

Atividade antimicrobiana e antibiofilme do óleo essencial de *Thymus vulgaris* frente *Streptococcus mutans*

Antimicrobial and antibiofilm activity of *Thymus vulgaris* essential oil against *Streptococcus mutans*

Actividad antimicrobiana y antibiopelícula del aceite esencial de *Thymus vulgaris* contra *Streptococcus mutans*

Recebido: 11/05/2026 | Aceito: 27/05/2026 | Publicado: 28/05/2026

Daniela Dalcin da Rosa

ORCID: <https://orcid.org/0009-0007-2245-9719>
Universidade Federal de Santa Maria, Brasil
E-mail: darosadalcin@gmail.com

Ticiane da Rosa Pinheiro

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4511-6483>
Universidade Federal de Santa Maria, Brasil
E-mail: ticianerp@yahoo.com.br

Érika Dalcin da Rosa

ORCID: <https://orcid.org/0009-0004-8863-045X>
Universidade Federal de Santa Maria, Brasil
E-mail: erikadalcin93@gmail.com

Diane de Oliveira Carnelosso

ORCID: <https://orcid.org/0009-0000-9998-5652>
Universidade Federal de Santa Maria, Brasil
E-mail: diane.deoliveira@yahoo.com.br

Cibele Mensch Canabarro

ORCID: <https://orcid.org/0009-0008-0360-8149>
Universidade Federal de Santa Maria, Brasil
E-mail: cibelemc@gmail.com

Roberto Christ Vianna Santos

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0533-3483>
Universidade Federal de Santa Maria, Brasil
E-mail: robertochrist@gmail.com

Resumo

A cárie dentária ainda constitui um grande desafio, apesar de todos os meios hoje disponíveis para o seu tratamento. Desencadeada e perpetuada por bactérias Gram-positivas, sendo que o agente etiológico primário é a bactéria *Streptococcus mutans* (*S. mutans*), cuja formação de biofilme, resistência à antibioticoterapia convencional e a antissépticos bucais, exigem a busca por novos métodos coadjuvantes ao tratamento clínico. Desse modo, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antimicrobiana e antibiofilme do óleo essencial de Tomilho (*Thymus vulgaris*) frente à *S. mutans*. Foi realizada a caracterização do óleo por cromatografia gasosa, onde se observou a presença dos componentes majoritários, timol e o-cimeno nas respectivas porcentagens de 47,40% e 27,186%. A atividade antimicrobiana foi avaliada por método convencional de microdiluição em caldo. O óleo de *T. vulgaris*, foi capaz de inibir o crescimento bacteriano em concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) de 0,375mg/mL. Os testes de suscetibilidade *in vitro* foram realizados conforme CLSI, 2018. Foi avaliado a capacidade de formação de biofilme em modelo *ex vivo*, utilizando modelo de dentes bovinos. A atividade antibiofilme foi analisada através de microscopia de força atômica e contagem de microrganismos viáveis, demonstrando que o óleo de *T. vulgaris* nas concentrações de 0.75 mg/mL e 1,5 mg/mL em ambas as técnicas, promoveu redução dos biofilmes formados. Almeja-se que estes resultados possam nortear futuros estudos para a produção de formulações que possam ser utilizadas no tratamento de biofilmes causados por *S. mutans*.

Palavras-chave: Cárie dentária; Biofilmes; Óleos voláteis; Timol; Cimenos.

Abstract

The caries disease is still a major challenge, despite all the means available today for your treatment .Triggered and perpetuated by Gram-positives, where the primary etiologic agent is the bacterium *Streptococcus mutans*, whose biofilm formation, resistance to conventional antibiotic therapy and oral antiseptics, require the search for new methods to support clinical treatment. In this approach, research that seeks to identify natural products with biological activity

represent an alternative for the treatment of this disease. The present work had as objective to evaluate the antimicrobial and antibiofilm activity of the essential oil of Thyme (*Thymus vulgaris*) against *S. mutans*. The oil characterization was performed by GC-FID and GC-MS, where it was observed the presence of major components, o-cymene and thymol in their respective percentages of 47,40% and 27,186%. The antimicrobial activity was evaluated by a conventional broth microdilution method. The *T. vulgaris* oil was able to inhibit bacterial growth at a minimum inhibitory concentration (MIC) and a minimum bactericidal concentration (CBM) of 0.375mg/mL, in vitro susceptibility tests were performed according to CLSI 2018. The capacity of biofilm formation was evaluated in an ex vivo model, using a bovine teeth model. The antibiofilm activity was analyzed through atomic force microscopy and viable microorganisms counting, demonstrating that the *T. vulgaris* oil at concentrations of 0.75 mg/mL and 1.5 mg/mL in both techniques promoted a reduction in the formed biofilms. It is hoped that these results can guide future studies for the production of formulations that can be used in the treatment of biofilms caused by *S. mutans*.

Keywords: Dental caries; Biofilms; Volatile oils; Thymol; Cymenes.

Resumen

La caries dental sigue constituyendo un gran desafío, a pesar de todos los medios disponibles hoy en día para su tratamiento. Desencadenada y perpetuada por bacterias Gram-positivas, siendo el agente etiológico primario la bacteria *Streptococcus mutans* (*S. mutans*), cuya formación de biofilm, resistencia a la antibioticoterapia convencional y a los antisépticos bucales exigen la búsqueda de nuevos métodos coadyuvantes al tratamiento clínico. De este modo, el presente trabajo tuvo como objetivo evaluar la actividad antimicrobiana y antibiofilm del aceite esencial de Tomillo (*Thymus vulgaris*) frente a *S. mutans*. Se realizó la caracterización del aceite por cromatografía gaseosa, donde se observó la presencia de los componentes mayoritarios, timol y o-cimeno, en los porcentajes de 47,40% y 27,186%, respectivamente. La actividad antimicrobiana fue evaluada por el método convencional de microdilución en caldo. El aceite de *T. vulgaris* fue capaz de inhibir el crecimiento bacteriano con una concentración inhibitoria mínima (CIM) y una concentración bactericida mínima (CBM) de 0,375 mg/mL. Las pruebas de susceptibilidad *in vitro* se realizaron conforme al CLSI, 2018. Se evaluó la capacidad de formación de biofilm en un modelo *ex vivo*, utilizando un modelo de dientes bovinos. La actividad antibiofilm fue analizada a través de microscopía de fuerza atómica y recuento de microorganismos viables, demostrando que el aceite de *T. vulgaris* en las concentraciones de 0,75 mg/mL y 1,5 mg/mL en ambas técnicas, promovió la reducción de los biofilms formados. Se espera que estos resultados puedan orientar futuros estudios para la producción de formulaciones que puedan ser utilizadas en el tratamiento de biofilms causados por *S. mutans*.

Palabras clave: Caries dental; Biopelículas; Aceites volátiles; Timol; Cimenos.

1. Introdução

A utilização de produtos naturais, particularmente da flora, com fins medicinais, nasceu com a humanidade. Sabe-se que as plantas medicinais possuem em sua constituição compostos com atividade biológica (metabólitos secundários), que auxiliam na cura e no tratamento de várias doenças (Andrade et al., 2007). Os óleos essenciais extraídos das plantas têm sido largamente empregados por suas propriedades já observadas na natureza, ou seja, por sua ação antibacteriana, atividade antifúngica e inseticida. Os constituintes dos óleos essenciais são principalmente os derivados terpênicos, como os monos e sesquiterpenos e os fenilpropanóides (Solorzano-Santos & Miranda-Novales, 2012), os quais são responsáveis pelas suas propriedades organolépticas e terapêuticas (Miranda et al., 2016).

O tomilho (*T. vulgaris*) é uma planta medicinal, aromática e condimentar, pertencente à família Lamiaceae. Seu óleo, considerado responsável pelas atividades atribuídas a essa planta, apresenta ações antisséptica, expectorante, carminativa e antiespasmódica. Sua atividade biológica está relacionada com o timol e o carvacrol. O timol tem demonstrado efeitos antibacterianos, antifúngicos e anti-helmínticos, enquanto o carvacrol tem sido estudado por seus efeitos bactericidas (Carretto et al., 2007).

No decorrer das décadas, com o advento das pesquisas na área odontológica, foi estabelecido que o acúmulo de placa dentária é um potencial agente causador da cárie, tendo como principal bactéria oral responsável pela iniciação e progressão da cárie dentária, o *Streptococcus mutans* (Marsh, 2004). A cárie consiste na condição infecciosa oral mais prevalente em seres humanos, sendo a remoção do biofilme bacteriano o elemento decisivo na prevenção e tratamento destas doenças (Atabek et al., 2012).

Nesse contexto, os óleos essenciais têm sido estudados como uma alternativa para inibir a colonização bacteriana, impedindo a formação de biofilme na cavidade oral e consequentemente diminuindo a prevalência da doença cárie (Oliveira et al., 2017).

Diante disso, este estudo teve como objetivo, avaliar a atividade antimicrobiana e antibiofilme do óleo de *T. vulgaris* frente a *S. mutans*.

2. Metodologia

Realizou-se uma pesquisa experimental, laboratorial (Risemberg et al., 2026) num estudo de abordagem qualitativa (nas imagens) e quantitativa nos cálculos (Pereira et al., 2018) com uso de estatística descritiva com gráficos, valores de média, desvio padrão e quantidades e porcentagens (Shitsuka et al., 2014) e com uso de análise estatística (Costa Neto & Bekman, 2009).

2.1 Microrganismo

Foi utilizada cepa padrão de *S. mutans* ATCC 25175, formadora de biofilme.

2.2 Obtenção e caracterização do óleo

O óleo essencial de *T. vulgaris* foi extraído em escala industrial por hidrodestilação a arraste de vapor pela Empresa Ferquima Ind. e Comércio de Óleos Essenciais Vargem Grande Paulista, São Paulo. As partes utilizadas foram folhas e cascas dos frutos.

A análise fitoquímica do óleo essencial foi realizada no NTA (Núcleo de Tecnologia de Alimentos) da UFSM. A caracterização do óleo essencial de *T. vulgaris* foi realizada em um cromatógrafo a gás Varian Star 3400CX (CA, EUA) equipado com um detector de ionização de chama (GC-FID) segundo metodologia de Teixeira et al. (2014) com modificações. Para análise do óleo, 5 µL do óleo foi diluído em 1 mL de hexano e uma alíquota de 1 µL da solução foi injetada na porta de injeção do cromatógrafo a uma temperatura de 250 °C no modo *split* de razão 1:30. Os compostos foram separados numa coluna capilar apolar de sílica fundida BPX 5 (25 m × 0.22 mm × 0.25 µm, SGE, Australia). O hidrogênio foi utilizado como gás de arraste a uma pressão constante (15 psi). A temperatura inicial da coluna foi ajustada para 50 °C e mantida durante 0,5 min. Em seguida, um gradiente de temperatura foi iniciado subindo a 4 °C min⁻¹ até 80 °C, e depois até 260 °C por um aumento a 10 °C min⁻¹, e mantida em condições isotérmicas durante 2 min. A temperatura do detector foi mantida a 250 °C. Uma série de n-alcenos homólogos foram analisados sob as mesmas condições cromatográficas para calcular o índice de retenção linear (IRL) (Viegas et al., 2007).

A análise qualitativa dos compostos foi efetuada por um cromatógrafo gasoso Shimadzu QP2010 Ultra acoplado a espectrômetro de massas (GC/MS, Shimadzu Corporation, Quioto, Japão). Para estas análises, foram usadas as mesmas condições cromatográficas acima descritas e hélio foi utilizado como o gás de arraste. O detector foi operado no modo de ionização por impacto de elétrons com uma energia de ionização de 70 eV e um intervalo de varredura de massas 35-350 m/z.. Os analitos foram identificados com base na comparação com os espectros de massas disponível na biblioteca *National Institute of Standards and Technology* (NIST) e por comparação dos índices de retenção linear calculados com aqueles disponíveis na literatura científica (Adams, 2007).

2.3 Dentes bovinos

Foram utilizados como corpos de prova, dentes bovinos extraídos de animais abatidos em abatedouro local. Conforme Lei nº 11.794/2008 não é necessária submissão de projeto ao Comitê de Ética no uso de Animais para obtenção dos dentes.

2.4 Testes de atividade antimicrobiana

2.4.1 Preparação do inóculo

O inóculo da cepa *S. mutans* ATCC 25175 foi padronizado de acordo com o protocolo M07-M09 aprovado pelo “*Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI 2018). Colônias isoladas foram cultivadas por 24 -48 horas em ágar Brain Heart Infusion (BHI) e a suspensão foi preparada em solução salina (NaCl 0,85%) com densidade ajustada para 0,5 na escala de McFarland ($1,5 \times 10^8$ CFU / mL).

2.4.2 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

A diluição do óleo essencial de *T. vulgaris* foi realizada em tubo de ensaio estéril em proporção de 1:10, onde foram adicionados 10% do óleo essencial, 10% de Tween 80 (polissorbato) e 80 % de água destilada., esta solução foi agitada em vórtex (Mod AP56, Phoenix) a fim de se obter uma concentração de 6 mg/mL.

A CIM foi determinada pelo método de microdiluição em caldo utilizando placas de 96 poços padronizado de acordo com o protocolo M07-M09 aprovado pelo “*Clinical and Laboratory Standards Institute*” (CLSI 2018). Resumidamente foram adicionados em todos os poços 100 µL de caldo *Brain Heart Infusion* (BHI), em seguida foram adicionados 100 µL do óleo na coluna 1 e foi realizada a diluição seriada até a 10ª coluna. As faixas de concentrações finais do óleo nos poços das placas de microtitulação foram de 6-0,04687 mg/mL. O inóculo foi preparado na escala 0,5 McFarland, e diluídos 1:20, apresentando aproximadamente $1,5 \times 10^8$ de colônias (UFC/mL). Após a realização da diluição, foi adicionado 10 µL do inóculo bacteriano em cada poço, exceto na coluna 11 (controle negativo). O controle positivo foi realizado na 12ª coluna, considerado o poço com o inóculo e caldo BHI, enquanto o controle negativo foi apenas composto pelo caldo BHI e o óleo. As placas foram envolvidas em alumínio e incubadas por 48 horas a 37°C. em condições de microaerofilia. O ensaio foi realizado em triplicata em três momentos diferentes. Para melhor visualização de presença ou ausência do crescimento do microrganismo o ensaio foi revelado utilizando o corante cloreto de 2,3,5-trifenil tetrazólio, que desenvolve uma cor vermelha na presença de crescimento/viabilidade dos microrganismos. A concentração mais baixa que não mostrar alteração na cor será considerada como CIM.

2.4.3 Determinação da concentração bactericida mínima (CBM)

Para a determinação da CBM, após a leitura da CIM no teste de microdiluição em caldo, os poços que apresentaram ausência de crescimento foram repicados (1 µL) para placa contendo ágar *Brain Heart Infusion* (BHI). As placas foram incubadas a 37°C, por 48 horas em microaerofilia, em estufa bacteriológica. Os valores de CBM foram determinados como sendo a menor concentração na qual não houve crescimento bacteriano visível no ágar BHI.

2.5 Determinação de atividade antibiofilme

Um modelo de biofilme (Guggenheim et al., 2004) foi modificado para formar biofilme de *S. mutans* utilizando corpos de prova (CPS). Os mesmos foram confeccionados a partir de dentes incisivos bovinos nas medidas 5mm x 5mm x 1mm espessura. As medidas foram conferidas com um paquímetro digital (Jomarca®) e posteriormente foram autoclavados. Corpos de prova foram imersos em 1,5 ml de saliva artificial estéril por 30 minutos em placa de 24 poços para formação inicial da película. Após a formação inicial da película, os CP foram depositados em uma mistura de 100 µl de saliva artificial estéril e 300

ul de caldo BHI suplementado com 0,25% de sacarose, inoculado com 40 ul de *S. mutans*, sendo utilizado como controle positivo (meio de cultura, inóculo e CP). A placa de 24 poços contendo os CPs foi incubada a 37 °C por 24 horas em condições de microaerofilia.

Depois da inoculação por 24 horas, os poços foram lavados no mínimo 3 vezes com água destilada estéril para remover as células fracamente aderidas (células planctônicas), e os biofilmes pré-formados na superfície dos CPs, foram tratados com OL nas concentrações 1xMIC, 2xMIC e 4xMIC por 6 horas. Foi realizado também tratamento com a clorexidina 0,12% (Periogard® Colgate, Brasil.), a qual é considerado padrão ouro como colutório e comumente utilizado pela população.

2.5.1 Contagem de microrganismos viáveis

Para a análise da viabilidade bacteriana, os CPs foram retirados da placa de 24 poços, após realizado os tratamentos com OL e CHX 0,12%, transferidos imediatamente para microtubos (do tipo *ependorff*) contendo 1 mL de solução salina e mantidos em sonicador por 15 minutos (tempo determinado previamente em um teste piloto, dados não mostrados) para desprender as bactérias aderidas na superfície do esmalte. As amostras foram homogeneizadas em vórtex (3000 rpm) por 30 segundos e diluídas para 1:500 e 1:1000 em salina estéril. Aliquotas de 10 µl foram semeadas pelo método de espalhamento em ágar BHI. As placas de Petri foram incubadas em anaerobiose por 48h a 37°C e a contagem das colônias foi realizada após 48h de incubação. Os resultados foram expressos em porcentagem considerando o controle positivo como 100% de viabilidade (Souza et al., 2017).

2.5.2 Microscopia de força atômica (MFA)

A análise tridimensional da estrutura do biofilme foi realizada por Microscopia de Força Atômica de acordo com a metodologia descrita por Arend e colaboradores (2016) com algumas modificações. Após o período experimental os dentes bovinos foram removidos e fixados com metanol absoluto durante 1 min (Quatrin et al., 2015). A dispersão resultante foi colocada em pequenos pedaços quadrados de mica recém-cortada e fotografada. Os mapas topográficos foram registrados em um microscópio Park NX10 (Park Systems, Suwon - Coréia) equipado com um *software* SmartScan versão 1.0. RTM 11a. As medições foram realizadas utilizando uma sonda TAP300G com frequência de ressonância nominal de 300 kHz e constante de força de 40 N / m. Todas as medições foram feitas em condições ambientais com temperatura ambiente de 21 ± 50C e umidade relativa de 55 ± 10% com taxa de varredura de 0,35 Hz. As imagens foram tratadas *offline* usando o *software* XEI versão 4.3.4 Build22.RTM1.

2.6 Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando ANOVA de uma via, seguido pelo teste de *Dunnett*. Os dados foram representados como a média ± SEM. Foi utilizado o software *Graph Prism* 6.01. (*Graphpad Software, INC*). A análise microbiológica foi apresentada de forma percentual, com descrição de médias e desvio padrão. A formação de UFC de cada tratamento foi comparada a seu controle positivo e a clorexidina 0,12%.

3. Resultados e Discussão

3.1 Avaliação cromatográfica do óleo de *T. vulgaris* (Caracterização físico-química)

Na tabela abaixo (Tabela 1) estão descritos os principais componentes majoritários do óleo essencial utilizado segundo laudo técnico da empresa Ferquima.

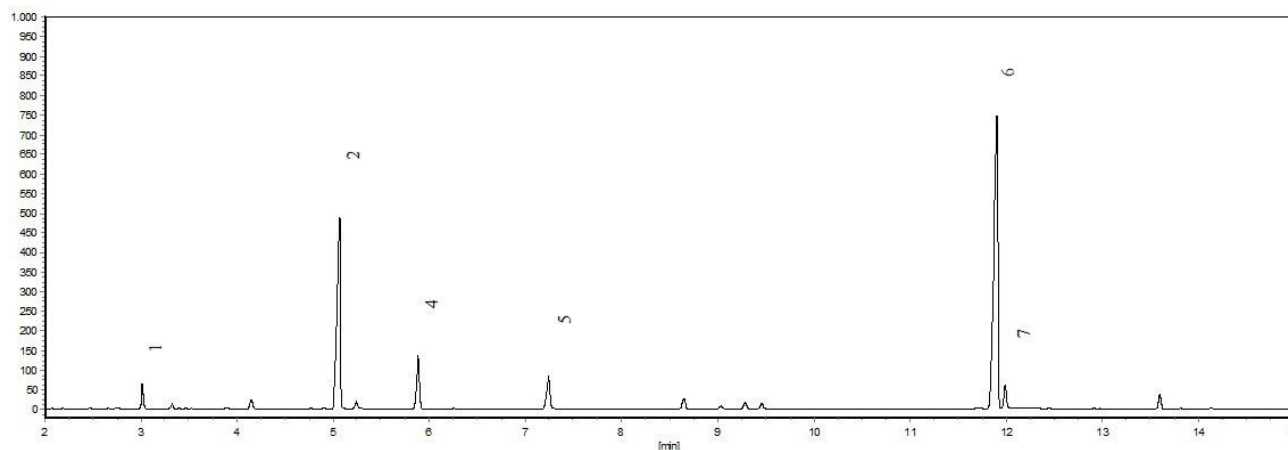
Tabela 1 - Principais componentes do óleo essencial estudado.

Nome comum	Nome científico (Família)	Componentes majoritários
Tomilho	<i>Thymus vulgaris</i> (Lamiaceae)	Timol (50%)
		p-cimeno (30%)
		linalol (6,05%)
		y-terpineno (6%)
		Carvacrol (5%)
		Mirceno (2%) α -pineno (2%)

Fonte: Autoria própria.

A seguir, a Figura 1 apresenta o cromatograma do óleo essencial de *T.vulgaris* obtido no equipamento GC-FID.

Figura 1 - Cromatograma do óleo essencial de *T.vulgaris* 1 – α -pineno; 2 – o-cimeno; 4 -y-terpineno; 5-linalol ,6-timol ; 7- carvacrol.



Fonte: Autoria própria.

Nas linhas seguintes, a Tabela 2 apresenta a composição percentual do óleo essencial de *T. vulgaris* a partir do cromatograma realizado no GC-FID.

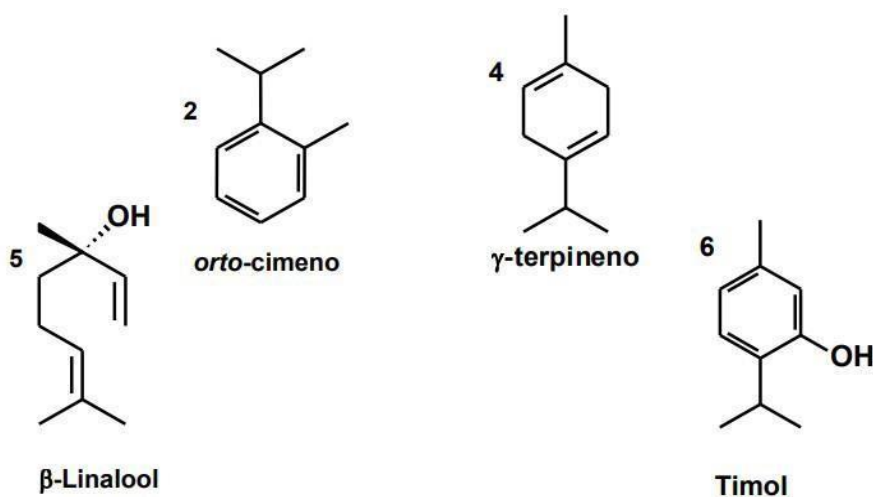
Tabela 2 - Composição percentual do óleo essencial de *T.vulgaris*.

Pico	Substância	Porcentagem
1	α -pineno	2,36
2	o-cimeno	27,186
4	Y-terpineno	6,78
5	linalol	4,891
6	timol	47,40
7	carvacrol	2,50

Fonte: Autoria própria.

A seguir estão descritas as principais estruturas químicas dos componentes majoritários do óleo essencial de *T. vulgaris*.

Figura 2 - Estrutura química dos componentes majoritários do óleo essencial de *T.vulgaris*- o- cimeno - γ -terpineno; -linalol; -timol.



Fonte: Autoria própria.

3.2 Atividade antimicrobiana

Os resultados obtidos com o teste de microdiluição em caldo, demonstraram que o óleo de *T. vulgaris*, apresenta atividade antimicrobiana em baixas concentrações frente à *S.mutans* ATCC 25175.

Tabela 3 - Resultados da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e da Concentração Bactericida Mínima (CBM) do óleo de *T. vulgaris*.

Microrganismo	CIM (mg/ml)	CBM (mg/ml)
<i>S.mutans</i> ATCC 25175	0,375 mg/mL	0,375 mg/mL

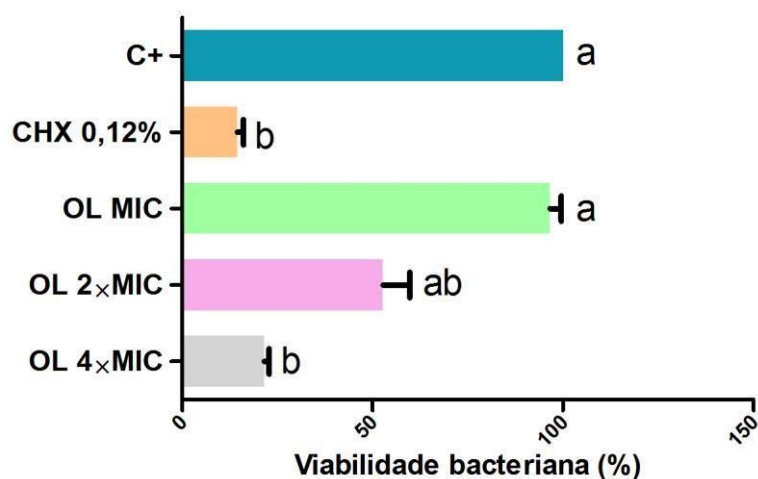
Fonte: Autoria própria.

3.3 Atividade antibiofilme

3.3.1 Avaliação antimicrobiana das soluções testadas no biofilme

A avaliação da viabilidade celular está apresentada na Figura 3. O controle positivo foi considerado com um crescimento de 100% das unidades formadoras de colônias (UFC). Os biofilmes tratados com a CHX reduziram o número de UFCs para 14%, OL 2xMIC para 52% e OL 4xMIC para 21% UFCs.

Figura 3 - Contagens médias de formação de unidades formadoras de colônias (UFCs) nas diferentes soluções. Os resultados estão expressos em porcentagem (Média $\pm$ Erro padrão da média). C+: Controle Positivo (Solução NaCl 0,85%). CHX 0,12% - Clorexidina 0,12% OL MIC Óleo de *T. Vulgaris* 0,375 mg/mL, OL 2xMIC- Óleo de *T. Vulgaris* 0,75 mg/mL, OL 4xMIC- Óleo de *T. Vulgaris* 1,5 mg/mL. A análise estatística será realizada utilizando ANOVA de uma via, seguido pelo teste de Dunnett. Os dados serão representados como a média $\pm$ SEM. Será utilizado o software Graph Prism 6.01. a - Diferença significativa com relação ao controle positivo. b – Diferença significativa com relação a CHX 0,12%

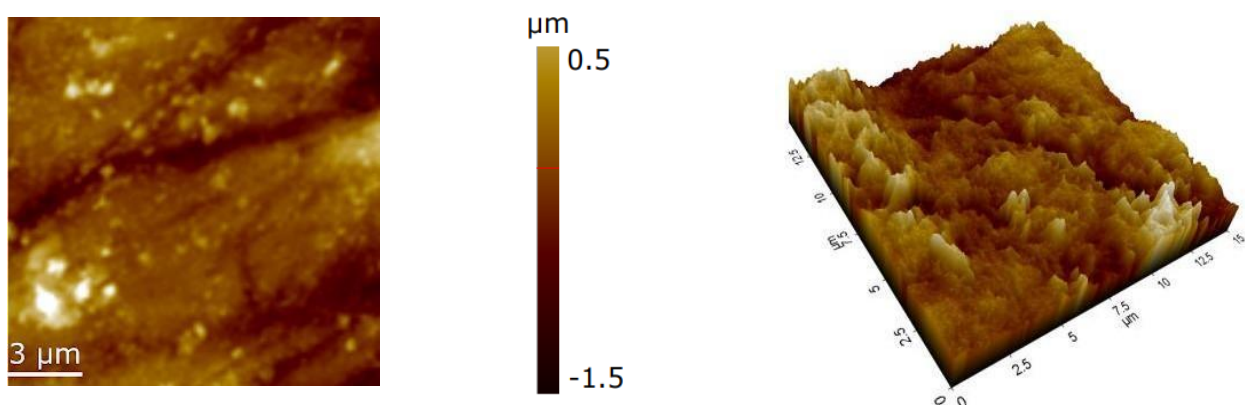


Fonte: Autoria própria.

3.3.2 Microscopia de força atômica

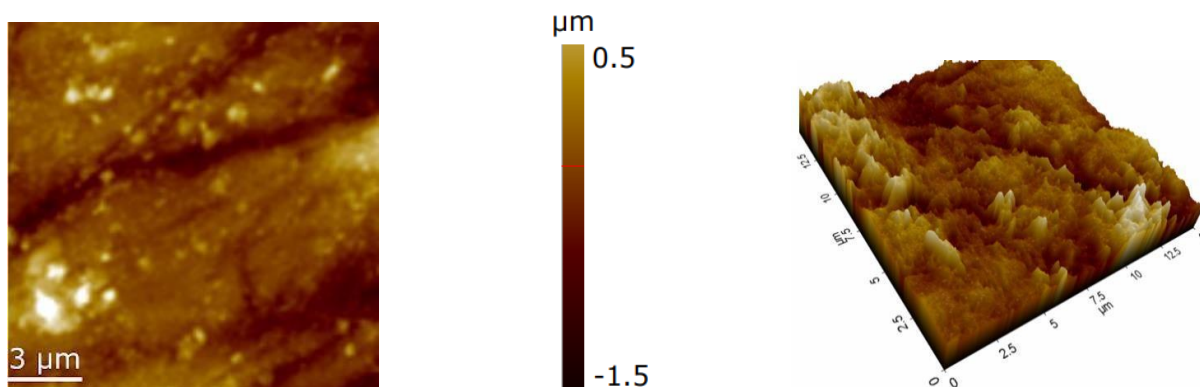
As imagens de MFA representadas nas Figuras de 4 até 8 mostram a ação das soluções sobre a estrutura tridimensional do biofilme. Nas análises das imagens de MFA a estimativa aproximada das dimensões do biofilme variou entre 500 e 200 nm.

Figura 4 - Análise da superfície do CP. Imagem obtida através de MFA demonstrando a presença do biofilme formado por *S. mutans* - Controle positivo



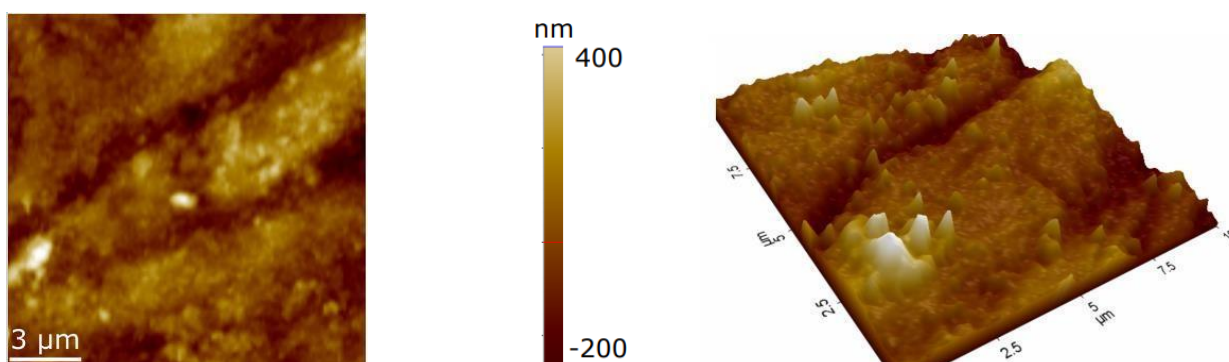
Fonte: Autoria própria.

Figura 5 - :Análise da superfície do CP. Imagem obtida através de MFA demonstrando biofilme formado por *S. mutans* ao utilizar OL 1MIC.



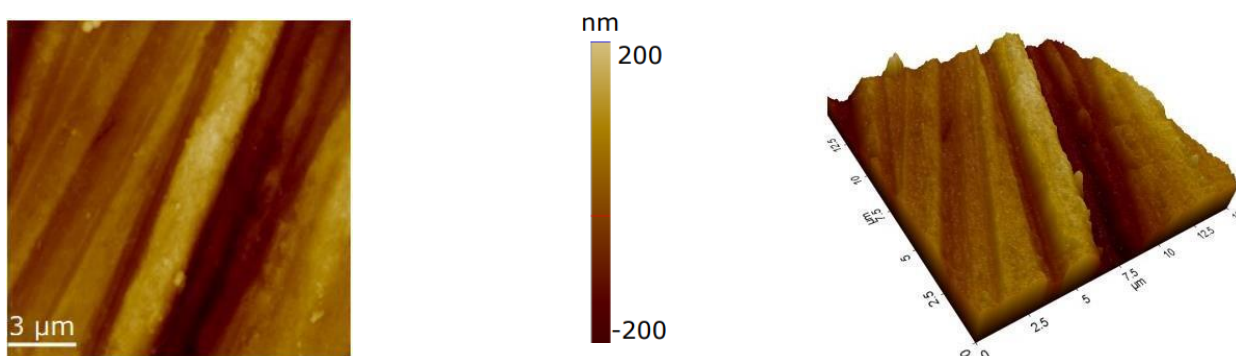
Fonte: Autoria própria.

Figura 6 - Análise da superfície do CP. Imagem obtida através de MFA demonstrando a redução do biofilme formado por *S. mutans* ao utilizar OL 2MIC, ao promover redução na sua amplitude.



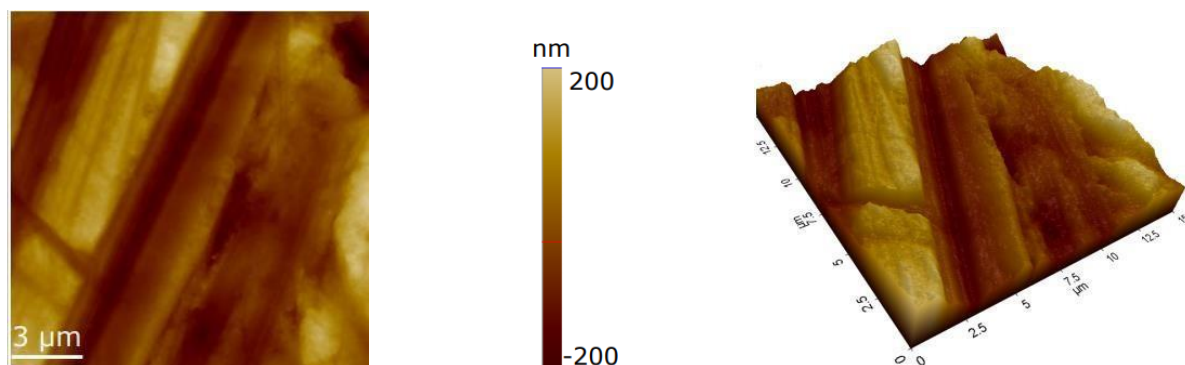
Fonte: Autoria própria.

Figura 7 - Análise da superfície do CP. Imagem obtida através de MFA demonstrando a redução do biofilme formado por *S. mutans* ao utilizar OL 4MIC.



Fonte: Autoria própria.

Figura 8 - Análise da superfície do CP. Imagem obtida através de MFA demonstrando a redução do biofilme formado por *S. mutans* ao utilizar CHX 0,12%.



Fonte: Autoria própria.

O óleo essencial de *T. vulgaris* apresentou os compostos timol (47,40%), o- cimenol (27,186%), linalol (4,891%), γ -terpineno (6,78%), carvacrol (2,50)% e α -pineno (2,366%) como componentes abundantes como mostra a Figura 1, assim como reportado por Carvalho e colaboradores (2015), que identificaram os compostos timol (43,19%), p-cimenol (28,55%), γ -terpineno (6,36%), linalol (5,57%), carvacrol (3,14%) e α -pineno (2,60%) e Höferl e colaboradores (2009) que encontraram os compostos timol (43,4%), p-cimenol (23,5%) e o carvacrol (4,1%), como componentes majoritários.

Alguns autores relatam que as atividades biológicas de óleos essenciais estão relacionadas com a atividade dos componentes majoritários. De fato, diversos estudos demonstraram que esses compostos apresentaram atividade quando testados separadamente, porém, essas atividades também podem ser atribuídas a possíveis interações entre todos os componentes (Bassolé et al., 2010; Herman et al., 2016).

Desta forma, estudos que envolvem atividades antimicrobianas de produtos naturais devem conter, de preferência, as análises químicas das substâncias testes, pois assim se torna possível identificar os componentes majoritários e a associação com as atividades biológicas (Simões et al., 2004).

Os resultados demonstraram significativo efeito antimicrobiano do óleo de *T. vulgaris* comparável a CHX, onde sua atividade antimicrobiana é atribuída principalmente ao carvacrol e timol, que atuam principalmente na parede celular, modificando sua permeabilidade e causando a perda de material celular, tais como ATP e ácido nucleico (Trombetta et al., 2005).

Na análise da viabilidade bacteriana a CHX apresentou resultado significativamente superior ao OL 1xMIC e 2xMIC e muito próximo ao obtido com o OL 4xMIC. Isso se deve ao fato da sua natureza dicatiônica, a CHX 0,12% adsorve-se a compostos aniônicos como glicoproteínas salivares, radicais fosfatados e carboxílicos presentes na película dental e no biofilme dental como bactérias e polissacarídeos extracelulares (Addy; Moran, 1983) e apresenta capacidade de permanecer retida 12 horas, sendo liberada gradativamente. A CHX 0,12% é o padrão-ouro no controle do biofilme dental e inflamação gengival, sendo amplamente utilizada na Odontologia (Van Strydonck et al., 2012). Por esta razão a CHX 0,12% foi utilizada como um dos tratamentos neste estudo para fins de comparação com OL. Apesar de ser bastante utilizada, uma das suas desvantagens é a possibilidade de manchar os dentes, um fator negativo principalmente por causa da estética bucal do paciente. Outra desvantagem é a possibilidade de alterações do paladar (Lachenmeier, 2017). Também apresenta um sabor desagradável, descama a mucosa e pode causar reações alérgicas (Kluk et al., 2016).

Assim o uso de alternativas naturais, como extratos de plantas e ervas, vem ganhando uma maior aceitação no mercado odontológico e resultando em um crescente interesse em pesquisa para novas formulações (Kothiwale et al., 2014).

O óleo de *T. Vulgaris* utilizado neste estudo, é rico nos compostos fenólicos timol e carvacrol, relacionados com muitas atividades biológicas como efeito antimicrobiano, antifúngico e anti-helmíntico (Gutiérrez Larraínzar et al., 2012). O timol tem demonstrado efeitos antifúngicos, antibacterianos e anti-helmínticos, e o carvacrol tem sido estudado por seus efeitos bactericidas (Sakurai et al., 2016), onde seu mecanismo de ação sobre os microrganismos se dá através do rompimento da membrana citoplasmática da parede das bactérias Gram negativas. Já o ρ -cimeno, outro constituinte, por ser uma substância hidrofóbica, gera um inchaço exacerbado da membrana citoplasmática, fragilizando-a (Barbosa, 2010).

Nossos resultados corroboram estudos realizados *in vitro* como o de Ciandrini e colaboradores (2014) onde avaliaram os efeitos do carvacrol, composto presente no óleo essencial de tomilho, sobre biofilmes pré-formados de patógenos orais entre eles *S. mutans* ATCC 25175, onde concluíram que esse composto mostrou atividade antibiofilme contra o respectivo microrganismo. Outros estudos, como o Oliveira Carvalho e colaboradores em 2020, demonstraram e confirmaram a atividade antibacteriana e antibiofilme do óleo de *T. vulgaris* contra *S. mutans*, onde concluíram que o óleo reduziu em 72% o biofilme em sua maior concentração (4MIC). Nikoli et al. (2014) também realizaram testes antimicrobianos com óleo de três espécies do gênero *Thymus* para tratamento de feridas menores, distúrbios de cavidade oral, bem como a higiene bucal, justificando o uso do óleo para tais fins.

Sugere-se então uma associação entre o OL de *T. vulgaris* e CHX 0,12%, afim de potencializar a ação antimicrobiana da mesma, diminuir seus efeitos colaterais em decorrência de poder usá-la em uma concentração menor, a exemplo de alguns produtos, dentre eles, vernizes bucais, que fazem uso da clorexidina e timol em associação. Estudos como o de Brailsford et al. (2003) e de Anand et al. (2012,) comprovaram que a combinação de clorexidina e timol na forma de verniz ao ser utilizada por um grupo de idosos, reduziu significativamente lesões cariosas bem como foi um importante coadjuvante no tratamento periodontal.

A Microscopia de Força Atômica evidenciou-se como uma eficiente técnica para caracterização qualitativa e quantitativa dos biofilmes, pois possibilita a visualização das superfícies em três dimensões (Cahill; Freger & Kwak, 2008).

As Figuras 4 até a 8 mostram mapas de topografia 2D e 3D obtidos por Microscopia de Força Atômica (AFM) para substratos de dentes bovinos (CP) tratados com MIC (0,375 mg / mL), 2XMIC (0,75 mg/mL), 4XMIC (1,5mg/mL) e CHX 0.12%, submetidos ao processo antibiofilme. O controle positivo (Figura 8) nas imagens 2D e 3D, mostra biofilme formado na matriz, evidenciado pela presença de matrizes poliméricas constituído por estruturas bacterianas crescidas com altura medida de 500 nm. Foram avaliadas por MFA as concentrações de MIC, 2XMIC, 4XMIC e CHX 0,12%. Na concentração de 2XMIC a altura do biofilme medido foi de 400 nm e na de 4XMIC (1,5mg/mL) a altura foi de 200 nm., semelhante ao tratamento com CHX 0,12%, demonstrando maior ação antibiofilme a concentração de 4XMIC, a qual apresentou menor amplitude do biofilme.

Os estudos *in vitro* são relevantes para estabelecer as interações bacterianas que ocorrem no biofilme, no entanto não simulam de uma forma exata as condições de desenvolvimento na boca, como por exemplo a diversidade de nutrientes, alterações de umidade, pH, temperatura, saliva e ainda a formação do biofilme polimicrobiano, o qual pode representar pelo menos 800 espécies.

4. Considerações Finais e Perspectivas

A habilidade em desenvolver biofilmes está relacionada diretamente com a capacidade do microrganismo em causar infecções e, como tal, deve ser motivo de preocupação na comunidade científica. Compreender os fatores genéticos e fisiológicos, associados a formação de biofilmes, contribui para a elucidação do potencial patogênico apresentado por estes microrganismos.

A presente dissertação concentrou-se no estudo da eficácia do OL de *T.vulgaris* sobre biofilmes formados por *S.mutans*, principal causador da cárie dentária e de grande relevância clínica.

Entretanto ainda que os objetivos deste trabalho tenham sido alcançados sugere-se a curto e longo prazo:

- Avaliar o potencial antimicrobiano do OL sobre biofilme formado *in situ* utilizando um modelo de dispositivo intra oral, onde serão inseridos os CP.
- Avaliar a eficácia do OL frente aos biofilmes na forma de uma nanoestrutura.
- Realizar associação entre OL e a CHX 0,12%, para posterior avaliação do potencial antibiofilme e antimicrobiano.

5. Conclusão

Conclui-se com o presente estudo que o óleo essencial de *T.vulgaris* apresenta composição semelhante à encontrada na literatura em relação aos componentes majoritários. Possui atividade antimicrobiana e bactericida na concentração de 0,375 mg/mL frente à *S. mutans*, além de potencial atividade antibiofilme, a qual foi evidenciada através da contagem de colônias viáveis e da microscopia de força atômica. As imagens capturadas demonstraram a efetividade do OL 2XMIC (0,75 mg/mL) e 4XMIC (1,5mg/mL) na ação de destruição do biofilme sobre a superfície do CP, sendo considerado agente promissor para o emprego em produtos de higiene oral. Entretanto, estudos mais detalhados *in vitro* e *in vivo* bem como estudos de avaliação de toxicidade devem ser realizados visando uma possível aplicação profilática e/ou terapêutica.

Referências

- Adams, R. P. (2007). *Identification of essential oils components by gas chromatography mass spectroscopy*. Carol Stream: Allured Publishing Corporation, 2007.
- Addy, M. & Moran, J. (1983). Comparison of plaque accumulation after topical application and mouth rinsing with chlorhexidine gluconate. *Journal of clinical periodontology*. 10, 69–71.
- Andrade, S. F., Cardoso, L. G. & Bastos, J. K. (2007). Anti-inflammatory and antinociceptive activities of extract, fractions and populonic acid from bark wood of *Austroplen ckiapopulnea*. *J Ethnopharmacol*. 109(3), 464-71.
- Arend, C. F. et al. (2016). Effect of etching with different hydrofluoric acid concentrations on bond strength between glazed feldspathic ceramic and metal brackets. *Brazilian Dental Science*. 19(1).
- Atabek, D., Alaçam, A., Cakilci, B. & Berkkan, A. (2012). Um Estudo Comparativo de conter fluoreto de clorexidina e não-cloro-hexidina bochechos em um grupo adolescente. *Int Dent Res*. 2, 1-7.
- Barbosa, L. N. (2010). *Propriedade antimicrobiana de óleos essenciais de plantas condimentares com potencial de uso como conservante em carne e hambúrguer bovino e testes de aceitação*. Universidade Estadual Paulista, 5-107p.
- Bassolé, I. H. N. et al. (2010). Composition and antimicrobial activities of *Lippia multiflora* Moldenke, *Mentha x piperita* L. and *Ocimum basilicum* L. essential oils and their major monoterpene alcohols alone and in combination. *Molecules*. 15(11), 7825-39.
- Bonez, P. C. et al. (2021). Sulfonamides complexed with metals as mycobacterial biofilms inhibitors. *Journal of Clinical Tuberculosis and Other Mycobacterial Diseases*. 23, 100217.
- Carretto, C. F. P. et al. (2007). Efeitos do chá de tomilho sobre a aderência in vitro de *Streptococcus mutans* ao esmalte dentário e *Candida albicans* à resina acrílica. *Rev Odontol UNESP*. 36(3), 281-6.
- Carvalho, R. J., Souza, G. T., Honório, V. G., Sousa, J. P., Conceição, M. L., Maganani, M. & Souza, E. L. (2015). Comparative inhibitory effects of *Thymus vulgaris* L. essential oil against *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* and mesophilic starter co-culture in cheese-mimicking models. *Food Microbiol*. 52, 59-65.
- Ciandrini, E., Campana, R. & Federici, S. (2014). In vitro activity of Carvacrol against titanium-adherent oral biofilms and planktonic cultures. *Clin. Oral Invest*. 18, 2001-13.
- CLSI. (2018). *Manual Clinical and Laboratory Standards Institute*. Reference methods for broth dilution antifungal susceptibility tests for yeasts; approved standards, CLSI document M27-A3.
- Costa Neto, P. L. O. & Bekman, O. R. (2009). *Análise estatística da decisão*. (2ed). Editora Blucher.

- Guggenheim, B., Guggenheim, M., Gmür, R., Giertsen, E. & Thurnheer, T. (2004). Application of the Zürich biofilm model to problems of cariology. *Caries Res.* 38:212–222. doi:10.1159/000077757.
- Gutiérrez-Larraínzar, M., Rúa, J., Caro, I., de Castro, C., de Arriaga, D., García Armesto, M. R. & del Valle, P. (2012). Evaluation of antimicrobial and antioxidant activities of natural phenolic compounds against foodborne pathogens and spoilage bacteria. *Food Control*, 26(2), 555–63.
- Herman, A., Tambor, K. & Herman, A. (2016). Linalool affects the antimicrobial efficacy of essential oils, *Curr. Microbiol.* 72,165-72.
- Höferl, M., Buchbauer, G., Jirovetz, L., Schmidt, E., Stoyanova, A., Denkova, Z., Slavchev, A. & Geissler, M. (2009). Correlation of antimicrobial activities of various essential oils and their main aromatic volatile constituents. *J. Essent. Oil Res.* 21, 459-64.
- Marsh, P. D. (2004). A placa dental um biofilme como microbiana. *Caries Res.* 38, 204-8.
- Miranda, C. A. S. F. et al. (2016). Óleos essenciais de folhas de diversas espécies: propriedades antioxidantes e antibacterianas no crescimento espécies patogênicas. *Rev. Ciên. Agron.* 47(1), 213-20.
- Oliveira Carvalho, I. et al. (2020). In vitro anticariogenic and antibiofilm activities of toothpastes formulated with essential oils. *Archives of Oral Biology*. 117, 104834.
- Oliveira, J. R. et al. (2017). *Thymus vulgaris* L. extract has antimicrobial and anti-inflammatory effects in the absence of cytotoxicity and genotoxicity. *Archives of oral biology*. 82, 271-9.
- Pereira, A. S. et al. (2018). *Metodologia da pesquisa científica*. [Free ebook]. Santa Maria. Editora da UFSM.
- Quatrin, P. M. et al. (2015). Evaluation of different substrates for in vitro biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa*. *Disciplinarum Scientia. Série: Ciências da Saúde*. 16(2), 191–203.
- Risemberg, R. I. C. et al. (2026). A importância da metodologia científica no desenvolvimento de artigos científicos. *E-Acadêmica*, 7(1), e0171675. <https://eacademica.org/eacademica/article/view/675>
- Sakurai, F. N. et al. (2016). Caracterização das propriedades funcionais das ervas aromáticas utilizadas em um hospital especializado em cardiopneumologia. *DEMETRA: Alimentação, Nutrição & Saúde*. 11(4), 1097-113.
- Shitsuka, R. et al. (2014). *Matemática fundamental para tecnologia*. (2ed). Editora Érica.
- Simões, C. M. O., Schenkel, E. P., Gosmann, G., Mello, J. C. P., Mentz, L. A. & Petrovick, P. R. (2004). *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. (5ed). Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFSC.
- Solórzano-Santos, F. & Miranda-Novales, M. G. (2012). Essential oils from aromatic herbs as antimicrobial agents. *Current opinion in biotechnology*. 23(2), 136-41.
- Souza, M. E. et al. (2017). Atividade antimicrobiana de nanopartículas de *Melaleuca alternifolia* em biofilme polimicrobiano in situ. *Patogênese microbiana*. 113, 432-7.
- Teixeira, J. P. F., Marques, M. O. M. & Pio, R. M. (2017). Caracterização dos óleos essenciais em frutos de nove genótipos de tangerina. *Citrus Research & Technology*. 35(1), 1-10.
- Trombetta, D., Castelli, F., Sarpietro, M. G., Venuti, V., Cristani, M., Daniele, C., Saija, A., Mozzanti, G. & Bisignano, G. (2005). Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49, 2474-8.
- Van Strydonck, D. A. C. et al. (2012). Effect of a chlorhexidine mouthrinse on plaque, gingival inflammation and staining in gingivitis patients: A systematic review. *Journal of Clinical Periodontology*. 39(11), 1042-55.
- Viegas, M. C. & Bassoli, D. G. (2007). Utilização do índice de retenção linear para caracterização de compostos voláteis em café solúvel utilizando GC-MS e coluna HP-Innowax. *Química nova*. 30(8), 2031-4.