação do biofilme em superfícies orais, adaptado de <http://biology.binghamton.edu/davies/images/biofilm.jpg>

2.2.1 *STREPTOCOCCUS MITIS*

Streptococcus mitis atua como uma interface entre a superfície do implante, os microrganismos responsáveis formam uma película estes incluem *Streptococcus mitis*, *Streptococcus sanguinis* e *Streptococcus oralis*, estas bactérias criam as pré-condições para a adesão de outros patógenos periodontais (HEUER et al., 2007), e são chamadas de bactérias colonizadoras primárias. *S. mitis* é comumente encontrado em áreas afetadas ao redor de implantes dentais. Porém, pouca informação se encontra disponível sobre sua função na PI.

Os grupos de bactérias classificadas como Viridans *Streptococci* podem ser agrupadas em 5 grupos (Figura 2), no qual encontramos o Grupo Filogenético *mitis* onde figura o *Streptococcus mitis*. Esta bactéria encontra-se presente na cavidade oral e nas vias aéreas muito relacionada ao *Streptococcus oralis*, e ambas têm a capacidade de absorver DNA exógeno e incorporá-lo em seus genomas por recombinação homóloga. O mecanismo descrito permite ao *S.mitis* ter acesso a uma série de genes que fazem significativamente maior seu próprio genoma, conseguindo suportar mudanças em seu meio externo tais como tratamentos com antibióticos (JOHNSBORG et al., 2008).

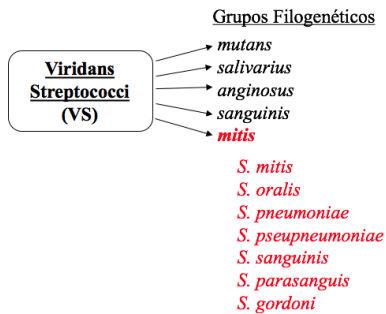


Figura 2. Esquema sobre a Classificação de *Streptococcus mitis*, e Grupos Filogenéticos, adaptado de Ferrándiz et al. 2011

2.3. USO TERAPÊUTICO DE ÓLEOS ESSENCIAIS E SEU USO EM ODONTOLOGIA

O uso de óleos de canela, cravo e cássia por os antigos egípcios nos processos de mumificação de seus mortos se encontra muito bem documentado. E assim que a literatura faz referências de como os romanos e gregos utilizavam este tipo de óleos para propósitos medicinais e estéticos (BULLERMAN; LIEU; SEIER, 1977).

A composição dos OE de um tipo de espécie particular pode diferir dependendo da época da coleta, da região geográfica e da parte da planta de onde foi coletada (LIS-BALCNIN et al., 1999). Num estudo feito por Appel & Cocroft, em 2014, folhas de *Arabidopsis thaliana* foram expostas a gravações de sons e vibrações produzidos por seu predador, a lagarta *Pieris rapae*, os pesquisadores analisaram as substâncias liberadas pela planta em reação aos estímulos. As substâncias liberadas: Glucosinolatos e antocianinas são tóxicas para o predador e foram liberadas pela planta como meio de defesa.

Os OE têm sido descritos por suas características antibacterianas (BURT, 2004; DAVIES, 2003; GIBBONS, 2004; LATEEF et al., 2015; MACHADO et al., 2003; TAKARADA et al., 2004). As bactérias Gram-negativas demonstram maior resistência ao serem expostas a OE que as Gram-positivas (RINCÓN MEJÍA et al., 2015), isto pode estar relacionado à presença da membrana externa rica em moléculas de lipopolissacarídeos, que atuam como uma barreira com permeabilidade seletiva contra agentes tóxicos. Macro-moléculas hidrofóbicas como os componentes dos OEs tem dificuldade para penetrar as membranas bacterianas.

O OE mais utilizado na Odontologia é denominado de eugenol, é um óleo de cor amarela pálida, extraído da espécie vegetal *Syzygium caryophyllatum*. Encontra-se presente em concentrações de 80-90% no óleo de broto de cravo e de 82-88% no óleo das folhas. Os altos níveis de eugenol contidos nos óleo essencial são os responsáveis pela sua atividade antimicrobiana (BHUIYAN N, BEGUM J, NANDI N, 2010). O uso mais comum é como selador endodôntico em combinação com Óxido de Zinco, (Óxido de Zinco-Eugenol (OZE)).

Estudos (ALLAKER; DOUGLAS, 2009; FILOCHE; SOMA; SISSONS, 2005; FINE, 2010; FINE et al., 2000; FINE; FURGANG; BARNETT, 2001; HOFER et al., 2011; PIZZO et al., 2008; SLIEPEN et

al., 2010; STOEKEN; PARASKEVAS; VAN DER WEIJDEN, 2007; VAN LEEUWEN; SLOT; VAN DER WEIJDEN, 2014; VON FRAUNHOFER et al., 2006) realizados mostram a efetividade dos colutórios contendo OEs comercialmente disponíveis, tais como por exemplo óleos da árvore de chá, lavanda, tomilho, hortelã e eugenol (FINE et al., 2000).

Pizzo et al., em 2008, realizaram um estudo comparando o efeito de inibição da placa bacteriana de um colutório com fluoreto de amina e fluoreto de estanho com outro à base de OE. Os resultados mostraram que não houve diferença estatisticamente significativa na eficácia de ambos. Quintas et al., em 2014, na sua pesquisa, avaliou a atividade antibacteriana *in situ* de um colutório com OE (Listerine) no biofilme oral depois de 7h da sua aplicação. Os pacientes utilizaram aparelhos projetados para conter sete discos de vidro nas margens vestibulares dos dentes inferiores, permitindo o desenvolvimento do biofilme. Quinze voluntários sadios usaram os aparelhos por 48h e depois utilizaram o colutório com OEs. Os discos foram removidos depois de 30s e 1, 3, 5 e 7h. Após 30s o efeito antibacteriano foi de 1,18% de inibição, depois de 7h foi de 47,68%. Tendo este colutório capacidade de penetração *in situ* e substantividade por 7h. Estes

resultados foram melhores que os observados com clorexidina 0,2% nas mesmas condições.

2.3.1 ESPILANTOL DE *ACMELLA CILIATA*

Acmella ciliata (H.B.K.) Cassini (basionym: *Sphilantes ciliata* Kunt Asteraceae) é uma erva nativa das regiões tropicais da América do Sul (JANSEN, 1985) (Figura 3). Chamada comumente como jambú no Brasil, é utilizada como tempero e na medicina tradicional para o tratamento de dores de dente e seu principio ativo principal é o espilantol (SILVEIRA et al., 2016). Tem sido achado em espécies vegetais como *Acmella ciliata* (MARTIN; BECKER, 1985; MEJÍA; CASTAÑO; VÁZQUEZ, 2012), *Acmella oleracea* (BARBOSA et al., 2016a; CASTRO et al., 2014; MARTIN; BECKER, 1985; SIMAS et al., 2013) e *Heliopsis longipes* (BARBOSA et al., 2016a; MOLINATORRES et al., 1996). Spilanthol também é conhecido como affinin na literatura (BARBOSA et al., 2016a; BOONEN et al., 2010a, 2010b).



Figura 3. *Acmella ciliata*. Voucher do material vegetal utilizado no presente estudo depositado no Herbário do Jardim Botânico (Rio de Janeiro/RJ, Brasil)

Propriedades antiinflamatórias e antibacterianas do Espilantol

Wu et al., em 2008, demonstraram que o espilantol diminuía os níveis de LPS-induzida por meio da síntese de óxido nítrico (iNOS) e ciclo-oxigenase (COX-2) e a expressão das proteínas em mRNA, inibindo a produção de mediadores pró-inflamatórios à nível transcripcional e de translacionais. Os resultados deste estudo sugerem que o espilantol, isolado de *Spilanthes acmella*, pode ser útil em inibir

estes mediadores e tem potencial aplicável como uma droga anti-inflamatória não esteroidal (AINES).

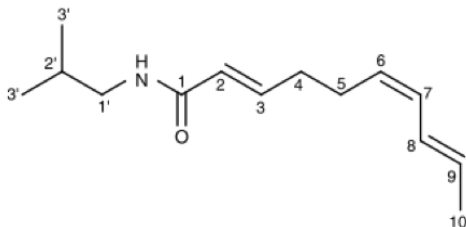


Figura 4. Esquema descrevendo a estrutura química do espilantol (C₁₄H₂₃NO, 221.339 g/mol) Barbosa, De Carvalho, et al. 2016.

O Espilantol (Figura 4) tem mostrado atividades anti-inflamatórias (BARBOSA et al., 2016a; WU et al., 2008), antifúngicas (MOLINA-TORRES et al., 2004), antimalárica bem como efeito larvicida (DEHARO et al., 2001) e (BOONEN et al., 2010b) aumento da permeabilidade da mucosa bucal e da pele (DE SPIEGELEER et al., 2013).

Mejía et al., em 2012, avaliaram a atividade antimicrobiana do OE de *Acmella ciliata* contra *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella ozaenae*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermis* e *Candida albicans* do extrato das flores e folhas de *Acmella ciliata*

através do teste de Difusão de Disco. As bactérias Gram-negativas mostraram-se mais resistentes, *E.coli* demonstrou um halo de inibição de 11 mm contra *K. ozanae* e 11,5mm e 8mm para *P. mirabilis*. O extrato inibiu o crescimento de *S. aureus* e *S. epidermis* a concentrações de 25 e 15 mg/mL. *C. albicans* foi inibida a 25mg/mL.

Citotoxicidade do Espilantol

O estudo recente de Gerbino et al., em 2016, testou o extrato metanólico de *Acmella oleracea* e espilantol isolado *in vitro*, em células coletadas dos rins de rato (células HEK293). Em relação a citotoxicidade, os valores da IC50 em 24h foram de 234 µg/mL para o extrato metanólico e de 260 µg/mL para o espilantol.

Wu et al., em 2008 avaliaram o efeito dos extratos de hexano, clorofórmio, etil acetato e butanol de *Acmella oleracea in vitro* em macrófagos RAW 264.7 mediante o teste de MTT. Após 24h de incubação, os extratos de hexano e cloroformo (80µg/mL) reduziram a viabilidade celular em 75 e 81%, respetivamente. Os extratos de etil acetato e butanol não alteraram significativamente a viabilidade celular (91 e 93% respetivamente).

Soares et al., em 2014, avaliou os efeitos do extrato hidroetanólico de *A. olarecea* em células tumorais HEP-2 e células L929 (fibroblastos subcutâneos do tecido conjuntivo) *in vitro*. A citotoxicidade foi determinada por o teste MTT, O IC50 do extrato foi de 513mg/mL, mostrando uma alta citotoxicidade.

2.3.2 ÓLEO ESSENCIAL DE *COLA NITIDA*



Figura 5. Voucher do Herbário onde as amostras de *Cola nitida* foram adquiridas

A *Cola nitida* (Figura 5) é uma árvore que produz uma noz que contém cafeína. A noz é mastigada em muitos países da África, já que alivia a fome. Se tem reportado a propriedade etnomedicinal dessa planta. Sendo a mesma utilizada para o tratamento da tosse e do asma. Ela contém cafeína, óleos essenciais, componentes fenólicos e alcalóides (LATEEF et al., 2015).

Atividade antibacteriana da *Cola Nitida*

Lateef et al., em 2015 avaliaram a atividade do extrato da casca da *Cola nitida*, sintetizados com nano-partículas de prata contra *E.coli* e *P. aureginosa*. Obtendo uma Concentração Mínima de Inibição (CMI) de 50µg/mL para *E.coli* e 120µg/mL para *P. aeruginosa*.

Dah-Nouvlessounon et al., em 2015, em um estudo conduzido para a indústria alimentar, avaliou o efeito do extrato etanólico e etil acetato de *Cola nitida*. A atividade antibacteriana foi testada contra 28 de bactérias da estirpe *Staphylococcus* com o teste de Difusão de Disco. As bactérias foram isoladas de amostras de carne. O CMI foi de 0,312mg/mL até 5000mg/mL.

Indabawa Arzai et al., em 2011, testaram a atividade antibacteriana do extrato da semente de *Cola nitida* (metanólico e aquoso) contra *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *S.typhi* e *E. coli* mediante o método de Difusão do Disco. O extrato metanólico demonstrou uma melhor atividade contra *S. aureus* em concentrações de 2000 até 2500µg/mL, o extrato aquoso não demonstrou atividade contra *E. coli* e sim para as bactérias *S. aureus* e *K. pneumoniae* em concentrações entre 2000 até 2500µg/mL.

5.2 Citotoxicidade da *Cola Nitida*

Dah-Nouvlessounon et al., em 2015, avaliaram a citotoxicidade usando o teste da larva *Artemia salina* onde a dose letal foi de 1.04mg/mL.

Ojo et al., em 2010, estudou os efeitos micro anatômicos do extrato etanólico de *Cola nitida* no estomago de ratos Wistar. O resultado mostrou que a administração 600 mg/kg é capaz de causar lesões gástricas em ratos.

ARTICLE – ENGLISH VERSION– ARTICLE FORMATED FOR
BIOFOULING JOURNAL

***In Vitro* Study of the Anti-Biofilm Activity of the Essential Oil of
Cola Nitida and Spilanthol from *Acmella Ciliata* Against
*Streptococcus Mitis***

**Rodriguez Riva, Adriana[∞]; Souza C.M., Julio[∞]; Silveira Narjara*;
Frankenberger, Larissa*; Biavatti, Maique*; Magini, Ricardo[∞]**

[∞]Center of Teaching and Research in Dental Implants (CEPID), UFSC, Florianópolis,
Brazil

*Pharmaceutical Sciences Department, Center of Health Sciences, UFSC, Florianópolis, Brazil

Corresponding author details:

Adriana Rodriguez Riva, DDS

Center of Education and Research on Dental Implants (CEPID),

63 (ODT), Federal University of Santa Catarina (UFSC)

Post- Graduation Program in Dentistry (PPGO), Department of Dentistry

Campus Trindade, s/n, Trindade, Florianópolis, Santa Catarina,

Zip code: 88040-900

Tel/Fax: +55 48 3721-9077 e-mail: arriva02@gmail.com

Abstract

Streptococcus mitis is a frequent organism in the oral cavity and a primary colonizer. Essential oils (EO) are naturally occurring compounds in aromatic plants, they are known to possess antimicrobial properties. Exploring novel substances to inhibit biofilm formation can lead to important alternative treatment measures. One EO (*Cola nitida*) and Spilanthol were tested *in vitro* against *S. mitis* NCIMB 13770 biofilm using chlorhexidine as a control group on surface of titanium discs. The bacterial biofilms were quantified by crystal violet staining and analyzed with a Spectrophotometer at OD570 nm. The statistical analysis of the results was accomplished using the *t*- Student test, considering $p > 0,05$ statistically significant. Minimum Inhibitory Concentration (MIC) assay with concentrations ranging from 5000 to 0.0001 µg/ml. The MIC was estimated as 87.5 µg/ml for the substances tested. Spilanthol showed inhibition for biofilm of 0,5% and inhibition of planktonic growth of 4% this results were not statistically significant. The EO of *Cola nitida* did not inhibit the growth of planktonic bacteria or biofilm. Chlorhexidine showed inhibition of 50,8% for biofilm and 49,2% for planktonic bacteria. These findings suggest that spilanthol displays a low antibacterial and antibiofilm activity and *Cola nitida* did not showed antibacterial or antibiofilm activity.

Keywords: *Streptococcus mitis*; biofilms; dental implants; titanium; *Acmella ciliata*; *Cola nitida*.

1. Introduction

For the last 40 years, dental implants have successfully been used as a treatment alternative for edentulism. As more patients are receiving implants, some complications have been reported, such as mucositis, being the inflammation of the implant surrounding soft tissues, which can lead to Peri-implantitis (PI) where there is destruction of soft and hard tissues around dental implants. The microbiota present in these diseases is very similar to the one found in periodontitis. Peri-implant diseases have been related to the presence of Gram negative anaerobic bacteria when compared to microbiota of healthy sites (KOYANAGI et al., 2010). Periodontitis might be a risk indicator for implant therapy outcome since bacteria present in periodontal lesions can be transmitted to peri-implant tissues causing in this way inflammation and crestal bone loss interfering implant therapy success and survival rate (AOKI et al., 2012).

Diverse bacteria in the oral cavity organizes and develops biofilm which are surface-attached communities of cells surrounded by an extracellular matrix that has structural and protective role (DAVEY, M. E. O'TOOLE, 2000). More than 100 species have been found in oral biofilm related to PI reported through Polymerase Chain Reaction (PCR) testing. Consequently, PI has a more complex biofilm compared to healthy and periodontally affected patients (KOYANAGI et al., 2010).

Streptococcus genera of bacteria is a group which causes infections that are major and cause morbidity and mortality in humans (JOHNSBORG et al., 2008). *Streptococcus mitis* is a common bacteria present in the oral cavity forming dental biofilm (LI et al., 2004). Furthermore, *Streptococcus mitis* a primary colonizer, after exposure to bacteria of the dental surfaces, an acquired pellicle is developed from salivary biopolymers (HANNIG, 1997). This pellicle can spread in the interface between the implant surface and the primary colonizers, including *Streptococcus mitis*, *Streptococcus sanguis* and *Streptococcus oralis*. These bacterial microorganisms create appropriate conditions for adhesion of periodontal pathogens (HEUER et al., 2007). Which create proper conditions for other periodontal. *S. mitis* is commonly found in infected areas around dental implants. However, few information is available regarding its role on PI since the etiological factors of peri-implant disease is still controversial and requires future studies (ALBREKTSSON et al., 2016).

The treatment of PI includes decontamination of the area and in many cases systemic antibiotics therapy. It is known that antibiotics may have minimal long-term effect on preventing or treating established biofilms, as most are designed to target metabolically active planktonic bacterial cells, while bacterial cells embedded in an extracellular polymeric substance (EPS) matrix are unresponsive to antibiotic agents (HALL-STOODLEY;

COSTERTON; STOODLEY, 2004). As follows, it is extremely important to find new and effective alternative treatments to control oral biofilm.

Essential oils (EO) are substances produced by different species of aromatic plants. They can be harvested by different means such as expression, fermentation, enfleurage, extraction and distillation is the most used for commercial production (BAKKALI et al., 2008; SIANI et al., 1999). The EO composition varies depending on the growth conditions (such as temperature, soil composition and seasons) Taking into consideration that even two plants of the same specie grown in different conditions will produce EOs with changed compositions (ANGIONI et al., 2006; MASOTTI et al., 2003)

The aim of this study was to test the antibacterial and antibiofilm properties of one EO derived from the plant extracts of *Cola nitida* and Spilanthalol extracted isolated from the plant *Acmella ciliata* against *in vitro* *Streptococcus mitis* biofilm on titanium surfaces. The hypothesis is that the tested EO will have antibacterial and antibiofilm effect on *S. mitis* biofilm.

2. Methods

2.1 Bacterial strains and Growth conditions

Streptococcus mitis NCIBM 13370 (Kwikstik, Microbiologics, France) were grown for 48 h at 37°C in liquid medium with 200 ml de Brain Heart Infusion (BHI, Bacto Difco, USA). *S. mitis* cells were then harvested by centrifugation at 5000 rpm, 4°C, and 8000 g for 10 min and washed twice with Phosphate buffered solution (PBS, Bacto Difco, USA). The optical density (OD) of the suspension containing *S. mitis* was then measured in microplate reader mod: (Stat Fax 3200, Palm City, FL, USA). The broth cultures were adjusted to an OD at 0.5 McFarland, corresponding to approximately 1.3×10^8 CFU/mL for *S. mitis* ATCC 6249 and 1.2×10^8 CFU/mL. Such cell suspension was used as an inoculum for microbiological assays, as seen in Figure 1.

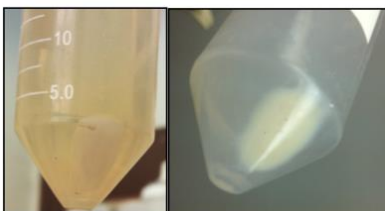


Figure 1. Cellular pellet obtained through centrifugation at 5000 rpm, 4°C, and 8000 g for 10 min

2.2 Preparation of the metallic surfaces

Commercially pure titanium (cp Ti) grade IV discs with dimensions of 6 x 1.5 mm were obtained from a bar using a precision cutting machine (Isomet 1000 Buehler®, USA). Samples were wet ground in an automatic polishing under water lubrication with SiC paper to 1200 mesh. After the polishing procedure, the samples were cleaned with isopropyl alcohol for 10 min and rinsed in distilled water in an ultrasonic bath for 5 min. Cylinders were kept in a dehumidifying chamber for 24 h before sterilization at 121 °C in autoclave for 15 min.

2.3 Phytochemical compound extraction

Acmella ciliata plant (RB 612273) was obtained from the Associação de Funcionários Fiscais at the Federal University of Santa Catarina (-27°26'28.4) (Florianópolis/SC, Brazil) and cultivated in the herbarium at the Jardim Botânico Research Institute (Rio de Janeiro/RJ, Brazil). The aerial parts of the plant were shaved and extracted with 8 L of ethanol at room temperature during 7 days. This procedure was repeated twice. After the extraction, the ethanolic extract was then filtered and dried with a rotator evaporator under reduced pressure at 40°C resulting in a production of 81.8 g.

For the extraction of *Cola nitida*'s essential oil, 50 g of the purified resin was subjected to a technique of hidrodestilation using a *Clevenger* apparatus and 150 mL of purified water were used as a solvent. After 5 min the boiling point (100 °C) was reached and the extraction was accomplished over a period of 3 h. The oil was carefully collected (10 ml in 50 g) and stored at 3-5 °C in a glass container, closed and protected from light. After the extraction, a solution was prepared with 25 µL of the volatile fraction and 1 ml of Diethyl ether PA. 2 µL were injected in a gas chromatograph coupled with a mass Perkin-Elmer spectrophotometer (30 m in height and diameter of 250 µm in diameter) at 1ml/min of Helium drag gas. The thermal treatment followed the following sequence: heating at 60°C for 5 min, followed by a heating rate at 5°C/min to reach 200 °C, and then maintaining a plateau for 10 min.

2.4 Determination of the Minimum Inhibitory Concentration (MIC)

Streptococcus mitis cells were grown for 48 h at 37°C in 30 mL BHI (Bacto Difco, USA). The phytotherapeutic compounds were diluted in 3.5% Dymethyl Sufoxide (DMSO) in gradated contents as from 5000 µg/mL down to, 0.0001µg/mL as illustrated in Figure 2. Culture medium without compounds and free of microorganisms were used in the tests as control groups. Cultures were grown at 37°C for 24h and then OD was measured to determine the MIC.

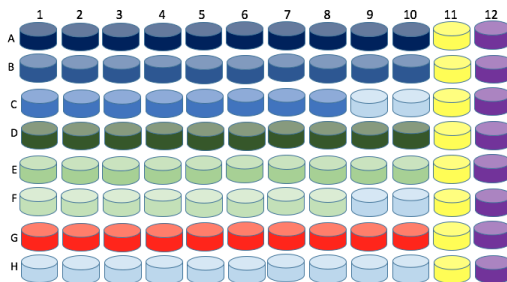


Figure 2. 96-well plate distribution for MIC assay, different shades of blue shows different concentrations (5000 to 0.0001 $\mu\text{g/mL}$) tested of *Spilanthol*, green for different concentrations (5000 to 0.0001 $\mu\text{g/mL}$) of *Cola nitida* EO, red for chlorhexidine, yellow for positive control (BHI medium with *s.mitis*) and purple for negative control (BHI liquid medium).

2.5 Antibiofilm density test

15 Cp Ti grade IV discs were placed in 24 well plates. In new 24 well plates, 15 Cp Ti samples were washed with distilled water twice to remove the planktonic biofilm and then 1ml methanol was added into each well to enhance adhesion of the biofilm on titanium surfaces for 10 min. After 10 min, methanol was removed and samples were dried for 10 min at room environment. Then, 1mL of 1% crystal violet (CV) was added and biofilm stained was for 5 min. After, CV was removed and cp Ti samples were placed in new 24-well plates. Cp Ti samples were washed in distilled water twice and dried at room temperature for 10 min. Acetic acid (33%) was used to dissolve any CV from the biofilm into a suspension to determine OD at 570 nm using the spectrophotometer. OD measurements were performed in triplicate ($n= 9$) as illustrated in Figure 3.

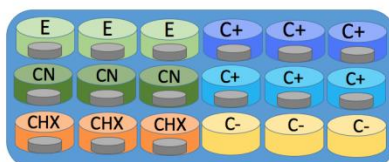


Figure 3. 20-well plate distribution for testing the effect of Essential Oils (*Cola nitida* and *Spilanthol* from *Acmella ciliata*) at minimum inhibitory concentration (87,5 $\mu\text{g/mL}$) on established biofilms of *Streptococcus mitis*. Single specie biofilms were cultivated in Brain Heart Infusion liquid medium

on top of titanium discs medium for 24 h in 96-well plate and treated with EOs.

2.7 Morphological aspects of the surfaces

15 Cp Ti discs covered with biofilms were washed twice in PBS and fixed in 2% glutaraldehyde for 5 min. Then, the cp Ti samples were washed three times in PBS and dehydrated through a series of graded ethanol solutions (50, 70, 80, 90, and 100%). Samples were sputter-coated with gold, and analyzed by Scanning Electrical Microscopy (SEM) observation (S360 Leica Cambridge) at 15 kV.

2.8 Statistical analysis

Results were analyzed through qualitative and quantitative methods, data was statistically analyzed using Student's *t*-test (Microsoft Excel, USA) considering $p < 0.05$ statistically significant.

3. Results and Discussion

Streptococcus mitis MIC values for Spilanthol and *Cola nitida* testing concentrations from 5000 to 0.0001 µg/mL, are shown in Figures 5 and 6, 87.5 µg/mL concentration was considered as MIC for both tested substances. SEM micrographies (Figure 8) shows the presence of bacteria in both samples after biofilm test. For antibiofilm activity, *Cola nitida* and spilanthol inhibition percentage was lower compared to positive control chlorhexidine, that inhibited 50% of biofilm growth under the same conditions ($p < 0.05$). Spilanthol and *Cola nitida* antibacterial and antibiofilms results were not statistically significant as shown in Table 1 and Figure 6. ($p < 0.05$). In contrast, chlorhexidine used as the control group inhibited growth of planktonic bacteria in 49.27% and was statistically significant as shown in Table 1 and Figure 7. The hypothesis of the present study was not supported by the result. The objective of this study was to test the antibiofilm effect of spilanthol and *Cola nitida*, and brought the following results:

Many studies describe EOs antibacterial activity. (BUDZYNSKA et al., 2011) have shown lavender oil, tea tree and lemon balm effective inhibition of planktonic growth of *S. aureus* and *E. coli*. Additionally, *Bowellia sp* EO has also been reported to have antibacterial activity against *S. aureus* and *C. albicans* (SCHILLACI et al., 2008). Moreover, EOs from lemongrass (*Cymbopogon flexuosus*) and grapefruit (*Citrus paradisi*) have showed antibiofilm activity against *S. aureus* (ADUKWU; ALLEN; PHILLIPS, 2012). Few studies have reported spilanthol and *Cola nitida*'s antibacterial and antibiofilm activity in the oral cavity. (Mejía et al. 2012) reported that spilanthol, which is the main active compound isolated from *Acmella ciliata*,

had an antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* (MIC values of 25 and 15 mg/mL respectively). Also 7-epiclusianone isolated from *Rhედdia brasiliensis* EO showed strong antibiofilm activity against *Streptococcus mutans* (MIC values of 6.25 to 800 mg/ml)(MURATA et al., 2010b). Ajoene a compound derived from garlic (*Allium sativum*) EO showed to interfere on quorum sensing of *P. aeruginosa* exposed mice(JAKOBSEN et al., 2012). Apigenin and tt-farnesol propolis derived compounds also present in plants EOs showed antibiofilm activity against *S.mutans*(KOO et al., 2003, 2005). Nevertheless, the present study that spilanthol had a low antibiofilm and antibacterial effect on *S. mitis* growth. As follows, the results of this study cannot be compared to previous since different bacteria were tested and being a limitation of this study since there is no parameter for comparison. Another study reported an efficient antibacterial activity of *Cola nitida* EO against 28 strains of *Staphylococcus* with MIC values of 0.312mg/mL to 5.000mg/mL(DAH-NOUVLESSOUNON et al., 2015).. *Cola nitida* EO synthesized with silver nano-particles showed antibacterial activity against *E. coli* and *P. aeruginosa* with MIC values of 50µg/mL and 120µg/mL respectively (LATEEF et al., 2015). However, there are no previous studies for *S. mitis* which is also a limitation for comparison of the results of this study.

Spilanthol has been described as a nonsteroidal anti-inflammatory drug (NSAID) by inhibition of the cyclo-oxygenase-2 enzyme (COX-2) (WU et al., 2008), COX-2 inhibitor ketorolac showed to improve bone fractures healing (GERSTENFELD et al., 2003). NSAIDs could decrease the host's immune-inflammatory responses that play in the destruction of the periodontal attachment structures (HOWELL; WILLIAMS, 1993), More studies should be conducted in order to determine if spilanthol may have this beneficial effects on bone healing.

Chlorhexidine (CHX) showed antibiofilm and antibacterial activity against *S. mitis* biofilm, it was chosen as a control because it has been considered as the antibacterial gold standard (VAN STRYDONCK et al., 2012), previous studies show that chlorhexidine displays good substantivity and has a broad spectrum against Gram-positive and Gram-negative bacteria, and yeasts. CHX can reduce biofilm, caries and gingivitis(MARSH, 2010). However, side effects can occur over a long-term use including: discoloration of teeth and tongue, loss of taste and burning sensations (MILES; MISRA, 1931).

Crystal violet (CV) assay used in the present study has limitations when being tested with EOs. According to (NIU; GILBERT, 2004) many factors could affect results such as: Structural characteristics that disturb dye diffusion, morphological and physiological differences in individual cells that influence dye loading and chemical interactions between plant EO components and CV. Other techniques such PCR analysis may be more specific and effective to identify biofilm inhibition (WANG et al., 2016). For this reason, future studies could be done against oral biofilm collected from

patients with PI in order to mimic a more realistic situation. Additionally, this study presents all the limitations of *in vitro* studies related to the difficulty to simulate or include all of the biologic variables found within the human body(WANG et al., 2016).

Furthermore, the characterization for essential oils is complex due to its nature. Since the composition of the same EO plant species can vary according to the growth and environmental conditions such as geographical location, type of soil, part of plant, climate and others. (ANGIONI et al., 2006; BENABDELKADER et al., 2011; MASOTTI et al., 2003). Certainly, human made antibacterial compounds are easier to characterize and standardize; Nevertheless, nature is more challenging but also more beneficial due to its innumerable beneficial effects in the human body. For this reason, further studies are recommended to develop characterization techniques in order to identify exactly which active compounds are present to have the desired antibacterial and antibiofilm effects.

Conclusion

Cola nitida EO had no antibiofilm or antibacterial activity and Spilanthol exhibited low antibacterial and antibiofilm activity against *S. mitis*. More studies should be conducted to test these substances against other bacteria. Studies related to testing new compounds should be encouraged in the quest of finding new substances of interest.

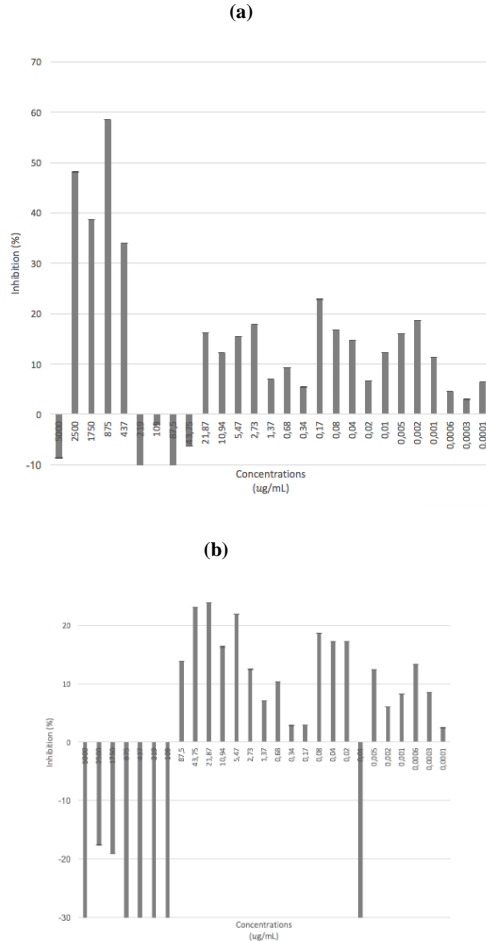


Figure 4. Spilanthol from *Acmella ciliata* Minimum inhibitory concentration (MIC), concentrations tested ranging from 5000 to 0,0001 µg/mL. (a)Percentage of inhibition for Planktonic growth (b)for biofilm growth. *Streptococcus mitis* was grown in Brain heart infusion liquid medium overnight in 96-well plate and treated with different concentrations of EOs.

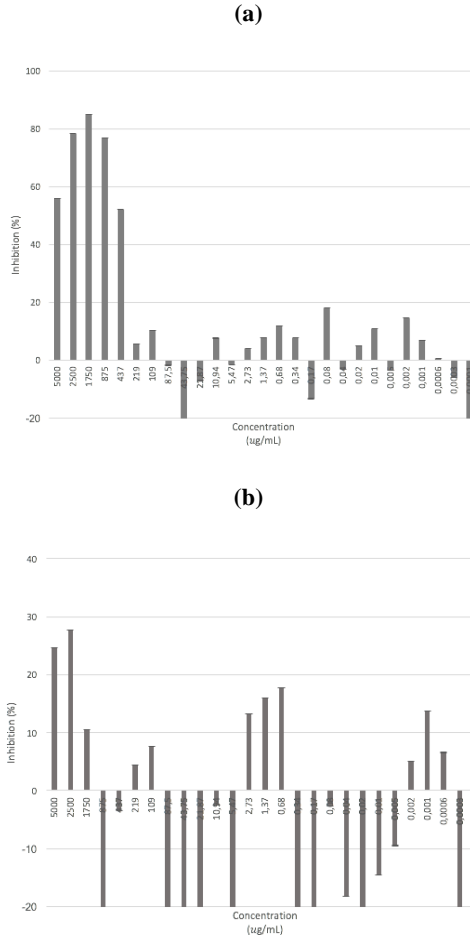


Figure 5. *Cola nitida* Minimum inhibitory concentration (MIC), concentrations tested ranging from 5000 to 0,0001 µg/mL. (a) Percentage of inhibition for Planktonic growth (b) for biofilm growth. *Streptococcus mitis* was grown in Brain heart infusion liquid medium overnight in 96-well plate and treated with different concentrations of EOs.

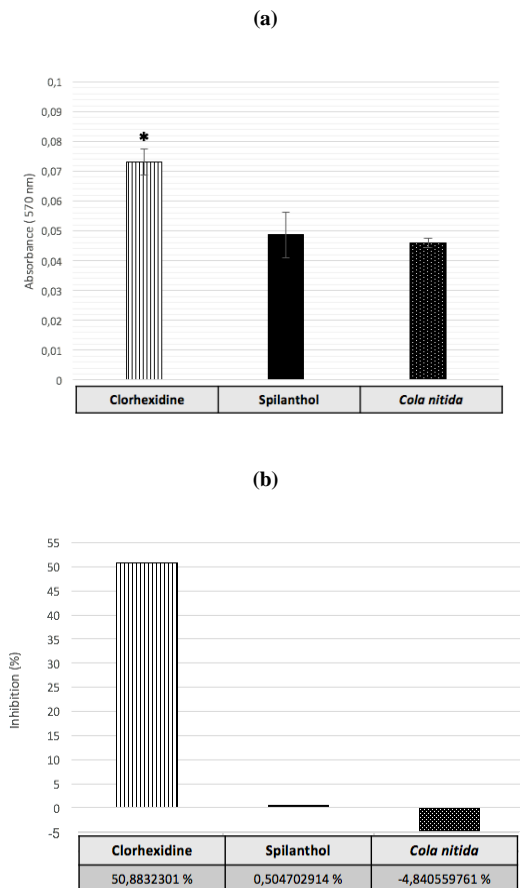


Figure 6. (a) Effect of Essential Oils (*Cola nitida* and *Spilanthol* from *Acmella ciliata*) at minimum inhibitory concentration (87,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) on established biofilms of *Streptococcus mitis*. Single specie biofilms were cultivated in Brain Heart Infusion liquid medium on top of titanium discs medium for 24 h in 96-well plate and treated with EOs. The values of absorbance are mean SEM of three independent assays. The data were statistically analyzed by the Student's *t*-test (* $p < 0,05$). (b) Inhibition percentage compared to positive control.

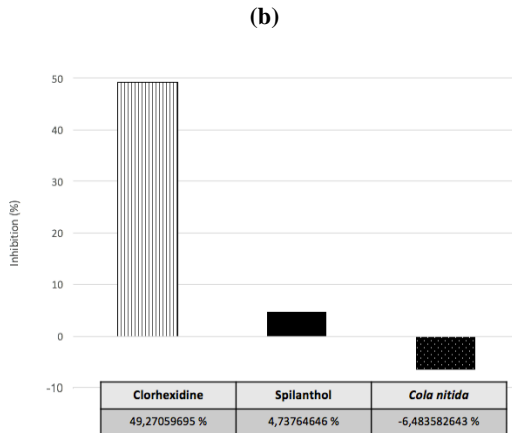
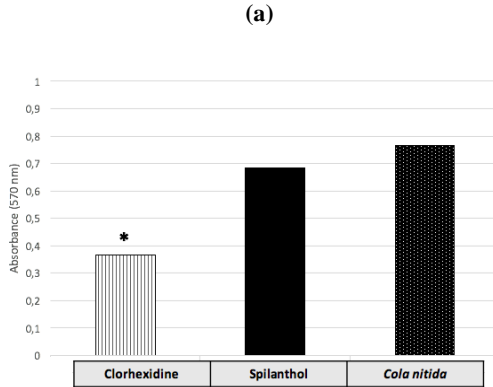


Figure 7 . (a)Effect of Essential Oils (*Cola nitida* and Spilanthol from *Acmella ciliata*) at minimum inhibitory concentration (87,5 $\mu\text{g/mL}$) on planktonic *Streptococcus mitis*. Planktonic bacteria were cultivated in Brain Heart Infusion liquid medium for 24 h in 96-well plate and treated with EOs. The values of absorbance are mean SEM of three independent assays. The data were statistically analyzed by the Student's *t*-test (* $p < 0,05$) (b). Inhibition percentage compared to positive control.

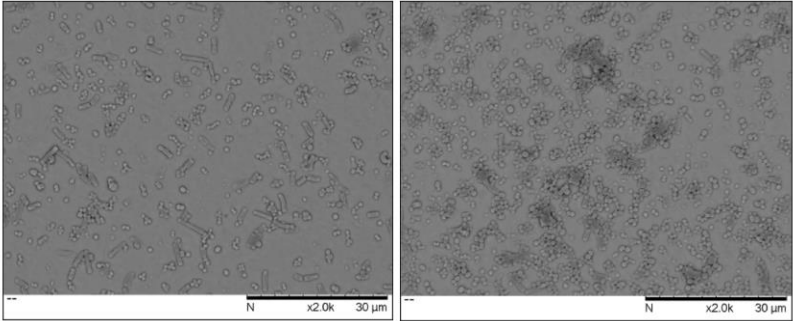


Figure 8. SEM images of titanium disc surfaces after being exposed to tested substances. Right Spilanthol (2000x), left *Cola nitida* EO(2000x)

P values ($p < 0.05$)	Antibiofilm assay	Antimicrobial assay
Chlorhexidine	0.009428285	0.003048714
Spilanthol(<i>Acmella ciliata</i>)	0.305576565	0.387920409
<i>Cola nitida</i>	0.128725988	0.232533714

Table 1. p values of Student's t -test

References

ADUKWU, E. C.; ALLEN, S. C. H.; PHILLIPS, C. A. The anti-biofilm activity of lemongrass (*Cymbopogon flexuosus*) and grapefruit (*Citrus paradisi*) essential oils against five strains of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 113, n. 5, p. 1217–1227, nov. 2012.

ALBREKTSSON, T. et al. “Peri-Implantitis”: A Complication of a Foreign Body or a Man-Made “Disease”. Facts and Fiction. **Clinical Implant Dentistry and Related Research**, v. 18, n. 4, p. 840–849, ago. 2016.

ALLAKER, R. P.; DOUGLAS, C. W. I. Novel anti-microbial therapies for dental plaque-related diseases. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 33, n. 1, p. 8–13, 2009.

ANGIONI, A. et al. Chemical Composition , Seasonal Variability , and Antifungal Activity of *Lavandula stoechas* L . ssp . *stoechas* Essential Oils from Stem / Leaves and Flowers. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, p. 4364–4370, 2006.

AOKI, M. et al. Transmission of Periodontopathic Bacteria from Natural Teeth to Implants. **Clinical Implant Dentistry and Related Research**, v. 14, n. 3, p. 406–411, 2012.

APPEL, H. M.; COCROFT, R. B. Plants respond to leaf vibrations caused by insect herbivore chewing. **Oecologia**, v. 175, n. 4, p. 1257–1266, 2014.

BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils - A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 2, p. 446–475, 2008.

BARBOSA, A. F. et al. Spilanthol: Occurrence, extraction, chemistry and biological activities. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 26, n. 1, p. 128–133, 2016a.

BARBOSA, A. F. et al. Spilanthol: Occurrence, extraction, chemistry and biological activities. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 26, n. 1, p. 128–

133, 2016b.

BARDELL, D. The roles of the sense of taste and clean teeth in the discovery of bacteria by Antoni van Leeuwenhoek. **Microbiological reviews**, v. 47, n. 1, p. 121–126, 1983.

BENABDELKADER, T. et al. Essential oils from wild populations of algerian *lavandula stoechas* L.: Composition, chemical variability, and in vitro biological properties. **Chemistry and Biodiversity**, v. 8, n. 5, p. 937–953, 2011.

BHUIYAN N, BEGUM J, NANDI N, A. F. Constituents of the essential oil from leaves and buds of clove (*Syzigium caryophyllatum* (L.) Alston). **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 4, n. 11, p. 451–454, 2010.

BOONEN, J. et al. Transdermal behaviour of the N-alkylamide spilanthol (affinin) from *Spilanthes acmella* (Compositae) extracts. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 127, n. 1, p. 77–84, 2010a.

BOONEN, J. et al. LC-MS profiling of N-alkylamides in *Spilanthes acmella* extract and the transmucosal behaviour of its main bio-active spilanthol. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 53, n. 3, p. 243–249, 2010b.

BRÅNEMARK, P. I. Osseointegration and its experimental background. **The Journal of prosthetic dentistry**, v. 50, n. 3, p. 399–410, 1983.

BUDZYNSKA, A. et al. Antibiofilm activity of selected plant essential oils and their major components. **Pol J Microbiol**, p. 35–41, 2011.

BULLERMAN, L. B.; LIEU, F. Y.; SEIER, S. A. Inhibition of growth and aflatoxin production by cinnamon and clove oils. Cinnamic aldehyde and eugenol. **Journal of Food Science**, v. 42, n. 4, p. 1107–1109, 1977.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. **International journal of food**

microbiology, v. 94, p. 223–253, 2004.

CASTRO, K. N. C. et al. Acaricide activity in vitro of *Acmella oleracea* against *Rhipicephalus microplus*. **Parasitology Research**, v. 113, n. 10, p. 3697–3701, 2014.

DAH-NOUVLESSOUNON, D. et al. Phytochemical Analysis and Biological Activities of *Cola nitida* Bark. **Biochemistry Research International**, v. 2015, p. 1–12, 2015.

DAVEY, M. E. E O'TOOLE, G. A. Microbial Biofilms: from Ecology to Molecular Genetics. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, n. 847–867, 2000.

DAVIES, D. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 2, n. 2, p. 114–22, 2003.

DE SPIEGELEER, B. et al. Skin penetration enhancing properties of the plant N-alkylamide spilanthol. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 148, n. 1, p. 117–125, 2013.

DEHARO, E. et al. A search for natural bioactive compounds in Bolivia through a multidisciplinary approach. Part V. Evaluation of the antimalarial activity of plants used by the Tacana Indians. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 77, n. 1, p. 91–98, 2001.

FERRÁNDIZ, M. J. et al. New species genetic approach to identify strains of mitis group streptococci that are donors of rifampin resistance to *Streptococcus pneumoniae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 1, p. 368–372, 2011.

FILOCHE, S. K.; SOMA, K.; SISSONS, C. H. Antimicrobial effects of essential oils in combination with chlorhexidine digluconate. **Oral Microbiology and Immunology**, v. 20, n. 4, p. 221–225, 2005.

FINE, D. H. et al. Effect of an essential oil-containing antiseptic mouthrinse

- on plaque and salivary *Streptococcus mutans* levels. **Journal of clinical periodontology**, v. 27, n. 3, p. 157–161, 2000.
- FINE, D. H. Listerine: Past, present and future - A test of thyme. **Journal of Dentistry**, v. 38, n. SUPPL. 1, p. S2–S5, 2010.
- FINE, D. H.; FURGANG, D.; BARNETT, M. L. Comparative antimicrobial activities of antiseptic mouthrinses against isogenic planktonic and biofilm forms of *Actinobacillus actinomycescomitans*. **Journal of clinical periodontology**, v. 28, n. 7, p. 697–700, 2001.
- GERBINO, A. et al. Spilanthol from *Acmella oleracea* lowers the intracellular levels of cAMP impairing NKCC2 phosphorylation and water channel AQP2 membrane expression in mouse kidney. **PLoS ONE**, v. 11, n. 5, p. 1–23, 2016.
- GERSTENFELD, L. C. et al. Differential inhibition of fracture healing by non-selective and cyclooxygenase-2 selective non-steroidal anti-inflammatory drugs. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 21, p. 670–675, 2003.
- GIBBONS, S. Anti-staphylococcal plant natural products. **Natural product reports**, v. 21, n. 2, p. 263–277, 2004.
- HALL-STOODLEY, L.; COSTERTON, J.; STOODLEY, P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. **Nature Reviews. Microbiology**, v. 2, n. February, p. 95–108, 2004.
- HANNIG, M. Transmission electron microscopic study of in vivo pellicle formation on dental restorative materials. p. 422–433, 1997.
- HEUER, W. et al. Analysis of early biofilm formation on oral implants in man. **Journal of Oral Rehabilitation**, v. 34, n. 5, p. 377–382, 2007.
- HOFER, D. et al. Biofilm reduction and staining potential of a 0.05% chlorhexidine rinse containing essential oils. **International Journal of Dental Hygiene**, v. 9, n. 1, p. 60–67, 2011.

HOWELL, T. H.; WILLIAMS, R. C. Nonsteroidal Antiinflammatory Drugs as Inhibitors of Periodontal Disease Progression. **Critical Reviews in Oral Biology and Medicine**, v. 4, n. 2, p. 177–196, 1993.

INDABAWA, I.; ARZAI, A. Antibacterial Activity of *Garcinia kola* and *Cola nitida* Seed Extracts. **Bayero Journal of Pure and Applied Sciences**, v. 4, n. 1, p. 52–55, 2011.

JAKOBSEN, T. H. et al. Ajoene, a Sulfur-Rich Molecule from Garlic, Inhibits Genes Controlled by Quorum Sensing. p. 2314–2325, 2012.

JANSEN, R. K. The Systematics of *Acmella* (Asteraceae- Heliantheae). **Systematic Botany Monographs**, v. 8, p. 1–115, 1985.

JOHNSBORG, O. et al. A predatory mechanism dramatically increases the efficiency of lateral gene transfer in *Streptococcus pneumoniae* and related commensal species. **Molecular Microbiology**, v. 69, n. 1, p. 245–253, 2008.

KOO, H. et al. Inhibition of *Streptococcus mutans* biofilm accumulation and polysaccharide production by apigenin and tt-farnesol. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 52, n. 5, p. 782–789, 2003.

KOO, H. et al. Apigenin and tt-farnesol with fluoride effects on *S. mutans* biofilms and dental caries. **Journal of dental research**, v. 84, n. 11, p. 1016–20, nov. 2005.

KOYANAGI, T. et al. Analysis of microbiota associated with peri-implantitis using 16S rRNA gene clone library. **Journal of Oral Microbiology**, v. 2, n. 2010, p. 1–8, 2010.

LATEEF, A. et al. *Cola nitida*-Mediated Biogenic Synthesis of Silver Nanoparticles Using Seed and Seed Shell Extracts and Evaluation of Antibacterial Activities. **BioNanoScience**, v. 5, n. 4, p. 196–205, 2015.

LEMON, K. et al. Biofilm Development with an Emphasis on *Bacillus subtilis*. **Curr Top Microbiol Immunol**, v. 322, n. 1, p. 1–16, 2008.

- LI, J. et al. Identification of early microbial colonizers in human dental biofilm. **Journal of Applied Microbiology**, v. 97, n. 6, p. 1311–1318, 2004.
- LIS-BALCNIN, M. et al. Differences in Bioactivity between the Enantiomers of α -Pinene. **Journal of Essential Oil Research**, v. 11, p. 393–397, 1999.
- MACHADO, T. B. et al. In vitro activity of Brazilian medicinal plants, naturally occurring naphthoquinones and their analogues, against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 21, n. 3, p. 279–284, 2003.
- MARSH, P. D. Dental plaque as a biofilm and a microbial community - Implications for health and disease. **Journal of Oral Biosciences**, v. 6, n. 4, p. 185–191, 2006.
- MARSH, P. D. Controlling the oral biofilm with antimicrobials. **Journal of Dentistry**, v. 38, n. SUPPL. 1, p. S11–S15, 2010.
- MARTIN, R.; BECKER, H. Amides and other constituents from *acmella ciliata*. **Phytochemistry**, v. 24, n. 10, p. 2295–2300, 1985.
- MASOTTI, V. et al. Seasonal and phenological variations of the essential oil from the narrow endemic species *Artemisia molinieri* and its biological activities. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 7115–7121, 2003.
- MEJÍA, C.; CASTAÑO, J.; VÁZQUEZ, E. Actividad Biologica de los Aceites Esenciales de *Acemella ciliata* (Kunth) Cass. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v. 17, n. 2, p. 160–171, 2012.
- MILES, B. Y. A. A.; MISRA, S. S. THE ESTIMATION OF THE BACTERICIDAL POWER OF THE BLOOD. p. 732–749, 1931.
- MOHAMMADI, M.; ROHLOFF, J. Antibiofilm activity of essential oils and plant extracts against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* biofilms. **Food Control**, v. 61, p. 156–164, 2016.

MOLINA-TORRES, J. et al. Fungistatic and bacteriostatic activities of alkamides from *Heliopsis longipes* roots: Affinin and reduced amides. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 15, p. 4700–4704, 2004.

MOLINATORRES, J. et al. Purely olefinic alkamides in *Heliopsis longipes* and *Acmella (Spilanthes) oppositifolia*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 24, n. 1, p. 43–47, 1996.

MOMBELLI, A et al. The microbiota associated with successful or failing osseointegrated titanium implants. **Oral microbiology and immunology**, v. 2, n. 4, p. 145–151, 1987.

MORENS, D. M.; FAUCI, A. S. Emerging Infectious Diseases: Threats to Human Health and Global Stability. **PLoS Pathogens**, v. 9, n. 7, p. 7–9, 2013.

MURATA, R. M. et al. Inhibition of *Streptococcus mutans* biofilm accumulation and development of dental caries in vivo by 7-epiclusianone and fluoride. **Biofouling**, v. 26, n. 7, p. 865–872, 2010a.

MURATA, R. M. et al. Inhibition of *Streptococcus mutans* biofilm accumulation and development of dental caries in vivo by 7-epiclusianone and fluoride. **Biofouling**, v. 26, n. 7, p. 865–872, 2010b.

NASCIMENTO, A. M. et al. Gastroprotective effect and structure of a rhamnogalacturonan from *Acmella oleracea*. **Phytochemistry**, v. 85, n. SEPTEMBER, p. 137–142, 2013.

NEWMAN HN, W. M. Dental plaque revisited. **Cardiff: Bioline**, p. 79–88, 1999.

NIU, C.; GILBERT, E. S. Colorimetric Method for Identifying Plant Essential Oil Components That Affect Biofilm Formation and Structure. **Society**, v. 70, n. 12, p. 6951–6956, 2004.

OJO, G. B. et al. Microanatomical effects of ethanolic extract of *cola nitida*

- on the stomach mucosa of adult wistar rats. **African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines**, v. 7, n. 1, p. 47–52, 2010.
- OLIVEIRA C, SCHENKEL E, GOSMANN G, PALAZZO J, MENTZ L, P. P. **Farmacognosia, da planta ao medicamento**. 2. ed. Porto Alegre: Ed. Universidade UFRGS, Ed. da UFSC, 1999.
- PIZZO, G. et al. The effects of an essential oil and an amine fluoride/stannous fluoride mouthrinse on supragingival plaque regrowth. **Journal of periodontology**, v. 79, n. 7, p. 1177–83, 2008.
- QUINTAS, V. et al. In situ antimicrobial activity on oral biofilm: essential oils vs. 0.2 % chlorhexidine. **Clinical Oral Investigations**, p. 97–107, 2014.
- RINCÓN MEJÍA, C. A. et al. Actividad antimicrobiana y análisis de la composición química de una fracción de las flores de *Acmella ciliata* (Kunth) Cass. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v. 20, n. 4, p. 409–418, 2015.
- ROBERT KOCH. Bacteriological research. **Congress, International Medical**, p. 380–383, 1890.
- SAVIUC, C.-M. et al. Essential oils with microbicidal and antibiofilm activity. **Current pharmaceutical biotechnology**, v. 16, n. 2, p. 137–51, 2015.
- SCHILLACI, D. et al. In vitro anti-biofilm activity of *Boswellia* spp. oleogum resin essential oils. **Letters in Applied Microbiology**, v. 47, n. 5, p. 433–438, 2008.
- SIANI, A. C. et al. Evaluation of anti-inflammatory-related activity of essential oils from the leaves and resin of species of *Protium*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 66, n. 1, p. 57–69, 1999.
- SILVEIRA, N. et al. A new alkamide with an endoperoxide structure from *Acmella ciliata* (Asteraceae) and its in vitro antiplasmodial activity. **Molecules**, v. 21, n. 6, p. 1–10, 2016.

SIMAS, N. K. et al. Acetylenic 2-phenylethylamides and new isobutylamides from *Acmella oleracea* (L.) R. K. Jansen, a Brazilian spice with larvicidal activity on *Aedes aegypti*. **Phytochemistry Letters**, v. 6, n. 1, p. 67–72, 2013.

SLIEPEN, I. et al. Effect of mouthrinses on *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* biofilms in a hydrodynamic model. **Clinical Oral Investigations**, v. 14, n. 3, p. 241–250, 2010.

SOARES, C. P. et al. Effect of *Spilanthes acmella* hydroethanolic extract activity on tumour cell actin cytoskeleton. **Cell Biology International**, v. 38, n. 1, p. 131–135, 2014.

STEPHEN M. PAREL, P.I. BRANEMARK, T. J. Osseointegration in maxillofacial prosthetics. Part: intraoral applications. v. 55, n. 4, 1986.

STOEKEN, J. E.; PARASKEVAS, S.; VAN DER WEIJDEN, G. A. The long-term effect of a mouthrinse containing essential oils on dental plaque and gingivitis: a systematic review. **Journal of periodontology**, v. 78, n. 7, p. 1218–28, 2007.

SUBRAMANI, K. et al. Biofilm on Dental Implants: A Review of the Literature. **International Journal of Oral & Maxillofacial Implants**, v. 24, n. 4, p. 616–626, 2009.

TAKARADA, K. et al. A comparison of the antibacterial efficacies of essential oils against oral pathogens. **Oral Microbiology and Immunology**, v. 19, n. 1, p. 61–64, 2004.

VAN LEEUWEN, M. P. C.; SLOT, D. E.; VAN DER WEIJDEN, G. A. The effect of an essential-oils mouthrinse as compared to a vehicle solution on plaque and gingival inflammation: A systematic review and meta-analysis. **International Journal of Dental Hygiene**, v. 12, n. 3, p. 160–167, 2014.

VAN STRYDONCK, D. A. C. et al. Effect of a chlorhexidine mouthrinse on

plaque, gingival inflammation and staining in gingivitis patients: A systematic review. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 39, n. 11, p. 1042–1055, 2012.

VON FRAUNHOFER, J. A. et al. The effect of a mouthrinse containing essential oils on dental restorative materials. **General Dentistry**, v. 54, n. 6, p. 403–407, 2006.

WANG, S.-P. et al. Effect of anti-biofilm glass–ionomer cement on *Streptococcus mutans* biofilms. **International Journal of Oral Science**, v. 8, n. 2, p. 76–83, 29 abr. 2016.

WHO. Global Report on Surveillance: Antimicrobial Resistance. **World Health Organization**, p. 1–7, 2014.

WU, L. C. et al. Anti-inflammatory effect of spilanthol from *Spilanthes acmella* on murine macrophage by down-regulating LPS-induced inflammatory mediators. **J Agric Food Chem**, v. 56, p. 2341–2349, 2008.

CAPITULO III

REFERENCIAS

ADUKWU, E. C.; ALLEN, S. C. H.; PHILLIPS, C. A. The anti-biofilm activity of lemongrass (*Cymbopogon flexuosus*) and grapefruit (*Citrus paradisi*) essential oils against five strains of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 113, n. 5, p. 1217–1227, nov. 2012.

ALBREKTSSON, T. et al. “Peri-Implantitis”: A Complication of a Foreign Body

or a Man-Made “Disease”. Facts and Fiction. **Clinical Implant Dentistry and Related Research**, v. 18, n. 4, p. 840–849, ago. 2016.

ALLAKER, R. P.; DOUGLAS, C. W. I. Novel anti-microbial therapies for dental plaque-related diseases. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 33, n. 1, p. 8–13, 2009.

ANGIONI, A. et al. Chemical Composition , Seasonal Variability , and Antifungal Activity of *Lavandula stoechas* L . ssp . *stoechas* Essential Oils from Stem / Leaves and Flowers. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, p. 4364–4370, 2006.

AOKI, M. et al. Transmission of Periodontopathic Bacteria from Natural Teeth to Implants. **Clinical Implant Dentistry and Related Research**, v. 14, n. 3, p. 406–411, 2012.

APPEL, H. M.; COCROFT, R. B. Plants respond to leaf vibrations caused by insect herbivore chewing. **Oecologia**, v. 175, n. 4, p. 1257–1266, 2014.

BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils - A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 2, p. 446–475, 2008.

BARBOSA, A. F. et al. Spilanthal: Occurrence, extraction, chemistry and biological activities. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 26, n. 1, p. 128–133, 2016a.

BARBOSA, A. F. et al. Spilanthol: Occurrence, extraction, chemistry and biological activities. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 26, n. 1, p. 128–133, 2016b.

BARDELL, D. The roles of the sense of taste and clean teeth in the discovery of bacteria by Antoni van Leeuwenhoek. **Microbiological reviews**, v. 47, n. 1, p. 121–126, 1983.

BENABDELKADER, T. et al. Essential oils from wild populations of algerian *lavandula stoechas* L.: Composition, chemical variability, and in vitro biological properties. **Chemistry and Biodiversity**, v. 8, n. 5, p. 937–953, 2011.

BHUIYAN N, BEGUM J, NANDI N, A. F. Constituents of the essential oil from leaves and buds of clove (*Syzigium caryophyllatum* (L.) Alston). **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 4, n. 11, p. 451–454, 2010.

BOONEN, J. et al. Transdermal behaviour of the N-alkylamide spilanthol (affinin) from *Spilanthus acmella* (Compositae) extracts. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 127, n. 1, p. 77–84, 2010a.

BOONEN, J. et al. LC-MS profiling of N-alkylamides in *Spilanthus acmella* extract and the transmucosal behaviour of its main bio-active spilanthol. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 53, n. 3, p. 243–249,

2010b.

BRÅNEMARK, P. I. Osseointegration and its experimental background. **The Journal of prosthetic dentistry**, v. 50, n. 3, p. 399–410, 1983.

BUDZYNSKA, A. et al. Antibiofilm activity of selected plant essential oils and their major components. **Pol J Microbiol**, p. 35–41, 2011.

BULLERMAN, L. B.; LIEU, F. Y.; SEIER, S. A. Inhibition of growth and aflatoxin production by cinnamon and clove oils. Cinnamic aldehyde and eugenol. **Journal of Food Science**, v. 42, n. 4, p. 1107–1109, 1977.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. **International journal of food microbiology**, v. 94, p. 223–253, 2004.

CASTRO, K. N. C. et al. Acaricide activity in vitro of *Acmella oleracea* against *Rhipicephalus microplus*. **Parasitology Research**, v. 113, n. 10, p. 3697–3701, 2014.

DAH-NOUVLESSOUNON, D. et al. Phytochemical Analysis and Biological Activities of *Cola nitida* Bark. **Biochemistry Research International**, v. 2015, p. 1–12, 2015.

DAVEY, M. E. E O'TOOLE, G. A. Microbial Biofilms: from Ecology to Molecular Genetics. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, n.

847–867, 2000.

DAVIES, D. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 2, n. 2, p. 114–22, 2003.

DE SPIEGELEER, B. et al. Skin penetration enhancing properties of the plant N-alkylamide spilanthol. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 148, n. 1, p. 117–125, 2013.

DEHARO, E. et al. A search for natural bioactive compounds in Bolivia through a multidisciplinary approach. Part V. Evaluation of the antimalarial activity of plants used by the Tacana Indians. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 77, n. 1, p. 91–98, 2001.

FERRÁNDIZ, M. J. et al. New species genetic approach to identify strains of mitis group streptococci that are donors of rifampin resistance to *Streptococcus pneumoniae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 1, p. 368–372, 2011.

FILOCHE, S. K.; SOMA, K.; SISSONS, C. H. Antimicrobial effects of essential oils in combination with chlorhexidine digluconate. **Oral Microbiology and Immunology**, v. 20, n. 4, p. 221–225, 2005.

FINE, D. H. et al. Effect of an essential oil-containing antiseptic mouthrinse on plaque and salivary *Streptococcus mutans* levels. **Journal of clinical**

periodontology, v. 27, n. 3, p. 157–161, 2000.

FINE, D. H. Listerine: Past, present and future - A test of thyme. **Journal of Dentistry**, v. 38, n. SUPPL. 1, p. S2–S5, 2010.

FINE, D. H.; FURGANG, D.; BARNETT, M. L. Comparative antimicrobial activities of antiseptic mouthrinses against isogenic planktonic and biofilm forms of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. **Journal of clinical periodontology**, v. 28, n. 7, p. 697–700, 2001.

GERBINO, A. et al. Spilanthol from *Acmella oleracea* lowers the intracellular levels of cAMP impairing NKCC2 phosphorylation and water channel AQP2 membrane expression in mouse kidney. **PLoS ONE**, v. 11, n. 5, p. 1–23, 2016.

GERSTENFELD, L. C. et al. Differential inhibition of fracture healing by non-selective and cyclooxygenase-2 selective non-steroidal anti-inflammatory drugs. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 21, p. 670–675, 2003.

GIBBONS, S. Anti-staphylococcal plant natural products. **Natural product reports**, v. 21, n. 2, p. 263–277, 2004.

HALL-STOODLEY, L.; COSTERTON, J.; STOODLEY, P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. **Nature Reviews. Microbiology**, v. 2, n. February, p. 95–108, 2004.

HANNIG, M. Transmission electron microscopic study of in vivo pellicle formation on dental restorative materials. p. 422–433, 1997.

HEUER, W. et al. Analysis of early biofilm formation on oral implants in man. **Journal of Oral Rehabilitation**, v. 34, n. 5, p. 377–382, 2007.

HOFER, D. et al. Biofilm reduction and staining potential of a 0.05% chlorhexidine rinse containing essential oils. **International Journal of Dental Hygiene**, v. 9, n. 1, p. 60–67, 2011.

HOWELL, T. H.; WILLIAMS, R. C. Nonsteroidal Antiinflammatory Drugs as Inhibitors of Periodontal Disease Progression. **Critical Reviews in Oral Biology and Medicine**, v. 4, n. 2, p. 177–196, 1993.

INDABAWA, I.; ARZAI, A. Antibacterial Activity of *Garcinia kola* and *Cola nitida* Seed Extracts. **Bayero Journal of Pure and Applied Sciences**, v. 4, n. 1, p. 52–55, 2011.

JAKOBSEN, T. H. et al. Ajoene, a Sulfur-Rich Molecule from Garlic, Inhibits Genes Controlled by Quorum Sensing. p. 2314–2325, 2012.

JANSEN, R. K. The Systematics of *Acmella* (Asteraceae- Heliantheae). **Systematic Botany Monographs**, v. 8, p. 1–115, 1985.

JOHNSBORG, O. et al. A predatory mechanism dramatically increases the efficiency of lateral gene transfer in *Streptococcus pneumoniae* and related

commensal species. **Molecular Microbiology**, v. 69, n. 1, p. 245–253, 2008.

KOO, H. et al. Inhibition of *Streptococcus mutans* biofilm accumulation and polysaccharide production by apigenin and tt-farnesol. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 52, n. 5, p. 782–789, 2003.

KOO, H. et al. Apigenin and tt-farnesol with fluoride effects on *S. mutans* biofilms and dental caries. **Journal of dental research**, v. 84, n. 11, p. 1016–20, nov. 2005.

KOYANAGI, T. et al. Analysis of microbiota associated with peri-implantitis using 16S rRNA gene clone library. **Journal of Oral Microbiology**, v. 2, n. 2010, p. 1–8, 2010.

LATEEF, A. et al. Cola nitida-Mediated Biogenic Synthesis of Silver Nanoparticles Using Seed and Seed Shell Extracts and Evaluation of Antibacterial Activities. **BioNanoScience**, v. 5, n. 4, p. 196–205, 2015.

LEMON, K. et al. Biofilm Development with an Emphasis on *Bacillus subtilis*. **Curr Top Microbiol Immunol**, v. 322, n. 1, p. 1–16, 2008.

LI, J. et al. Identification of early microbial colonizers in human dental biofilm. **Journal of Applied Microbiology**, v. 97, n. 6, p. 1311–1318, 2004.

LIS-BALCNIN, M. et al. Differences in Bioactivity between the Enantiomers of α -Pinene. **Journal of Essential Oil Research**, v. 11, p. 393–397, 1999.

MACHADO, T. B. et al. In vitro activity of Brazilian medicinal plants, naturally occurring naphthoquinones and their analogues, against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 21, n. 3, p. 279–284, 2003.

MARSH, P. D. Dental plaque as a biofilm and a microbial community - Implications for health and disease. **Journal of Oral Biosciences**, v. 6, n. 4, p. 185–191, 2006.

MARSH, P. D. Controlling the oral biofilm with antimicrobials. **Journal of Dentistry**, v. 38, n. SUPPL. 1, p. S11–S15, 2010.

MARTIN, R.; BECKER, H. Amides and other constituents from *acmella ciliata*. **Phytochemistry**, v. 24, n. 10, p. 2295–2300, 1985.

MASOTTI, V. et al. Seasonal and phenological variations of the essential oil from the narrow endemic species *Artemisia molinieri* and its biological activities. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 7115–7121, 2003.

MEJÍA, C.; CASTAÑO, J.; VÁZQUEZ, E. Actividad Biológica de los Aceites Esenciales de *Acemella ciliata* (Kunth) Cass. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v. 17, n. 2, p. 160–171, 2012.

MILES, B. Y. A. A.; MISRA, S. S. THE ESTIMATION OF THE BACTERICIDAL

POWER OF THE BLOOD. p. 732–749, 1931.

MOHAMMADI, M.; ROHLOFF, J. Antibiofilm activity of essential oils and plant extracts against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* biofilms.

Food Control, v. 61, p. 156–164, 2016.

MOLINA-TORRES, J. et al. Fungistatic and bacteriostatic activities of alkamides from *Heliopsis longipes* roots: Affinin and reduced amides.

Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 52, n. 15, p. 4700–4704, 2004.

MOLINATORRES, J. et al. Purely olefinic alkamides in *Heliopsis longipes* and *Acmella (Spilanthes) oppositifolia*. **Biochemical Systematics and**

Ecology, v. 24, n. 1, p. 43–47, 1996.

MOMBELLI, A et al. The microbiota associated with successful or failing osseointegrated titanium implants. **Oral microbiology and immunology**, v.

2, n. 4, p. 145–151, 1987.

MORENS, D. M.; FAUCI, A. S. Emerging Infectious Diseases: Threats to Human Health and Global Stability. **PLoS Pathogens**, v. 9, n. 7, p. 7–9, 2013.

MURATA, R. M. et al. Inhibition of *Streptococcus mutans* biofilm accumulation and development of dental caries in vivo by 7-epiclusianone and fluoride. **Biofouling**, v. 26, n. 7, p. 865–872, 2010a.

MURATA, R. M. et al. Inhibition of *Streptococcus mutans* biofilm accumulation and development of dental caries in vivo by 7-epiclusianone and fluoride. **Biofouling**, v. 26, n. 7, p. 865–872, 2010b.

NASCIMENTO, A. M. et al. Gastroprotective effect and structure of a rhamnogalacturonan from *Acmella oleracea*. **Phytochemistry**, v. 85, n. SEPTEMBER, p. 137–142, 2013.

NEWMAN HN, W. M. Dental plaque revisited. **Cardiff: Bioline**, p. 79–88, 1999.

NIU, C.; GILBERT, E. S. Colorimetric Method for Identifying Plant Essential Oil Components That Affect Biofilm Formation and Structure. **Society**, v. 70, n. 12, p. 6951–6956, 2004.

OJO, G. B. et al. Microanatomical effects of ethanolic extract of *Cola nitida* on the stomach mucosa of adult wistar rats. **African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines**, v. 7, n. 1, p. 47–52, 2010.

OLIVEIRA C, SCHENKEL E, GOSMANN G, PALAZZO J, MENTZ L, P. P. **Farmacognosia, da planta ao medicamento**. 2. ed. Porto Alegre: Ed. Universidade UFRGS, Ed. da UFSC, 1999.

PIZZO, G. et al. The effects of an essential oil and an amine fluoride/stannous fluoride mouthrinse on supragingival plaque regrowth.

Journal of periodontology, v. 79, n. 7, p. 1177–83, 2008.

QUINTAS, V. et al. In situ antimicrobial activity on oral biofilm: essential oils vs. 0.2 % chlorhexidine. **Clinical Oral Investigations**, p. 97–107, 2014.

RINCÓN MEJÍA, C. A. et al. Actividad antimicrobiana y análisis de la composición química de una fracción de las flores de *Acmella ciliata* (Kunth) Cass. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v. 20, n. 4, p. 409–418, 2015.

ROBERT KOCH. Bacteriological research. **Coagress, International Medical**, p. 380–383, 1890.

SAVIUC, C.-M. et al. Essential oils with microbicidal and antibiofilm activity. **Current pharmaceutical biotechnology**, v. 16, n. 2, p. 137–51, 2015.

SCHILLACI, D. et al. In vitro anti-biofilm activity of *Boswellia* spp. oleogum resin essential oils. **Letters in Applied Microbiology**, v. 47, n. 5, p. 433–438, 2008.

SIANI, A. C. et al. Evaluation of anti-inflammatory-related activity of essential oils from the leaves and resin of species of *Protium*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 66, n. 1, p. 57–69, 1999.

SILVEIRA, N. et al. A new alkamide with an endoperoxide structure from *Acmella ciliata* (Asteraceae) and its in vitro antiplasmodial activity.

Molecules, v. 21, n. 6, p. 1–10, 2016.

SIMAS, N. K. et al. Acetylenic 2-phenylethylamides and new isobutylamides from *Acmella oleracea* (L.) R. K. Jansen, a Brazilian spice with larvicidal activity on *Aedes aegypti*. **Phytochemistry Letters**, v. 6, n. 1, p. 67–72, 2013.

SLIEPEN, I. et al. Effect of mouthrinses on *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* biofilms in a hydrodynamic model. **Clinical Oral Investigations**, v. 14, n. 3, p. 241–250, 2010.

SOARES, C. P. et al. Effect of *Spilanthes acmella* hydroethanolic extract activity on tumour cell actin cytoskeleton. **Cell Biology International**, v. 38, n. 1, p. 131–135, 2014.

STEPHEN M. PAREL, P.I. BRANEMARK, T. J. Osseointegration in maxillofacial prosthetics. Part: intraoral applications. v. 55, n. 4, 1986.

STOEKEN, J. E.; PARASKEVAS, S.; VAN DER WEIJDEN, G. A. The long-term effect of a mouthrinse containing essential oils on dental plaque and gingivitis: a systematic review. **Journal of periodontology**, v. 78, n. 7, p. 1218–28, 2007.

SUBRAMANI, K. et al. Biofilm on Dental Implants: A Review of the Literature. **International Journal of Oral & Maxillofacial Implants**, v. 24, n.

4, p. 616–626, 2009.

TAKARADA, K. et al. A comparison of the antibacterial efficacies of essential oils against oral pathogens. **Oral Microbiology and Immunology**, v. 19, n. 1, p. 61–64, 2004.

VAN LEEUWEN, M. P. C.; SLOT, D. E.; VAN DER WEIJDEN, G. A. The effect of an essential-oils mouthrinse as compared to a vehicle solution on plaque and gingival inflammation: A systematic review and meta-analysis.

International Journal of Dental Hygiene, v. 12, n. 3, p. 160–167, 2014.

VAN STRYDONCK, D. A. C. et al. Effect of a chlorhexidine mouthrinse on plaque, gingival inflammation and staining in gingivitis patients: A systematic review. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 39, n. 11, p. 1042–1055, 2012.

VON FRAUNHOFER, J. A. et al. The effect of a mouthrinse containing essential oils on dental restorative materials. **General Dentistry**, v. 54, n. 6, p. 403–407, 2006.

WANG, S.-P. et al. Effect of anti-biofilm glass–ionomer cement on *Streptococcus mutans* biofilms. **International Journal of Oral Science**, v. 8, n. 2, p. 76–83, 29 abr. 2016.

WHO. Global Report on Surveillance: Antimicrobial Resistance. **World**

Health Organization, p. 1–7, 2014.

WU, L. C. et al. Anti-inflammatory effect of spilanthol from *Spilanthes acmella* on murine macrophage by down-regulating LPS-induced inflammatory mediators. **J Agric Food Chem**, v. 56, p. 2341–2349, 2008.