

Efeitos do chá de tomilho sobre a aderência in vitro de *Streptococcus mutans* ao esmalte dentário e *Candida albicans* à resina acrílica

Claunencil de Fátima Pires CARRETTO^a, Edna Aparecida Ferraz de Araujo NAVAS^a,

Thaís Cachuté PARADELLA^a, Luciane Dias de OLIVEIRA^b,

Juliana Campos JUNQUEIRA^b, Antonio Olavo Cardoso JORGE^b

^aPós-graduando em Biopatologia Bucal, Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal, Faculdade de Odontologia, UNESP, 12245-000 São José dos Campos - SP, Brasil

^bDepartamento de Biociências e Diagnóstico Bucal, Faculdade de Odontologia, UNESP, 12245-000 São José dos Campos - SP, Brasil

Carretto CFP, Navas EAFA, Paradella TC, Oliveira LD, Junqueira JC, Jorge AOC. Effects of the thyme tea on the adherence of *Streptococcus mutans* to dental enamel and *Candida albicans* to acrylic resin. Rev Odontol UNESP. 2007; 36(3):281-286.

Resumo: Objetivo: analisar in vitro os efeitos do chá de tomilho (*Thymus vulgaris* Linn.) sobre a aderência de *Streptococcus mutans* ao esmalte dentário e de *Candida albicans* à resina acrílica. Material e Método: foram confeccionados 30 corpos de prova de esmalte dentário humano e 30 corpos de prova de resina acrílica ativada quimicamente (15 do grupo Tomilho e 15 do grupo Controle). O chá de tomilho foi preparado com 10% de folhas de *Thymus vulgaris* Linn. em água destilada. Foram preparadas suspensões de microrganismos (10^6 células/mL) a partir de amostras padrão de *S. mutans* e *C. albicans*. O teste de aderência foi realizado colocando-se o corpo de prova em contato com o meio de cultura, a suspensão de microrganismo e o chá de tomilho ou água destilada (controle) por 24 horas a 37 °C. A seguir, os microrganismos aderidos aos corpos de prova foram dispersos, diluídos e semeados em meio de cultura para determinar o número de unidades formadoras de colônias (UFC.mL⁻¹). Os resultados foram analisados pelo teste *t* de Student (5%). Resultado: foi verificada significativa redução da aderência de *C. albicans* à resina acrílica no grupo Tomilho em relação ao grupo Controle ($p < 0,05$). Por outro lado, a aderência de *S. mutans* ao esmalte dentário foi semelhante nos grupos Tomilho e Controle ($p > 0,05$). Conclusão: o chá de tomilho foi efetivo em inibir a aderência de *C. albicans* à resina acrílica, não apresentando efeito sobre a aderência de *S. mutans* ao esmalte dentário.

Palavras-chave: *Candida albicans*; *Streptococcus mutans*; aderência celular.

Abstract: Objective: the purpose of this study was to analyze in vitro the effects of thyme tea (*Thymus vulgaris* Linn.) on the adherence of *Streptococcus mutans* to enamel and *Candida albicans* to acrylic resin. Material and Methods: thirty samples of human enamel and thirty samples of acrylic resin were made (15 of Thyme group and 15 Control group). Thyme tea was prepared with 10% leaves of *Thymus vulgaris* Linn. in distilled water. Standard suspensions (10^6 cells/mL) from standard samples of *S. mutans* and *C. albicans* were prepared. Adherence test was performed by putting the sample in contact with bacterial medium, the standard suspension, thyme tea or distilled water (control) for 24 hours at 37 °C. The microorganisms adhered to the samples were then dispersed, diluted and plated in bacterial medium to determine the number of cell forming units (CFU.mL⁻¹). Results were analyzed through Student's *t* test (5%). Results: it was verified a significant reduction of *C. albicans* adherence to acrylic resin in the Thyme group regarding the Control group ($p < 0.05$). On the other hand, the adherence of *S. mutans* to enamel was similar in both Thyme and Control group ($p > 0.05$). Conclusion: the thyme tea was effective in inhibiting *C. albicans* adherence to acrylic resin, however it did not present effect on the adherence of *S. mutans* to enamel.

Keywords: *Candida albicans*; *Streptococcus mutans*; cell adhesion.

Introdução

As propriedades anti-sépticas de plantas medicinais e aromáticas são reconhecidas desde a antiguidade, sendo utilizadas há milhares de anos na medicina popular para vários propósitos. Desde 1977, a Organização Mundial da Saúde (OMS) tem incentivado o estudo destas plantas, com o objetivo de avaliar cientificamente os benefícios e os riscos da utilização de medicamentos fitoterápicos. No entanto, faltam ainda evidências laboratoriais e clínicas sobre a eficácia e a segurança de seu emprego¹.

Thymus vulgaris Linn., popularmente conhecido como tomilho, é uma das plantas muito utilizadas na medicina popular. O óleo, considerado responsável pelas atividades atribuídas a essa planta, apresenta ações anti-séptica, expectorante, carminativa e antiespasmódica². A atividade biológica do óleo essencial de *Thymus vulgaris* Linn. está relacionada com seus principais constituintes, denominados timol e carvacrol. O timol tem demonstrado efeitos antibacterianos, antifúngicos e anti-helmínticos, enquanto o carvacrol tem sido investigado por seus efeitos bactericidas³.

Os efeitos antimicrobianos do tomilho foram observados por vários autores⁴⁻⁶. O extrato hidroalcoólico de *Tymus vulgaris* foi capaz de inibir o crescimento de *Candida albicans*⁵⁻⁶, *Aspergillus flavus*⁶, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus* spp.⁵, *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus*⁴. Além disso, Pina-Vaz et al.⁷ verificaram que o óleo essencial de *Tymus vulgaris* apresentou atividade antifúngica sobre várias espécies do gênero *Candida*, incluindo *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. guilhermondii* e *C. parapsilosis*.

Embora a atividade antimicrobiana do tomilho, tanto na forma de extrato como óleo essencial, tenha sido testada em vários microrganismos patogênicos, poucos estudos foram realizados para avaliar os efeitos do chá de tomilho sobre a aderência de microrganismos presentes na cavidade bucal.

Streptococcus mutans e *Candida albicans* são importantes patógenos relacionados com infecções bucais⁸. *C. albicans* é a espécie de levedura mais patogênica da cavidade bucal⁹, sendo a candidose bucal uma patologia freqüentemente encontrada em indivíduos portadores de prótese total. O número de indivíduos idosos na América Latina tem aumentado consideravelmente, mediante a melhora na expectativa de vida da população em geral¹⁰. Desse modo, patologias ligadas a indivíduos portadores de prótese total, como a candidose, também devem ter um aumento em sua prevalência, sendo fundamentais as pesquisas com elas relacionadas.

Estreptococos do grupo *mutans* são considerados os principais agentes etiológicos da cárie dentária, por suas propriedades acidogênica e acidúrica. Esses microrganismos favorecem a formação de grande quantidade de biofilme dentário e polissacarídeos intracelulares, que permitem a

produção de ácido, mesmo na ausência de fontes exógenas de sacarose¹¹⁻¹². A adesão de células bacterianas à superfície dos dentes é de fundamental importância para o início da lesão de cárie¹³.

O potencial anticariogênico de diversos alimentos e bebidas muitas vezes é atribuído à sua capacidade de alterar a biossíntese de polissacarídeos extracelulares, impedindo ou minimizando o potencial de adesão dos estreptococos¹⁴⁻¹⁵. Diversos estudos têm demonstrado atividade anticariogênica de diferentes extratos naturais, como chás verde e preto, cacau, própolis e café¹⁶⁻²¹. Estes extratos estão principalmente focados na inibição da síntese de polímeros extracelulares, alterando o desenvolvimento do biofilme dentário e, conseqüentemente, da cárie.

Limsong et al.²² investigaram *in vitro* os efeitos inibitórios de extratos de algumas ervas sobre a aderência de *S. mutans* à hidroxiapatita e verificaram que todos os extratos diminuíram a atividade da enzima glicosiltransferase, sendo o chá preto (*Camellia sinensis*) o maior inibidor, seguido por *Andrographis paniculata*, *Cassia alata* e *Harrisonia perforata*. Daglia et al.²³ estudaram os efeitos do café sobre as propriedades adesivas de *S. mutans* em corpos de prova de hidroxiapatita cobertos por saliva e verificaram importantes efeitos antiadesivos do café, fato comprovado por Landucci et al.¹⁵ e Cassanho et al.²¹.

Assim, sabendo-se da importância de *S. mutans* na cárie dentária e *C. albicans* na candidose bucal, o objetivo deste estudo foi avaliar *in vitro* os efeitos do chá de tomilho (*Thymus vulgaris* Linn.) sobre a aderência de *S. mutans* ao esmalte dentário e de *C. albicans* às superfícies de resina acrílica.

Material e método

Confecção dos corpos de prova

Esse estudo foi realizado de acordo com as diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisa envolvendo seres humanos, e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia do Campus de São José dos Campos/UNESP (protocolo nº 009/2006-PH/CEP).

Foram confeccionados 30 corpos de prova de esmalte dentário para o estudo da aderência de *S. mutans* (15 do grupo Tomilho e 15 do grupo Controle) e 30 corpos de prova de resina acrílica para avaliação da aderência de *C. albicans* (15 do grupo Tomilho e 15 do grupo Controle).

Os corpos de prova de esmalte dentário foram confeccionados a partir de 15 dentes terceiros molares humanos, recém-extraídos em clínicas odontológicas particulares e armazenados em solução fisiológica. As coroas receberam seções seriadas, utilizando-se disco diamantado montado em cortadeira de tecido duro (Labcut 1010 - Extec). Foram selecionados 30 corpos de prova de 6 mm x 5 mm (30 mm²).

Para padronizar o tamanho da superfície de esmalte exposta, os corpos de prova foram pintados com esmalte para unhas (Colorama, Brasil) deixando uma área de aproximadamente 16 mm² exposta, conforme metodologia de Cassanho et al.²¹.

Os corpos de prova de resina acrílica foram confeccionados com resina incolor quimicamente polimerizável (Clássico, Produtos Odontológicos Ltda) com 5 mm de diâmetro, utilizando-se matriz metálica. A seguir, foi realizado acabamento e polimento com lixa d'água de granulação 400 (3M, Campinas, Brasil).

Todos os corpos de prova (esmalte dentário e resina acrílica) foram colocados em recipientes de vidro contendo solução fisiológica e esterilizados em autoclave (121 °C/20 minutos), para posterior utilização.

Microrganismos

Foram utilizadas amostras de *S. mutans* (ATCC 35688) e *C. albicans* (F-72), provenientes do Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos/UNESP.

A amostra de *S. mutans* foi reativada em caldo infusão cérebro e coração (BHI, Difco, São Paulo) em microaerofilia a 37 °C, sendo repicada a cada 48 horas. Para utilização nos testes, essa amostra foi semeada em placas de BHI e incubada em microaerofilia a 37 °C por 48 horas. A amostra de *C. albicans* foi mantida em ágar-Sabouraud dextrose inclinado e repicada em placas de ágar Sabouraud dextrose, sendo incubada a 37 °C por 48 horas.

Para realização dos testes, foram preparadas suspensões de *S. mutans* e de *C. albicans* contendo 10⁶ células/mL em solução salina fisiológica. As suspensões foram padronizadas por análise em espectrofotômetro (Shimadzu modelo UV-1203, Kyoto, Japão), considerando comprimento de onda e densidade óptica, respectivamente, de 398 nm e 0,620 para *S. mutans* e 530 nm e 0,284 para *C. albicans*.

Preparo do chá de tomilho (Thymus vulgaris Linn.)

Foi preparado o chá de tomilho, por infusão, a partir das folhas secas de *Thymus vulgaris Linn.* (Santo Chá Produtos Naturais) em água destilada fervente (10 g de folhas para 100 mL de água). Após 15 minutos, o chá foi filtrado em papel de filtro quantitativo (0,00009 g, FRAMEX) e esterilizado por filtração em membrana de éster celulose de 0,22 µm (Millipore), sendo utilizado nos testes imediatamente após ter atingido a temperatura ambiente.

Avaliação da inibição da aderência de S. mutans e C. albicans

O teste de aderência foi realizado em ambiente estéril (câmara de fluxo laminar), utilizando-se placas de cultura de células de 24 poços (Costar Corning, New York, EUA).

Para avaliação da aderência de *S. mutans* foram colocados em cada poço da placa: um corpo de prova de esmalte dentário, 1 mL de caldo infusão cérebro e coração (BHI), 0,1 mL da suspensão de *S. mutans* e 1 mL do chá de tomilho ou água destilada (controle). Para avaliação da aderência de *C. albicans* foram colocados em cada poço: um corpo de prova de resina acrílica, 1 mL de caldo Sabouraud, 0,1 mL da suspensão de *C. albicans* e 1 mL do chá de tomilho ou água destilada (controle).

As placas foram tampadas e incubadas a 37 °C por 24 horas, sendo as placas com *S. mutans* mantidas em microaerofilia.

A seguir, os corpos de prova foram removidos, lavados e colocados em tubos de ensaio contendo 1 mL de solução fisiológica (NaCl 0,85%) e pérolas de vidro, sendo o conjunto agitado em um agitador de tubos (Vortex) por 60 segundos. Microrganismos que aderiram aos corpos de prova foram dispersos, diluídos 10 e 100 vezes e transferidos, em duplicata, para placas com ágar infusão cérebro e coração (BHI) acrescido de 10% de sacarose (*S. mutans*) ou placas de ágar Sabouraud dextrose (*C. albicans*). Após 48 horas de incubação a 37°C (microaerofilia apenas para *S. mutans*), o número de unidades formadoras de colônias (UFC/mL) foi determinado para cada espécime. As placas escolhidas para contagem foram aquelas que apresentavam entre 30 e 300 colônias.

Análise estatística

Os resultados da contagem de UFC.mL⁻¹ foram transformados em logaritmo (Log) e analisados estatisticamente através do teste *t* de Student com nível de significância de 5%, utilizando-se o software Minitab Inc. PA, USA.

Resultado

As médias de UFC.mL⁻¹ (Log) de *S. mutans* foram semelhantes entre os grupos Tomilho e Controle, não havendo diferença estatisticamente significativa entre eles ($p > 0,05$) (Tabela 1).

Em relação a *C. albicans*, a média de UFC.mL⁻¹ (Log) do grupo Tomilho foi menor do que o grupo Controle, sendo observada diferença estatisticamente significativa entre eles (Tabela 2).

Os dados da estatística descritiva para os testes de aderência de *S. mutans* e *C. albicans* estão apresentados na Tabela 3.

Discussão

O estudo de produtos fitoterápicos com capacidade de inibir o crescimento de microrganismos bucais tem sido alvo de estudos^{24,25}. Alguns produtos de origem vegetal, como malva, própolis e hortelã, têm sido incorporados com sucesso em dentifrícios e enxaguatórios bucais em muitos

Tabela 1. Números de UFC.mL⁻¹ (Log) de *S. mutans* que se aderiram ao esmalte dentário nos grupos Tomilho e Controle

Corpos de prova	Tomilho	Controle
1	4,79	5,90
2	5,79	5,76
3	5,93	5,93
4	5,91	5,45
5	5,74	4,30
6	4,92	4,07
7	5,59	4,74
8	5,61	6,19
9	5,85	4,41
10	5,89	4,43
11	5,83	5,93
12	4,75	5,65
13	6,10	5,97
14	5,99	5,10
15	5,77	5,00
Média ± desvio padrão	5,63 ± 0,44	5,25 ± 0,71

Não foi verificada diferença estatisticamente significativa entre os grupos p = 0,096

Tabela 2. Números de UFC.mL⁻¹ (Log) de *C. albicans* que se aderiram à resina acrílica nos grupos Tomilho e Controle

Corpos de prova	Tomilho	Controle
1	3,74	3,96
2	3,78	4,23
3	3,73	3,66
4	4,04	3,85
5	3,95	5,41
6	3,27	4,06
7	3,46	4,05
8	3,64	4,13
9	3,24	4,39
10	3,94	4,61
11	3,60	3,46
12	3,38	4,23
13	3,54	4,17
14	4,08	3,89
15	3,61	4,03
Média ± desvio padrão	3,67 ± 0,26	4,14 ± 0,46

Diferença estatisticamente significativa, p = 0,002

países²². A grande vantagem do uso desses produtos é a escassez de efeitos colaterais, sendo relatada apenas uma pequena ardência na mucosa, quando comparados aos produtos sintéticos²⁵.

Tabela 3. Estatística descritiva dos dados de UFC.mL⁻¹ (Log) obtidos na análise de aderência de *S. mutans* e *C. albicans*

	<i>S. mutans</i>		<i>C. albicans</i>	
	Tomilho	Controle	Tomilho	Controle
Médias	5,63	5,25	3,67	4,14
Desvio padrão	0,44	0,71	0,26	0,46
Mediana	5,79	5,45	3,64	4,06
Valor mínimo	4,75	6,10	3,24	3,47
Valor máximo	4,07	6,19	4,08	5,41

Neste trabalho, optou-se por estudar a ação de infusão de tomilho sobre a aderência de *S. mutans* ao esmalte dentário devido aos vários estudos que comprovaram a atividade inibitória do extrato hidroalcoólico do tomilho sobre bactérias, incluindo *S. mutans* e *S. sobrinus*⁴, *Pseudomonas aeruginosa* e *Proteus* spp.⁵. Dorman, Deans²⁶ também verificaram efeitos bactericidas do óleo essencial de *Thymus vulgaris* Linn. sobre *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* e *Bacillus subtilis*. Além disso, Inouye et al.²⁷ encontraram maior atividade antibacteriana do óleo essencial de tomilho para *Haemophilus influenzae*, seguido por *Streptococcus* (*S. pneumoniae* e *S. pyogenes*), *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. Por outro lado, Carvalho et al.²⁸ não encontraram atividade inibitória do extrato hidroalcoólico submetido à destilação fracionada em rotavapor com reidratação posterior de *Thymus vulgaris* Linn. sobre *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enteritidis* e *Enterococcus faecalis*.

Embora a atividade antibacteriana do tomilho sobre *Streptococcus* tenha sido demonstrada em vários trabalhos, no presente estudo o tomilho não foi capaz de inibir a aderência de *S. mutans* sobre o esmalte dentário, indicando que o tomilho pode ter ação sobre o crescimento do microrganismo, mas não sobre seus mecanismos de aderência aos tecidos bucais.

Poucos estudos relacionados com os efeitos do tomilho sobre a capacidade de aderência de *Streptococcus* foram desenvolvidos até o momento. Gebara et al.⁴ observaram que a tintura de *Thymus vulgaris* Linn. inibiu a aderência de *S. mutans* e *S. sobrinus* ao vidro. Provavelmente a diferença entre os resultados do estudo de Gebara et al.⁴ e os resultados do presente trabalho possam ser atribuídas às metodologias realizadas, pois neste estudo foi utilizado chá de tomilho e a aderência de *S. mutans* foi verificada ao esmalte dentário.

Candida albicans é um patógeno oportunista que pode causar infecções locais ou sistêmicas em indivíduos com fatores predisponentes, como portadores de próteses dentárias, diabetes e comprometimentos do sistema imunológico. A alta incidência de infecções fúngicas em pacientes com síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) e o desenvolvimento de resistência aos antifúngicos devido ao trata-

mento prolongado com esses medicamentos têm estimulado os pesquisadores a buscarem terapias alternativas como a fitoterapia para o tratamento da candidose^{29,30}.

Várias plantas medicinais têm sido estudadas para o tratamento da candidose, incluindo o tomilho. O extrato hidroalcoólico de *Thymus vulgaris* Linn. mostrou-se eficiente na inibição de *C. albicans* nos trabalhos de Nascimento et al.⁵ e Bonjar⁶.

A atividade do óleo essencial de tomilho sobre leveduras do gênero *Candida* também tem sido muito estudada, entretanto, faltam trabalhos na literatura relacionados à atividade antifúngica da infusão ou extratos hidroalcoólicos de tomilho. Giordani et al.²⁹ avaliaram os efeitos do óleo essencial de diversas plantas sobre *C. albicans*, incluindo *Thymus vulgaris* Linn., *Satureja Montana*, *Lavandula angustifolia*, *Lavandula hybrida*, *Syzygium aromaticum*, *Origanum vulgare* e *Rosmarinus officinalis*. O óleo essencial mais eficiente na inibição de *C. albicans* foi o de *Thymus vulgaris* Linn. Pina-Vaz et al.⁷ também encontraram forte efeito fungicida do óleo essencial de tomilho sobre todas as espécies de *Candida* estudadas, como *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. guilliermondii* e *C. parapsilosis*.

Por outro lado, a atividade anti-*Candida* do óleo essencial de tomilho foi considerada fraca em estudo de Duarte et al.³⁰, com Concentração Inibitória Mínima (CIM) de 2,0 mg.mL⁻¹. De acordo com a classificação proposta por Aligiannis et al.³¹ para plantas, a atividade anti-*Candida* é considerada forte para CIM até 0,5 mg.mL⁻¹, moderada para CIM entre 0,6 a 1,5 mg.mL⁻¹ e fraca para CIM acima de 1,6 mg.mL⁻¹.

Em relação aos efeitos antimicrobianos das plantas medicinais, é difícil comparar os resultados da literatura devido aos vários métodos de extração adotados e colheitas em épocas diferentes. Além disso, é importante considerar os diferentes testes microbiológicos utilizados e as diferentes sensibilidades das cepas³².

No presente estudo foi demonstrado que o chá de tomilho inibiu a aderência de *Candida albicans* à resina acrílica. A aderência de *C. albicans* ao acrílico e aos tecidos do hospedeiro é um importante fator de virulência desse microrganismo. A capacidade de aderência de *C. albicans* está intimamente relacionada com o grau de infecção que esse microrganismo pode causar⁹.

Raros trabalhos na literatura foram desenvolvidos para investigar os efeitos do tomilho ou outras plantas medicinais nos mecanismos de patogenicidade de *C. albicans*. Pina-Vaz et al.⁷ demonstraram que o óleo de *Thymus vulgaris* Linn. inibiu a formação de tubo germinativo de *C. albicans*, um importante fator de virulência desse microrganismo. A formação de tubos germinativos e hifas por *C. albicans* tem sido associada ao aumento da aderência às células epiteliais da mucosa³³ e à resistência aos fagócitos, devido às suas dimensões físicas³⁴.

Conclusão

Concluiu-se que o chá de tomilho inibiu a aderência de *C. albicans* à resina acrílica, mas não apresentou efeito sobre a aderência de *S. mutans* ao esmalte dentário.

Referências

1. Loguercio AP, Battistin A, Vargas AC, Henzel A, Witt NM. Atividade antibacteriana de extrato hidro-alcoólico de folhas de jambolão (*Syzygium cumini* (L.) Skells). *Cienc Rural*. 2005;35:371-6.
2. Simões CMO, Spitzer V. Óleos voláteis. In: Gosmann G, Mello JCP, Simões CMO, Schenkel EP. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. Porto Alegre: UFRGS; 2004. p.467-95.
3. Vieira de Melo SAB, Costa GMN, Garau R, Casula A, Pittau B. Supercritical CO₂ extraction of essential oils from *Thymus vulgaris* Linn. *Braz J Chem Eng*. 2000;17 (3) [cited 2007 Feb 5]. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-66322000000300014
4. Gebara ECE, Zardetto CGDC, Mayer MPA. Estudo in vitro da ação antimicrobiana de substâncias naturais sobre *S. mutans* e *S. sobrinus*. *Rev Odontol Univ São Paulo*. 1996;10:251-6.
5. Nascimento GGF, Locatelli J, Freitas PC, Silva GL. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. *Braz J Microbiol*. 2000;31:247-56.
6. Bonjar GH. Inhibition of clotrimazole-resistant *Candida albicans* by plants used in Iranian folkloric medicine. *Fitoterapia*. 2004;75(1):74-6.
7. Pina-Vaz C, Rodrigues AG, Costa-de-Oliveira S, Tavares C, Salgueiro L, Cavaleiro C, et al. Antifungal activity of *Thymus* oils and their major compounds. *J Eur Acad Denatol Venereol*. 2004;18(1):73-8.
8. Jorge AOC. *Microbiologia bucal*. São Paulo: Ed. Santos; 1998.
9. Akpan A, Morgan R. Oral candidiasis. *Postgrad Med J*. 2002;78(922):455-9.
10. Colussi CFF, Torres SF. Aspectos epidemiológicos da saúde bucal do idoso no Brasil. *Cad Saúde Pública*. 2002;18:1313-20.
11. Castro AM, Mochido MEFI, Novaes MSP, Perez RLW. *Streptococcus mutans* na cavidade bucal de bebês e sua relação com a cárie dentária. *Rev CROMG*. 2000;6(1):24-7.
12. Nakano K, Nomura R, Nakagawa I, Hamada S, Ooshima T. Role of glucose side chains with serotype-specific polysaccharide in cariogenicity of *Streptococcus mutans*. *Caries Res*. 2005;39:262-85.
13. Newbrun E. Control of dental caries. *South Med J*. 1977;70:1161-4.

14. Kashket S, Paolino VJ, Lewis DA, vanHoute J. In vitro inhibition of glucosyltransferase from the dental plaque bacterium *Streptococcus mutans* by common beverages and food extracts. Arch Oral Biol. 1985;30:821-6.
15. Landucci LF, Oliveira LD, Brandão EH, Koga-Ito CY, Gaett-Jardim JE, Jorge AOC. Efeitos de *Coffea arabica* sobre a aderência de *Streptococcus mutans* à superfície de vidro. Cienc Odontol Bras. 2003;6:58-62.
16. Lee ENC, Vono AZ, Pinheiro CE, Bijella MFTB, Silva SMB. Efeito do mate e do chá, comparado ao flúor, na prevenção da cárie em ratos. Estomatol Cult. 1986;16:17-22.
17. Elvin-Lewis M, Vitale M, Kopjas J. Anticariogenic potential of commercial teas. J Prev Dent. 1980;6:273-84.
18. Featherstone JDB. The science and practice of caries prevention. J Am Dent Assoc. 2000;131:887-99.
19. Hamilton-Miller JM. Anti-cariogenic properties of tea (*Camellia sinensis*). J Med Microbiol. 2001;50:299-302.
20. Matsumoto M, Minami T, Sasaki H, Sobue S, Hamada S, Ooshima T. Inhibitory effects of oolong tea extract on caries - inducing properties of *Mutans streptococci*. Caries Res. 1999;33:441-5.
21. Cassanho ACA, Oliveira LD, Brandão EHS, Landucci LF, Koga-Ito CY, Jorge AOC. Efeitos de diferentes soluções de café sobre a aderência de *Streptococcus mutans* às superfícies de esmalte e dentina [resumo Ib051] Pesqui Odontol Bras. 2005;19(Supplement): 73.
22. Limsong J, Benjavongkulchai E, Kuyatanasuchati J. Inhibitory effect of some herbal extracts on adherence of *Streptococcus mutans*. J Ethnopharmacol. 2004;92:281-9.
23. Daglia M, Tarsi R, Papetti A, Dacarro C, Pruzzo C, Gazzanni G. Antiadhesive effect of green and roasted coffee on *Streptococcus mutans* adhesive properties on saliva-coated hydroxyapatite beads. J Agric Food Chem. 2002;50:1225-9.
24. Wu-Yuana CD, Chen CY, Wu RT. Gallotannins inhibit growth, water-insoluble glucan synthesis, and aggregation of *mutans streptococci*. J Dent Res. 1988;67(1):51-5.
25. Drumond MRS, Castro RD, Almeida RVD, Pereira MSV, Padilha WVN. Estudo comparativo *in vitro* da atividade antibacteriana de produtos fitoterápicos sobre bactérias cariogênicas. Pesq Bras Odontoped Clin Integr. 2004;4(1):33-8.
26. Dorman HJD, Deans SG. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. J Appl Microbiol. 2000;88:308-16.
27. Inouye S, Yamaguchi H, Tarizawa T. Screening of the antibacterial effects of a variety of essential oils on respiratory tract pathogens, using a modified dilution assay method. J Infec Chemother. 2001;7(4):251-4.
28. Carvalho HHC, Cruz FT, Wiest JM. Atividade antibacteriana em plantas com indicativo etnográfico condimentar em Porto Alegre, RS/Brasil. Rev Bras Pl Med. 2005;7(3):25-32.
29. Giordani R, Regli P, Kaloustian J, Mikail C, Abou L, Portugal H. Antifungal effect of various essential oils against *Candida albicans*. Potentiation of antifungal action of amphotericin B by essential oil from *Thymus vulgaris* Linn. Phytother Res. 2004;18:990-5.
30. Duarte MC, Figueira GM, Sartoratto A, Rehder VL, Delarmelina C. Anti-*Candida* activity of Brazilian medicinal plants. J Ethnopharmacol. 2005;97:305-11.
31. Aligiannis N, Kalpoutzakis E, Mitaku S, Chinou IB. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. J Agric Food Chem. 2001;40:4168-70.
32. Tampieri MP, Galuppi R, Macchioni F, Carelle MS, Falcioni L, Cioni PL, Morelli I. The inhibition of *Candida albicans* by selected essential oils and their major components. Mycopathol. 2005;159:339-45.
33. Kimura LH, Pearsall NN. Relationship between germination of *Candida albicans* and increased adherence to human buccal epithelial cells. Infect Immun. 1980;28:464-8.
34. Samaranayake YU, Samaranayake LP. Experimental oral candidiasis in animal models. Clin Microbiol Rev. 2001;14:398-429.