

Atividade antibacteriana da *Lippia sidoides* Cham contra periodontopatógenos: estudo In vitro

Antibacterial activity of *Lippia sidoides* Cham against periodontopathogens: an in vitro study

Actividad antibacteriana de *Lippia sidoides* Cham frente a periodontopatógenos: estudio in vitro

Recebido: 18/02/2022 | Revisado: 25/02/2022 | Aceito: 09/05/2022 | Publicado: 14/05/2022

Isabel Celeste Caires Pereira Gusmão

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4492-530X>

Universidade Federal da Paraíba, Brasil

E-mail: gusmao.isabel@yahoo.com.br

Matheus Melo Pithon

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8418-4139>

Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Brasil

Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil

E-mail: matheuspithon@gmail.com

Alessandra Estevam dos Santos

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0973-6685>

Universidade Federal da Paraíba, Brasil

E-mail: alessandra_estevam@hotmail.com

Tainá Souza Silva

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1453-7111>

Instituto federal de Educação Ciência e Tecnologia, Brasil

E-mail: taina.farmacia@gmail.com

Fabio Correia Sampaio

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2870-5742>

Universidade Federal da Paraíba, Brasil

E-mail: fcsampaio@gmail.com

Resumo

O objetivo desse estudo foi avaliar a susceptibilidade antimicrobiana do óleo essencial da *Lippia sidoides* Cham, frente a *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* ATCC 29522 e *Porphyromonas gingivalis* ATCC 0644. A atividade antimicrobiana do óleo da *L. sidoides* Cham extraídos de folhas e flores e dos constituintes timol e carvacrol através da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e determinação bactericida mínima (CBM) frente aos periodontopatógenos *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (ATCC), *Porphyromonas gingivalis* (ATCC). Resultados: revelaram que a CIM registrado foi de 44,23 a 39,3 mg/mL para o timol e 28,45 a 28,15 mg/mL para carvacrol. Estas concentrações foram consideradas bactericidas quando a CBM foi avaliada. Todas as substâncias analisadas apresentaram efeito sinérgico em associação com a clorexidina. Dessa forma pode-se concluir que a *Lippia sidoides* Cham foi eficaz para inibir o crescimento in vitro das bactérias periodontopatógenicas apresentando, portanto, potencial biotecnológico para uso na área de odontologia.

Palavras-chave: Clorexidina; Periodontia; Doenças periodontais.

Abstract

The aim of this study was to evaluate the antimicrobial susceptibility of essential oil from *Lippia sidoides* Cham, against *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* ATCC 29522 and *Porphyromonas gingivalis* ATCC 0644. The antimicrobial activity of *L. sidoides* Cham oil extracted from leaves and flowers and the constituents thymol and carvacrol through Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and minimal bactericidal determination (CBM) against periodontopathogens *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (ATCC), *Porphyromonas gingivalis* (ATCC). The results revealed that the MIC recorded was 44.23 to 39.3 mg/mL for thymol and 28.45 to 28.15 mg/mL for carvacrol. These concentrations were considered bactericidal when CBM was evaluated. All analyzed substances showed a synergistic effect in association with chlorhexidine. Thus, it can be concluded that *Lippia sidoides* Cham was effective in inhibiting the in vitro growth of periodontopathogenic bacteria, presenting, therefore, biotechnological potential for use in the field of dentistry.

Keywords: Chlorhexidine; Periodontics; Periodontal diseases.

Resumen

El objetivo de este estudio fue evaluar la susceptibilidad antimicrobiana del aceite esencial de *Lippia sidoides* Cham frente a *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* ATCC 29522 y *Porphyromonas gingivalis* ATCC 0644. La actividad

antimicrobiana del aceite de *L. sidoides* Cham extraído de hojas y flores y los constituyentes timol y carvacrol a través de la Concentración mínima inhibitoria (MIC) y determinación bactericida mínima (MBC) frente a los periodontopatógenos *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (ATCC), *Porphyromonas gingivalis* (ATCC). Resultados: revelaron que la CIM registrada fue de 44,23 a 39,3 mg/mL para timol y de 28,45 a 28,15 mg/mL para carvacrol. Estas concentraciones se consideraron bactericidas cuando se evaluó el CBM. Todas las sustancias analizadas mostraron un efecto sinérgico en asociación con la clorhexidina. Por lo tanto, se puede concluir que *Lippia sidoides* Cham fue eficaz para inhibir el crecimiento in vitro de bacterias periodontopatógenas, presentando, por tanto, potencial biotecnológico para su uso en odontología.

Palabras clave: Clorhexidina; Periodoncia; Enfermedades periodontales.

1. Introdução

A doença periodontal é definida como uma inflamação dos tecidos que suportam os dentes (cimento, osso e ligamento) iniciada por um desequilíbrio entre o crescimento bacteriano e o sistema imune do hospedeiro (Woo et al. 2021). O diagnóstico é baseado no sangramento presente, formação da bolsa periodontal e comprometimento do ligamento que sustenta o dente levando a mobilidade dental. A patogênese é mediada pela resposta inflamatória a bactérias no biofilme dental. Durante o desenvolvimento da infecção, produtos metabólicos das bactérias periodontopatógenas e a liberação de mediadores inflamatórios danificam o tecido na tentativa de combater o processo inflamatório e subsequente reparo tecidual (Figueredo et al. 2019).

Porphyromonas gingivalis, *Treponema denticola*, *Tannerella forsythia*, *Prevotella intermedia*, *Fusobacterium nucleatum*, *Selenomonas noxia*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* são frequentemente isoladas a partir de biofilmes dentários de pacientes com periodontopatias e são consideradas patógenos específicos da doença periodontal (Mendes et al. 2020).

Através das descobertas científicas tem surgido fármacos oriundos de ervas medicinais para combate a infecções periodontais (Smith & Baumgarth, 2019). O uso de plantas está aumentando continuamente em decorrência da sua eficácia e menor possibilidade de efeitos colaterais em comparação a fármacos sintéticos (Ben Arfa et al. 2006). As plantas demonstram eficiência contra infecções bacterianas, antifúngicas, antivirais e antiparasitárias incluindo doença periodontal (Mendes et al. 2020).

Lippia sidoides Cham, popularmente conhecida como alecrim-pimenta é corriqueiramente utilizada no tratamento de diversas patologias (Morão et al. 2016). Alguns estudos apontam que a *L. sidoides* Cham exerce efeitos anti-inflamatórios e antimicrobianos (Botelho et al. 2007) sendo amplamente utilizada na medicina tradicional apresentando várias atividades biológicas (Araújo et al. 2020).

A *Lippia sidoides* Cham é encontrada no Nordeste do Brasil onde é usada no tratamento de afecções da pele, picada de insetos, dor de garganta (Melo et al. 2014). Produz óleo essencial rico em timol e carvacrol que apresenta potente atividade antimicrobiana contra fungos, bactérias e protozoários (Botelho et al. 2007). Os monoterpenos, diterpenos, triterpenos e compostos fenólicos que são encontrados na *L. sidoides* Cham desenvolvem ação antimicrobiana para diversos patógenos (Alexa et al. 2018).

Apesar desses relatos ainda não existe evidências do potencial do óleo essencial da *Lippia sidoides* Cham, frente a *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* ATCC 29522 e *Porphyromonas gingivalis* ATCC 0644. Partindo desse pressuposto propor-se o presente estudo o qual avaliou a susceptibilidade antimicrobiana do óleo essencial da *Lippia sidoides* Cham, frente a *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* ATCC 29522 e *Porphyromonas gingivalis* ATCC 0644. Para tal utilizou-se diferentes abordagens como: determinação da concentração inibitória mínima (MIC) concentração bactericida mínima (CBM), microscopia confocal, microscopia de transmissão e varredura para investigar o efeito do OELS na morfologia bacteriana.

2. Metodologia

Extrato bruto, frações e metabólitos

Lippia sidoides Cham foi colhida no período de floração de 2014 a 2018 das 08:00 as 10:00 da manhã. A exsicata foi incorporada sob o número JPB 47237. Das partes aéreas da *L. sidoides* Cham foi extraído o óleo por arraste a vapor utilizando o um mini destilador de óleos essenciais (Modelo D2-v5.2- Linax) armazenado a 4°C até a análise. A identificação dos constituintes foi submetido a Cromatografia Gasosa, acoplada a Espectrometria de Massa – CG-EM (modelo GC17A) utilizando coluna capilar RTX-5MS (5% Difenil, 95% dimetil polisiloxano. Com base na cromatografia as substâncias foram então combinadas fornecendo substâncias puras e identificadas por ¹H e ¹³C RMN3. As amostras foram utilizadas para determinação da concentração inibitória mínima (CIM) concentração bactericida mínima (CBM) e concentração inibitória fracionada (FICI).

Cepas Bacterianas

Foram utilizadas linhagens bacterianas padronizadas a 530 nm o que equivale a 0,5 da escala McFarland $\approx 1,5 \times 10^8$ UFC/mL de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* ATCC 29522 e *Porphyromonas gingivalis* ATCC 0644. Para a ativação, foram inoculados caldo BHI (Brain Heart Infusion HiMedia Laboratories Pvt.) Ltd., Maharashtra, Índia) suplementado com solução de Hemina 5 mg/mL (Sigma®), extrato de levedura 0,005 mg/mL (Acumedia®) e solução de menadiona 1 mg/mL (Sigma®) a 37°C, por /48h.

Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e concentração Bactericida Mínima (CBM)

A CIM foi determinada em triplicata pela técnica de microdiluição em caldo usando placa de 96 poços (Freires et al. 2018). As amostras foram preparadas em concentrações variando de 7 a 180 mg/mL com modificações, 100µL da substância teste (óleo da *L. sidoides* Cham, carvacrol e timol) e 20 µL de inóculo foram dispensados em cada poço. As bactérias foram incubadas em condições de anaerobiose por 48 hs com 5% ou 10% de H₂ e 10% de CO₂. Depois disso, 35 µL da resazurina em solução aquosa de (0,02%) foi adicionado em cada poço para indicar a viabilidade celular dos microrganismos. Antes de adicionar a resazurina, foi removido de cada poço 10 µL e semeado em BHI ágar suplementado com 5% de sangue de carneiro desfibrinado e hemina (5 mg/mL, Sigma, St. Louis, MO, USA) e menadiona) e 1mg/mL de menadiona (Sigma). As placas foram incubadas como descrito anteriormente. A concentração bactericida mínima foi definida como a menor concentração da amostra onde não ocorreu crescimento bacteriano.

Determinação da Concentração Inibitória Fracionada

O índice de Concentração Inibitória Fracionada (FICI) foi determinado por microdiluição em placa de 96 poços também conhecido como “checkboard” que contem diluições seriadas das amostras e clorexidina testada sozinha ou em combinação. As bactérias foram cultivadas nas mesmas condições citadas anteriormente. Depois da incubação 30 µL de resazurina a 0.02% (Sigma, St Louis, Mirrouri, USA) foi adicionado em cada poço para revelar o crescimento microbiano. A cor azul indica que não há crescimento bacteriano e rosa indica crescimento bacteriano. A interpretação é baseada nos critérios descrita por Lewis et al (2002) que define ação sinérgica quando FICI é ≤ 5 , aditivo quando FICI variar de > 0.5 a 1, indiferente quando FICI variar de 1.0 a 4.0 e antagônico quando FICI for >4.0 .

3. Resultados

Composição Química do OELS

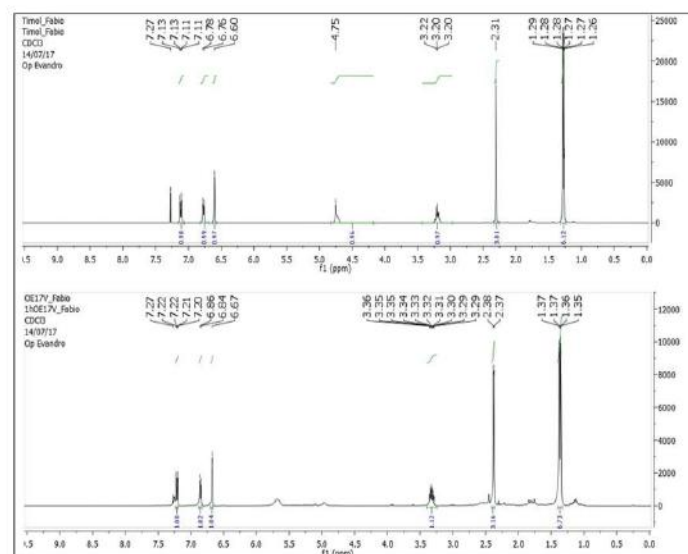
Na Tabela 1 é apresentada o resultado referente a composição química do OELS. A CG-MS identificou o timol (70,77%) sendo o composto majoritário, seguido de p-cimeno (5,33%), γ -terpineno (2,38%) e β -mirceno (1,68%). A formação dos produtos foi confirmada através da análise de espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono (^1H e ^{13}C) apresentando três sinais de compostos aromáticos de um duplo dubleto em δ_{H} 7,13, um dubleto em δ_{H} 6,78, um singlete em δ_{H} 6,60, um sinal em δ_{H} 4,72, característico de hidrogênio de hidroxila; dois múltiplos em δ_{H} 3,22 e δ_{H} 1,29 de hidrogênio e carbono (6H, H-9 e H-10), característicos de grupo isopropil; e um singlete em δ_{H} 2,31 (3H; H-7), característico de metila ligada ao anel aromático (Figura 1).

Tabela 1. Análise da Composição Química do Óleo essencial extraído da planta *Lippia sidoides* Cham.

Componente	Tempo de Retenção (min.)	Concentração (%)
α -Tujeno	4226	1,03
α -Pino	4373	0,33
β -Mirceno	5430	1,64
Terpinoleno	6045	0,88
p-Cimeno	6233	5,52
D-Limoneno	6336	0,30
Eucaliptol	6416	0,60
β -Ocimeno	6785	0,41
γ -Terpineno	7131	2,37
Cis-beta-Terpineol	7392	0,35
β -Linalol	8421	0,34
Ipsidienol	10362	1,03
Terpinen-4-ol	12059	0,48
Timol metil éter	16069	0,47
Timol	22031	70,77
Carvacrol	23839	0,38
E-Cariofileno	25014	6,29
α -Humuleno	25510	0,35
Germacreno B	26050	1,14
β -Bisaboleno	26142	0,49
Óxido de Cariofileno	26954	0,30

Fonte: Autores.

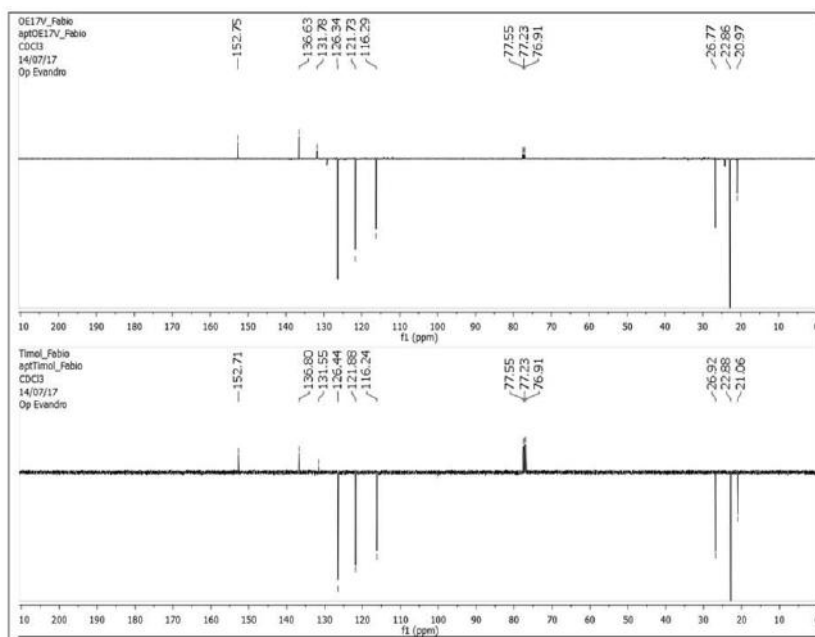
Figura 1. Espectro de RMN ^1H (CDCL₃, 400 MHZ) do óleo da *L.sidoides* Cham e do timol na região de 0,0 a 9,5 mhz.



Fonte: Autores.

O espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) também corroborou a presença do timol, ao apresentar seis sinais característicos de carbonos aromáticos, sendo três metínicos (δ_{C} 126,44; 121,88; 116,24) e três não hidrogenados (δ_{C} 152,71; 136,80; 131,55); dois sinais em δ_{C} 26,92, para um carbono; e em δ_{C} 22,88, para 2 carbonos, atribuídos ao grupo isopropil; e um sinal em δ_{C} 21,06, atribuído a metila ligada ao anel aromático (Figura 2).

Figura 2. Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) do óleo de *L. sidoides* Cham e timol.



Fonte: Autores.

Como pode ser observado na Tabela 2 ocorreu uma ação inibitória do OELS, do timol, carvacrol frente a *A. actinomycetemcomitans* e *Porphyromonas gingivalis*. A CIM do OELS, timol e carvacrol variaram de 44,23 mg/mL a 28,45 mg/mL para *A. actinomycetemcomitans* e 39,30 mg/mL a 28,15 mg/mL para *Porphyromonas gingivalis*.

Tabela 2. Atividade Antimicrobiana *L. sidoides* Cham para Concentração Inibitória Mínima da *A. actinomycetemcomitans* e *P. gingivalis* em mg/mL.

Produtos	<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	<i>Porphyromonas gingivalis</i>
Oels	44,23	39,30
Timol	48,25	28,15
Carvacrol	28,45	28,15
Clorexidina	0,042	0,053

CLX = Clorexidina

Fonte: Autores.

Os resultados da FICI apontaram um efeito sinérgico para o óleo combinado com todas as amostras para os microrganismos periodontopatogênicos. Os valores variaram de 0,015 a 0,25 mg/mL com o OELS e a clorexidina, 0,014 a 0,12

mg/mL do timol e clorexidina, 0,03 a 0,12 mg/mL com o carvacrol e clorexidina respectivamente frente *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* e *Porphyromonas gingivalis* (Tabela 3).

Tabela 3. Índice de Concentração Inibitória Fracionária (FICI) da *L. sidoides* Cham com timol, carvacrol e clorexidina contra periodontopatogenos de acordo com o critério de Lewis et al 2002.

Produtos	<i>Aggregatibacter</i>	<i>Porphyromonas</i>	
	<i>Actinomycetemcomitans</i>	<i>gingivalis</i>	
Oels	44,23	39,30	sinérgico
Timol	48,25	28,15	sinérgico
Carvacrol	28,45	28,15	sinérgico
Clorexidina	0,042	0,053	sinérgico

—
OELS= óleo essencial *Lippia sidoides* Cham
CLX= Clorexidina

Fonte: Autores.

4. Discussão

Estudos avaliando produtos derivados de plantas medicinais tem demonstrado resultados satisfatórios quanto a eficácia antimicrobiana (Aryal et al. 2021). No presente estudo avaliou-se o efeito antimicrobiano in vitro do óleo da *L. sidoides* Cham e seus constituintes timol e carvacrol contra patógenos periodontais. Os ensaios de MIC são extensivamente aplicados para testes de atividade de ação antimicrobiana de plantas medicinais (Mendes et al. 2020; Wijesundara & Rupasinghe, 2019; Olmedo-Juarez et al. 2019).

Alves et al, (2017) sugeriu que esses ensaios são as melhores maneiras para assegurar a atividade antimicrobiana de produtos naturais quando se compara a outras técnicas. Os dados deste estudo evidenciaram que o óleo essencial e seus principais constituintes fenólicos timol e carvacrol mostraram um bom efeito antimicrobiano contra bactérias periodontopatogênicas.

Mendes et al, (2020) observou um efeito inibitório e bactericida de *Salvia officinalis* na *A. actinomycetemcomitans* ATCC de 3.12 e 6.25 µg/mL respectivamente. Diversos agentes naturais e sintéticos como clorexidina e substâncias derivadas do fenol tem sido utilizado na odontologia como forma terapêutica para inibir o crescimento microbiano e assim prevenir doenças odontológicas (Sampaio et al. 2020; Couto De Oliveira et al. 2013; Pithon et al. 2013). A ação do óleo essencial e de seus componentes é atribuído ao rompimento da membrana citoplasmática (Khruengsai et al. 2021; Ginting et al. 2021). As propriedades hidrofóbicas predominantes nos compostos timol e carvacrol permitem interações específicas com as bactérias desestabilizando a membrana celular dos organismos (Khruengsai et al. 2021).

Botelho e Fontenelle 2007, observaram em seus estudos que a atividade antimicrobiana do óleo da *L. sidoides* Cham é atribuída a presença do timol e carvacrol. Acredita-se que os óleos essenciais exercem efeitos como: a perturbação da membrana citoplasmática pela interferência na bicamada fosfolipídica da parede celular; aumento da permeabilidade e perda dos constituintes celulares e alteração de uma variedade de sistemas enzimáticos, incluindo aqueles envolvidos na produção de energia celular e síntese de componentes estruturais ou por inativação e destruição do material genético, resultando em perda do controle quimiosmótico da célula afetada, levando a morte bacteriana (Carvalho et al. 2016).

Segundo Barbosa et al, (2017) a atividade antimicrobiana não se deve somente à presença dos compostos majoritários dos óleos essenciais, mas da presença de outros componentes em menores concentrações que podem promover interações

sinérgicas, cita-se como exemplo o p-cimeno que sozinho não tem efeito antibacteriano se usado sozinho, mas quando combinado com carvacrol, facilita o transporte do carvacrol por meio da membrana citoplasmática para o interior da célula bacteriana.

Para as combinações realizadas com a clorexidina e OELS e seus constituintes timol e carvacrol frente as bactérias em estudo apresentaram sinergismo. De acordo com Rosato et al, 200724, o efeito sinérgico envolve enzimas, proteínas de transporte, canais iônicos, ribossomos e mecanismos físico-químicos e proteínas transportadoras. Contudo, é difícil elucidar o mecanismo exato do efeito sinérgico sem maiores investigações, daí surgiu a necessidade de maiores investigações as quais foram realizadas como CG-Massa e Ressonância Magnética Nuclear.

Em estudos de Batista et al. (2018) avaliaram a atividade antimicrobiana *in vitro* do óleo da *L.sidoides* contra *Streptococcus agalactiae*, constatando sua atividade antimicrobiana com concentração inibitória mínima (CIM) de 312,5 µg mL⁻¹ e concentração bactericida mínima (CBM) de 416,7 µg mL⁻¹.

Marangoni et al, (2018) testaram três diterpenos observando uma boa ação antimicrobiana contra *P.nigrescens*, *P.intermedia*, *P.gingivalis* e *A. actinomycetemcomitans* isolados de cepas clínicas em que o composto inibiu até 50% com CIM variando de 6.25 to 25 mg/mL. Enquanto que, Moreti et al, (2017) observaram em seus estudos a ação de diterpeno em antibiofilme do extrato de *Mikania glomerata* contra *A. actinomycetemcomitans* ATCC 43717 e *P.gingivalis* 3.12, e 200 µg/mL.

No presente estudo, as análises dos resultados dos monoterpenos revelaram valores de 48,25 a 28,15 mg/mL para ação do timol, contra *A. actinomycetemcomitans* e *P.gingivalis* e o carvacrol de 28,45 a 28,15 mg/mL respectivamente para os mesmos microrganismos. Também a FICI foi determinada seguindo os padrões da CLSI, sendo combinado os agentes antimicrobianos timol e carvacrol com a clorexidina.

Maragoni et al, (2018) concluíram que a clorexidina combinada com dois ou três diterpenos atuam sinergicamente contra *P. gingivalis* (ATCC 33277). Segundo Dorman e Deans, (2000) as atividades biológicas dos óleos essenciais podem estar relacionadas com sua composição assim como com configuração dos seus componentes apresentando interações sinérgicas entre os componentes.

Estudos dos componentes de OE mostraram que as moléculas fenólicas tais como carvacrol, eugenol e timol são altamente ativos contra vários microrganismos e a atividade antimicrobiana desses monoterpenos ocasiona dano na membrana celular das bactérias (Xu et al. 2020). Vários estudos têm mostrado que o timol sozinho ou juntos com outros metabólitos tem potente atividade antimicrobiana, antifúngica, antiparasitária (Nagoor Meeran et al. 2017).

Embora o timol e carvacrol tenham mostrado potente antimicrobiano, o presente estudo é o primeiro a demonstrar a atividade antimicrobiana da *Lippia sidoides* Cham em bactérias periodontopatogênicas. A determinação do mecanismo de ação dos óleos essenciais não é fácil, porque a atividade antimicrobiana geralmente não é o resultado de um único mecanismo, mas sim uma cascata de reações envolvendo toda a célula bacteriana.

Para Nazarro et al, (2013) o efeito antimicrobiano dos óleos essenciais pode ser diferente a depender do constituinte da amostra em análise, em que o mesmo constituinte em baixa concentração pode atuar como inibidor de enzima enquanto que altas concentrações pode atuar na desnaturação de proteínas. Contudo, outros efeitos são atribuídos aos óleos essenciais como degradação da parede celular e danos nas proteínas da membrana.

5. Conclusão

Conclui-se que o óleo essencial da *Lippia sidoides* Cham tem atividade antimicrobiana frente a *A. actinomycetemcomitans* e *P.gingivalis* devido aos maiores constituintes que são timol e p-cimeno, podendo ser atribuído a danos na parede celular e membrana citoplasmática.

Referências

- Alexa, E., Sumalan, R. M., Danciu, C., Obistoiu, D., Negrea, M., Poiana, M. A., et al. (2018) Synergistic Antifungal, Allelopathic and Anti-Proliferative Potential of *Salvia officinalis* L., and *Thymus vulgaris* L. Essential Oils. *Molecules*. 16;23 (1).
- Alves, F. C. B., Barbosa, L. N., Andrade, B., Albano, M., Furtado, F. B., Marques Pereira, A. F., et al.(2016). Short communication: Inhibitory activities of the lantibiotic nisin combined with phenolic compounds against *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* in cow milk. *Journal of dairy science*. 99 (3):1831-6.
- Araujo, M. J. C., Camara, C., Moraes, M. M., & Born, F. S. (2020) Insecticidal properties and chemical composition of *Piper aduncum* L., *Lippia sidoides* Cham. and *Schinus terebinthifolius* Raddi essential oils against *Plutella xylostella* L. *Anais da Academia Brasileira de Ciencias*. 2020;92 (suppl 1):e20180895.
- Aryal, B., Niraula, P., Khadayat, K., Adhikari, B., Khatri Chhetri, D., Sapkota, B. K., et al. (2021) Antidiabetic, Antimicrobial, and Molecular Profiling of Selected Medicinal Plants. *Evidence-based complementary and alternative medicine* : eCAM2021:5510099.
- Barbosa, R., Cruz-Mendes, Y., Silva-Alves, K. S., Ferreira-da-Silva, F. W., Ribeiro, N. M., Morais, L. P., et al. (2017) Effects of *Lippia sidoides* essential oil, thymol, p-cymene, myrcene and caryophyllene on rat sciatic nerve excitability. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas*. 19;50 (12):e6351.
- Batista, E. S., Franmir, R. B., Majolo, C., & Kioshi, L. A. K. *Lippia alba* essential oil as anesthetic for tambaqui. *Aquaculture*. 495:545-9.
- Ben Arfa, A., Combes, S., Preziosi-Belloy, L., Gontard, N., & Chalier, P. (2006) Antimicrobial activity of carvacrol related to its chemical structure. *Letters in applied microbiology*. 43 (2):149-54.
- Botelho, M. A., Nogueira, N. A., Bastos, G. M., Fonseca, S. G., Lemos, T. L., Matos, F. J., et al. (2007) Antimicrobial activity of the essential oil from *Lippia sidoides*, carvacrol and thymol against oral pathogens. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas*. 40 (3):349-56.
- Carvalho, I. T., Estevinho, B. N., & Santos, L. (2016) Application of microencapsulated essential oils in cosmetic and personal healthcare products - a review. *International journal of cosmetic science*. 38 (2):109-19.
- Couto De Oliveira, G., Ferraz, C. S., Andrade Junior, C. V., & Pithon, M. M. (2013) Chlorhexidine gel associated with papain in pulp tissue dissolution. *Restorative dentistry & endodontics*. 38 (4):210-4.
- Dorman, H. J., & Deans, S. G. (2000) Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of applied microbiology*. 88 (2):308-16.
- Figueredo, C. M., Lira-Junior, R., & Love, R. M.(2019) T and B Cells in Periodontal Disease: New Functions in A Complex Scenario. *International journal of molecular sciences*. 14;20 (16).
- Freires, I. A., Santaella, G. M., de Cassia Orlandi Sardi, J., & Rosalen, P. L.(2018) The alveolar bone protective effects of natural products: A systematic review. *Archives of oral biology*. 87:196-203.
- Ginting, E. V., Retnaningrum, E., & Widiasih, D. A.(2021) Antibacterial activity of clove (*Syzygium aromaticum*) and cinnamon (*Cinnamomum burmannii*) essential oil against extended-spectrum beta-lactamase-producing bacteria. *Veterinary world*. 14 (8):2206-11.
- Khruengsai, S., Sripahco, T., Rujanapun, N., Charoensup, R., & Pripdeevech, P.(2021) Chemical composition and biological activity of *Peucedanum dhana* A. Ham essential oil. *Scientific reports*. 27;11 (1):19079.
- Maragoni, S. T., Moraes, S. H., Utrera, L. A., & Casemiro, M. G. M. (2018) Diterpenes of the pimarane type isolated from *Viguiera arenaria*: promising in vitro biological potential as therapeutic agents for endodontics. *Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy*. 10 (2):34-44.
- Melo, J. O., Fachin, A. L., Rizo, W. F., Jesus, H. C., Arrigoni-Blank, M. F., Alves, P. B., et al. (2014) Cytotoxic effects of essential oils from three *Lippia gracilis* Schauer genotypes on HeLa, B16, and MCF-7 cells and normal human fibroblasts. *Genetics and molecular research* : GMR 8;13 (2):2691-7.
- Mendes, F. S. F., Garcia, L. M., Moraes, T. D. S., Casemiro, L. A., Alcantara, C. B., Ambrosio, S. R., et al.(2020) Antibacterial activity of *salvia officinalis* L. against periodontopathogens: An in vitro study. *Anaerobe*. 63:102194.
- Morão, R. P., Almeida, A. C., Martins, E. R., & Prates, J. P.(2016) Constituintes Químicos e Princípios Farmacológicos do óleo Essencial de Alecrim Pimenta (*Lippia Origanoides*). *Revista Unimontes Científica*. 8 (1):1-8.
- Moreti, D. L. C., Leandro, L. F., da Silva Moraes, T., Moreira, M. R., Sola Veneziani, R. C., Ambrosio, S. R., et al.(2017) *Mikania glomerata* Sprengel extract and its major compound ent-kaurenoic acid display activity against bacteria present in endodontic infections. *Anaerobe*47:201-8.
- Nagoor Meeran, M. F., Javed, H., Al Tae, H., Azimullah, S., & Ojha, S. K. (2017) Pharmacological Properties and Molecular Mechanisms of Thymol: Prospects for Its Therapeutic Potential and Pharmaceutical Development. *Frontiers in pharmacology*. 8:380.
- Nazzaro, F., Fratianni, F., De Martino, L., Coppola, R., & De Feo, V. (2013) Effect of essential oils on pathogenic bacteria. *Pharmaceuticals*. 25;6 (12):1451-74.
- Nhu-Trang, T. T., Casabianca, H., & Grenier-Loustalot, M. F. (2006) Deuterium/hydrogen ratio analysis of thymol, carvacrol, gamma-terpinene and p-cymene in thyme, savory and oregano essential oils by gas chromatography-pyrolysis-isotope ratio mass spectrometry. *Journal of chromatography A*. 3;1132 (1-2):219-27.
- Olmedo-Juarez, A., Briones-Robles, T. I., Zaragoza-Bastida, A., Zamilpa, A., Ojeda-Ramirez, D., Mendoza de Gives, P., et al.(2019) Antibacterial activity of compounds isolated from *Caesalpinia coriaria* (Jacq) Willd against important bacteria in public health. *Microbial pathogenesis*. 136:103660.

Pithon, M. M., Santana, D. A., Sousa, K. H., & Farias, I. M. (2013) Does chlorhexidine in different formulations interfere with the force of orthodontic elastics? *The Angle orthodontist*. 83 (2):313-8.

Rosato, A., Vitali, C., Laurentis, N., Armenise, D., & Milillo, M. A. (2007) Antibacterial Effect of Some Essential Oils Administered Alone Or In Combination With Norfloxacin. *Phytomedicine : International journal of phytotherapy and phytopharmacology*. 14:727-32.

Sampaio, G. M., de Meneses, I. H., de Carvalho, F. G., Carlo, H. L., Munchow, E. A., Barbosa, T. S., et al.(2020) Antimicrobial, mechanical and biocompatibility analysis of chlorhexidine digluconate-modified cements. *Journal of clinical and experimental dentistry*. 12 (2):e178-e86.

Smith, F. L., & Baumgarth, N.(2019) B-1 cell responses to infections. *Current opinion in immunology*. 57:23-31.

Wijesundara, N. M., & Rupasinghe, H. P. V.(2019) Bactericidal and Anti-Biofilm Activity of Ethanol Extracts Derived from Selected Medicinal Plants against *Streptococcus pyogenes*. *Molecules*. 24;24 (6).

Woo, H. G., Chang, Y. K., Lee, J. S., & Song, T. J.(2021) Association of Periodontal Disease with the Occurrence of Unruptured Cerebral Aneurysm among Adults in Korea: A Nationwide Population-Based Cohort Study. *Medicina*. 30;57 (9).

Xu, J., Wu, C., Yang, Z., Liu, W., Chen, H., Batool, K., et al.(2020) For: Pesticide biochemistry and physiology recG is involved with the resistance of Bt to UV. *Pesticide biochemistry and physiology*. 167:104599.