

Investigation of the additive antimicrobial effects of clove and marjoram extracts against common oral pathogens

Investigação dos efeitos sinérgicos antimicrobianos da combinação de extratos de cravo e manjerona contra alguns agentes patogénicos orais

Mohammad Sheykhan¹, Reza Mirnejad², Seyed Mohammad Zarei³ , Mozhgan Kheirandish⁴, Mohammad Amrollahi-Sharifabadi⁵ , Sahar Abdelaziz⁶ , Ebrahim Salimi-Sabour⁷ , Sara Gonçalves⁸ , & Maryam Mosaffa-Jahromi⁹

Keywords: *Streptococcus mutans*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus sanguinis*, *Candida albicans*, clove, marjoram

Palavras-chave: *Streptococcus mutans*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus sanguinis*, *Candida albicans*, cravo, manjerona

To Cite:

Sheykhan, M. et al. (2025) Investigation of the additive antimicrobial effects of clove and marjoram extracts against common oral pathogens. *Biomedical and Biopharmaceutical Research*, 22(1), 24-40.

 <https://doi.org/10.19277/bbr.22.1.354>

1 - Pharmacy Student, Faculty of Pharmacy, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

2 - Molecular Biology Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

3 - Department of Pharmacognosy and Traditional Pharmacy, Faculty of Pharmacy, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

4 - Applied Microbiology Research Center, Systems Biology and Poisonings Institute, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

5 - Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Lorestan University, Khorramabad, Iran

6 - Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, Zagazig University, Zagazig, Egypt

7 - Department of Pharmacognosy and Traditional Pharmacy, Faculty of Pharmacy, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

8 - Academic Clinical Center of Trás-os-Montes and Alto Douro (CACTMAD), University of Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real, Portugal

9 - Research Center for Traditional Medicine and History of Medicine, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran

Correspondence to / Correspondência a:
E.salimisabour@gmail.com

Received / Recebido: 20/02/2025

Accepted / Aceite: 20/05/2025

Abstract

According to traditional Persian medicine, clove and marjoram have antibacterial properties. This study investigates their potential synergistic effects against oral pathogens. Ethanol extracts of clove and marjoram were tested for antimicrobial activity against *Streptococcus mutans*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus sanguinis*, and *Candida albicans* using minimum inhibitory concentration (MIC), minimum bactericidal concentration (MBC), time-kill assays, and fractional inhibitory concentration (FIC) indices. Clove extract demonstrated superior activity, with MIC/MBC values of 0.52/1 mg/mL for *S. mutans*, 0.2/1 mg/mL for *S. salivarius* and *S. sanguinis*, and 4/8 mg/mL for *C. albicans*, outperforming metronidazole and Persica. Marjoram extract also showed notable activity, especially against *S. salivarius* (MIC/MBC: 0.52/2.15 mg/mL). FIC analysis revealed additive effects for clove-marjoram combinations against *S. mutans*, *S. sanguinis*, and *C. albicans*, though a reducing effect was observed for *S. salivarius*. Time-kill studies confirmed enhanced bactericidal effects at 24 hours compared to reference treatments. The additive effects of clove and marjoram extracts show promise as supplementary agents to existing antimicrobial products. Further research is needed to evaluate their safety and efficacy in vivo.

Resumo

De acordo com a medicina tradicional persa, o cravo e a manjerona têm propriedades antibacterianas. Este estudo investiga os seus potenciais efeitos sinérgicos contra agentes patogénicos orais. Os extratos etanólicos de cravo e manjerona foram testados quanto à atividade antimicrobiana contra *Streptococcus mutans*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus sanguinis* e *Candida albicans* utilizando concentração inibitória mínima (CIM), concentração bactericida mínima (CBM), ensaios de tempo de eliminação e índices de concentração inibitória fracionada (CIF). O extrato de cravo demonstrou uma atividade superior, com valores de CIM/MBC de 0,52/1 mg/mL para *S. mutans*, 0,2/1 mg/mL para *S. salivarius* e *S. sanguinis*, e 4/8 mg/mL para *C. albicans*, superando o metronidazol e o Persica. O extrato de manjerona também apresentou uma atividade notável, especialmente contra *S. salivarius* (MIC/MBC: 0,52/2,15 mg/mL). A análise FIC revelou efeitos aditivos para as combinações cravo-manjerona contra *S. mutans*, *S. sanguinis* e *C. albicans*, embora tenha sido observado um efeito redutor para *S. salivarius*. Os estudos de eliminação temporal confirmaram efeitos bactericidas melhorados em 24 horas em comparação com os tratamentos de referência. Os efeitos aditivos dos extratos de cravo e manjerona mostram-se promissores como agentes suplementares aos produtos antimicrobianos existentes. Mais investigação é necessária para avaliar a sua segurança e eficácia in vivo.

Introduction

Alarming statistics reveal that more than two million individuals suffer from infections associated with antimicrobial resistance annually. Projections indicate that by the year 2050, the global mortality rate for these types of infections is expected to escalate to a staggering 10 million deaths per year (1). Dental caries and periodontitis, which are prevalent oral ailments, are primarily caused by bacterial infection and the development of dental plaque (2). The microbial pathogens present in food can lead to spoilage and contribute to the incidence of foodborne diseases. Furthermore, the rapid emergence of resistant bacteria, such as *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, and *Pseudomonas aeruginosa*, has significantly increased, resulting in elevated morbidity and mortality levels (3). To combat these infectious diseases, corrective treatment methods involve the reduction and/or elimination of bacterial accumulations in the retentive sites on the occlusal surfaces and between teeth. This is typically achieved through daily tooth brushing and regular dental cleanings or prophylaxis procedures (4–7).

Given these pressing concerns, there is a dire need to explore additional avenues to discover natural antibacterial agents that possess both safety for human use and specificity in targeting oral pathogens (8). The decline in the research and development of novel antibacterial agents, which can impede the growth of antibiotic-resistant disease-causing microorganisms such as *S. aureus*, exacerbates the ever-increasing problem of antibiotic resistance (9). Furthermore, it is important to note that several chemical disinfectants may potentially pose significant risks to human health and the environment due to their toxic and noxious properties (10–12).

Recently, natural products have been more extensively investigated as promising candidates for preventing oral diseases, particularly those associated with plaque, such as dental caries (13–16). Edible, medicinal, and herbal plants and spices like oregano, rosemary, thyme, sage, basil, turmeric, ginger, garlic, nutmeg, clove, mace, savoury, and fennel have demonstrated successful utilization, either independently or in combination with other

Introdução

Estatísticas alarmantes revelam que mais de dois milhões de indivíduos sofrem de infecções associadas à resistência antimicrobiana anualmente. As projeções indicam que, até 2050, a taxa de mortalidade global por estes tipos de infecções deverá aumentar para uns impressionantes 10 milhões de mortes por ano (1). A cárie dentária e a periodontite, que são doenças orais prevalentes, são causadas principalmente por infecção bacteriana e pelo desenvolvimento de placa bacteriana (2). Os agentes patogénicos microbianos presentes nos alimentos podem causar deterioração e contribuir para a incidência de doenças transmitidas por alimentos. Além disso, o rápido aparecimento de bactérias resistentes, como *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*, aumentou significativamente, resultando em níveis elevados de morbidade e mortalidade (3). Para combater estas doenças infecciosas, os métodos de tratamento corretivo envolvem a redução e/ou eliminação de acumulações bacterianas nos locais de retenção nas superfícies oclusais e entre os dentes. Isto é geralmente conseguido através da escovagem diária dos dentes e de limpezas dentárias regulares ou procedimentos de profilaxia (4–7).

Dadas estas preocupações urgentes, existe uma necessidade extrema de explorar caminhos adicionais para descobrir agentes antibacterianos naturais que possuam segurança para uso humano e especificidade no combate a agentes patogénicos orais (8). O declínio na investigação e desenvolvimento de novos agentes antibacterianos, que podem impedir o crescimento de microrganismos causadores de doenças resistentes aos antibióticos, como o *S. aureus*, agrava o problema cada vez maior da resistência aos antibióticos (9). Além disso, é importante referir que vários desinfetantes químicos podem representar riscos significativos para a saúde humana e para o ambiente devido às suas propriedades tóxicas e nocivas (10–12).

Recentemente, os produtos naturais têm sido mais amplamente investigados como candidatos promissores para a prevenção de doenças orais, particularmente as associadas à placa bacteriana, como a cárie dentária (13–16). Plantas comestíveis, medicinais e herbais e especiarias como orégãos, alecrim, tomilho, sálvia, manjerição, açafraão, gengibre, alho, noz-moscada, cravo, macis, segurelha e funcho demonstraram uma utilização bem-sucedida, independentemente ou em combinação com outros métodos de preservação (16). Um

preservation methods (16). One such natural product, clove (*Syzygium aromaticum*) oil, exhibits remarkable biological activities, including the ability to act as an antibacterial, antifungal, insecticidal, and antioxidant agent, and is traditionally used as a flavouring agent and antimicrobial substance in food (17,18). Moreover, clove oil is also used as an antiseptic in oral infections (19). It has been scientifically documented that clove oil inhibits the growth of moulds, yeasts, and bacteria. It is reported that the investigation and utilization of natural products have enormous potential in combating microbial resistance and enhancing public health (20).

In addition to clove, the marjoram is another plant with many beneficial properties. In traditional Persian medicine, sweet marjoram (*Origanum majorana*) involves dried leaves, leaf extract, and essential oil to treat various conditions, such as respiratory and gastrointestinal issues, and their spasmolytic properties (21). Several studies reported that marjoram possesses various pharmacological characteristics, including but not limited to antioxidant, antibacterial, hepatoprotective, antiulcer, anticoagulant, anti-inflammatory, and antifungal activities. Moreover, many studies have provided evidence of the antibacterial and antifungal properties exhibited by the extracted compounds and its constituent terpinen-4-ol against both Gram-positive and Gram-negative bacteria, as well as fungal strains, including those that are drug-resistant in clinical settings (22–24). Based on the available literature and the recommendation of using cloves together with marjoram, this study aimed to evaluate the potential synergistic effects of a clove and marjoram mixture on some oral pathogens.

Materials and Methods

Plant preparation and identification

Fresh whole marjoram (*Origanum vulgare*) plant was collected from the Khizrabad region of Yazd province and identified by Dr. Mustafa Zare, Assistant Professor of pharmacognosy at the Yazd Natural Resources Research Centre, with herbarium code KHE/Aul31/1400/51. Fresh whole clove (*Syzygium aromaticum*) was purchased commercially (Baridge, Tehran) and identified by Dr. Ebrahim Salimi-Sabour

destes produtos naturais, o óleo de cravo (*Syzygium aromaticum*), também conhecido por cravinho ou cravo-da-Índia, exibe atividades biológicas notáveis, incluindo a capacidade de atuar como agente antibacteriano, antifúngico, inseticida e antioxidante, sendo tradicionalmente utilizado como agente aromatizante e substância antimicrobiana em alimentos (17,18). Além disso, o óleo de cravo é também utilizado como antisséptico em infecções orais (19). Está cientificamente documentado que o óleo de cravo inibe o crescimento de fungos, leveduras e bactérias. É relatado que a investigação e utilização de produtos naturais têm um enorme potencial no combate à resistência microbiana e na melhoria da saúde pública (20).

Para além do cravo, a manjerona é outra planta benéfica com muitas propriedades. Na medicina tradicional persa, a manjerona doce (*Origanum majorana*) envolve folhas secas, extrato de folhas e óleo essencial para tratar várias condições, como problemas respiratórios e gastrointestinais, e as suas propriedades espasmolíticas (21). Vários estudos têm referido que a manjerona possui uma série de características farmacológicas, incluindo, mas não se limitando a atividades antioxidantes, antibacterianas, hepatoprotetoras, antiúlceras, anticoagulante, anti-inflamatória e antifúngica. Além disso, muitos estudos forneceram evidências das propriedades antibacterianas e antifúngicas exibidas pelos compostos extraídos e pelo seu constituinte terpinen-4-ol contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, bem como estirpes de fungos, incluindo aquelas que são resistentes a medicamentos em ambientes clínico (22–24). Com base na literatura disponível e na recomendação do uso de cravo juntamente com manjerona, este estudo teve como objetivo avaliar os potenciais efeitos sinérgicos da mistura de cravo e manjerona sobre alguns agentes patogénicos orais.

Material e Métodos

Preparação e identificação de plantas

A planta (inteira e fresca) de manjerona (*Origanum vulgare*) foi recolhida na região de Khizrabad, na província de Yazd, e identificada pelo Dr. Mustafa Zare, professor assistente de farmacognosia no Centro de Investigação de Recursos Naturais de Yazd, com o código de herbário KHE/Aul31/1400/51. O cravo inteiro fresco (*Syzygium aromaticum*) foi adquirido

at the Medicinal Plants Laboratory of the Faculty of Pharmacy, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

Extraction method

Clove and marjoram were extracted with 70 % ethanol in a percolator, which was kept at room temperature for 24 h. The solvents were then separated by centrifugation, and the extracts were poured into the crystalliser and placed on a serological heater at 45°C, yielding 158.7 g and 160.2 g clove and marjoram extracts, respectively. These extracts were kept at -18°C until use. All solvents were analytical grade (Merck, Germany). To prepare for microbial assays, dried extracts were dissolved in double distilled water containing a small percentage of Tween 80.

Microbial tests

Bacterial strains, growth media and conditions

The *Streptococcus mutans*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus sanguinis* and *Candida albicans* were used to assay clove and marjoram's antimicrobial activity. The cultures were grown in Brain-Heart Infusion (BHI) broth/agar anaerobically at 37°C for 16-18h. Strains were preserved at -80°C in broth containing 10% (v/v) glycerol. Bacterial species were obtained from the National Collection of Industrial Microorganisms of the Islamic Republic of Iran, and fungal species were obtained from the Microbiology Laboratory of the Microbial Research Center of Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

Minimum inhibitory and bactericidal concentrations (MIC & MBC)

Determining the minimum inhibitory concentrations (MICs) for clove and marjoram extracts was conducted using the widely accepted broth dilution method, performed in triplicate to ensure the accuracy and reliability of the results. To test the antibacterial activities, the incubation process was carried out at 37°C, a standard temperature commonly used in microbiological studies, for 24 h under strictly anaerobic conditions, ensuring that the bacteria were exposed to an oxygen-free environment. MICs were determined as the concentration at which the test samples exhibited complete inhibition of visible growth in the broth. Following anaerobic incubation of

no comércio (Baridge, Teerão) e identificado pelo Dr. Ebrahim Salimi-Sabour no Laboratório de Plantas Medicinais da Faculdade de Farmácia da Universidade de Ciências Médicas Baqiyatallah, Teerão, Irão.

Método de extração

O cravo e a manjerona foram extraídos com etanol a 70% num coador, que foi mantido à temperatura ambiente durante 24 h. De seguida, o solvente foi separado por centrifugação, e os extratos foram vertidos no cristalizador e colocados num aquecedor serológico a 45°C para obter 158,7 g e 160,2 g de extratos de cravo e manjerona, respetivamente, que foram mantidos a -18°C até à sua utilização. Todos os solventes eram de grau analítico (Merck, Alemanha). Para preparar os ensaios microbianos, os extractos secos foram dissolvidos em água bidestilada com uma pequena percentagem de Tween 80.

Testes microbianos

Estirpes bacterianas, meios de crescimento e condições

Streptococcus mutans, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus sanguinis* e *Candida albicans* foram utilizados para avaliar a atividade antimicrobiana do cravo e da manjerona. As culturas foram cultivadas em caldo/ágar de infusão cérebro-coração (BHI) anaerobicamente a 37°C durante 16-18h. As estirpes foram preservadas a -80°C em caldo contendo 10% (v/v) de glicerol. As espécies bacterianas foram obtidas da Coleção Nacional de Microrganismos Industriais da República Islâmica do Irão, e as espécies fúngicas foram obtidas do Laboratório de Microbiologia do Centro de Investigação Microbiana da Universidade de Ciências Médicas Baqiyatallah, Teerão, Irão.

Concentrações inibitórias e bactericidas mínimas (CIM & CMB)

A determinação das concentrações inibitórias mínimas (CIMs) para os extratos de cravo e manjerona foi realizada utilizando o método de diluição em caldo amplamente aceite, cuidadosamente realizado em triplicado para garantir a precisão e fiabilidade dos resultados. Para testar as atividades antibacterianas, o processo de incubação foi realizado a 37°C, uma temperatura padrão habitualmente utilizada em estudos microbiológicos, durante 24 horas em condições estritamente anaeróbicas, garantindo que as bactérias eram expostas a um ambiente livre de oxigénio. As CIMs foram determinadas como a concentração à qual as amostras de teste exibiram uma inibição completa do crescimento visível no caldo. Após a incubação anaeróbia das placas de CIMs,

the MICs plates, Minimum Bactericidal Concentrations (MBCs) were then determined based on the lowest concentration of both clove and marjoram that effectively killed 99.9% of the test bacteria. This was achieved by plating the test bacteria onto each appropriate agar plate and analysing the results. In order to accurately compare the sensitivity of the clove and marjoram extracts to the bacteria tested, a standard antibiotic, metronidazole, and Persica, a commercially available natural antimicrobial oral treatment (extract of *S. persica*), were used as reference points to better assess the antibacterial capabilities of these natural extracts (24).

Fractional inhibitory concentration (FIC)

The checkerboard method was used to obtain extract combinations' fractional inhibitory concentration (FIC) index. The experimental procedure was conducted on four different microorganisms, namely *C. albicans*, *S. salivarius*, *S. sanguinis* and *S. mutans*. The nutrient broth was used to prepare the dilutions of the herbal extracts, following the broth dilution method guidelines mentioned above. When combined, each antimicrobial agent's concentration range was from 1/32 times MIC to 4 times the MIC.

Plates consisting of columns and rows of Eppendorf tubes were used for the experiment. Each tube oriented vertically was filled with 500 µl of the corresponding dilution of extract "A", while the tubes oriented horizontally were filled with 500 µl of the corresponding dilution of extract "B". Consequently, the plate contained numerous concentration combinations of the two extracts. In the next step, each tube was inoculated with 100 µl of a bacterial suspension prepared according to the broth dilution method mentioned above at a concentration of 10^8 (CFU/ml).

The plates were then incubated at 37°C for 24 hours. The FIC was calculated by dividing the MIC of extract "A" in combination with the MIC of extract "A" alone, expressed as $FICA = (MIC_{A \text{ combination}} / MIC_{A \text{ alone}})$. Similarly, the FIC for extract 'B' was determined by dividing the MIC of extract 'B' in combination with the MIC of extract 'B' alone, expressed as $FICB = (MIC_{B \text{ combination}} / MIC_{B \text{ alone}})$. The FIC index was then obtained by adding the values of FICA and FICB. The results were then interpreted as synergy ($FIC \leq 0.5$), addition ($0.5 < FIC \leq 1$), indifference ($1 < FIC \leq 4$) or antagonism ($FIC > 4$).

foram determinadas as Concentrações Bactericidas Mínimas (CBMs) com base na menor concentração de cravo e manjerona que matou eficazmente uns impressionantes 99,9% das bactérias de teste. Isto foi conseguido semeando as bactérias de teste em cada placa de ágar apropriada e analisando cuidadosamente os resultados. Para comparar com precisão a sensibilidade dos extractos de cravo e da manjerona às bactérias testadas, foi utilizado um antibiótico padrão, o metronidazol, e Persica, um tratamento oral antimicrobiano natural disponível no mercado (extrato de *S. persica*), como pontos de referência para avaliar melhor as capacidades antibacterianas destes extractos naturais (24).

Concentração inibitória fracionada (CIF)

O método do tabuleiro de xadrez foi utilizado para obter o índice de concentração inibitória fracionada (CIF) das combinações de extratos. O procedimento experimental foi realizado especificamente em quatro microrganismos diferentes, nomeadamente *C. albicans*, *S. salivarius*, *S. sanguinis* e *S. mutans*. O caldo nutritivo foi utilizado para preparar as diluições dos extratos de ervas, seguindo as diretrizes do método de diluição do caldo acima referidas. Quando combinados, o intervalo de concentração de cada agente antimicrobiano variou de 1/32 vezes a CIM a 4 vezes a CIM.

Foram utilizadas placas compostas por colunas e fileiras de tubos Eppendorf para as experiências. Cada tubo foi orientado verticalmente e preenchido com 500 µl da diluição correspondente do extrato "A", enquanto os tubos orientados horizontalmente foram preenchidos com 500 µl da diluição correspondente do extrato "B". Consequentemente, a placa continha uma infinidade de combinações de concentração dos dois extratos. Na etapa seguinte, cada tubo foi inoculado com 100 µl de uma suspensão bacteriana preparada de acordo com o método de diluição em caldo acima referido à concentração de 10^8 (UFC/ml).

Seguinte, as placas foram incubadas a 37°C durante 24 horas. O CIF foi calculado através da divisão do CIM do extrato "A" em combinação com o CIM do extrato "A" isolado, expresso como $CIFA = (CIM_{A \text{ combinação}} / CIM_{A \text{ isolado}})$. Da mesma forma, o CIF para o extrato 'B' foi determinado pela divisão do CIM do extrato 'B' em combinação com o CIM do extrato 'B' sozinho, expresso como $CIFB = (CIM_{B \text{ combinação}} / CIM_{B \text{ sozinho}})$. O índice CIF foi então obtido pela soma dos valores de CIFA e CIFB. Os resultados foram então interpretados como sinergia ($CIF \leq 0,5$), adição ($0,5 < CIF \leq 1$), indiferença ($1 < CIF \leq 4$) ou antagonismo ($CIF > 4$).

Time-kill curves

The clove and marjoram extracts' bactericidal activity in this study was also evaluated using time-kill curves on several microorganisms, including *C. albicans*, *S. salivarius*, *S. sanguinis* and *S. mutans*. To perform the evaluation, tubes containing Mueller-Hinton medium supplemented with antibiotics at the minimum inhibitory concentration (MIC) were first inoculated with a suspension of the test strain. The positive controls of metronidazole and Persica were used at 50 mg/ml and 100 mg/ml, respectively. A negative control (treatment-free) was also included. The final bacterial counts were between 0.5×10^6 (CFU/mL) and 6.5×10^6 CFU/mL.

The tubes were then incubated at 37 °C in an anaerobic chamber. To determine the viability of the microorganisms, bacterial counts were performed at several time points, specifically, 0, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 12 and 24 hours after adding the antimicrobial agents. These counts were performed on agar plates incubated in the anaerobic chamber at 37 °C for a maximum of 48 hours. To minimise the potential carryover of antibiotics, washes were performed by centrifugation followed by serial 10-fold dilution in sterile phosphate-buffered saline at pH 7.3. Colony counts were performed in duplicate, and the mean of these counts was calculated.

Statistical analysis

All experiments were independently replicated three times. The UNIANOVA multivariate variance test using the SPSS statistical software package (Version 21) was analysed by the Kolmogorov Smirnov tests to evaluate the normality of data. $P < 0.05$ was regarded as the level of significant difference.

Results

Antibacterial activity

Table 1 shows the antibacterial activities of clove and marjoram extracts, metronidazole, and Persica against oral bacteria.

Curvas de tempo de eliminação

A atividade bactericida dos extratos de cravo e manjerona neste estudo foi também avaliada através de curvas tempo-morte em vários microrganismos, incluindo *C. albicans*, *S. salivarius*, *S. sanguinis* e *S. mutans*. Para a realização da avaliação, os tubos contendo meio Mueller-Hinton suplementado com antibióticos na concentração inibitória mínima (CIM) foram primeiramente inoculados com uma suspensão da estirpe teste. Os controles positivos de metronidazol e Persica foram utilizados a 50 mg/ml e 100 mg/ml, respectivamente. Foi também incluído um controle negativo (sem tratamento). As contagens bacterianas finais situaram-se entre $0,5 \times 10^6$ (UFC/mL) e $6,5 \times 10^6$ UFC/mL.

Os tubos foram depois incubados a 37 °C numa câmara anaeróbica. Para determinar a viabilidade dos microrganismos, foram realizadas contagens bacterianas em vários momentos, nomeadamente 0, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 12 e 24 horas após a adição dos agentes antimicrobianos. Estas contagens foram realizadas em placas de ágar incubadas em câmara anaeróbia a 37 °C durante um máximo de 48 horas. Para minimizar o potencial de transferência de antibióticos, as lavagens foram realizadas por centrifugação seguida de uma diluição em série de 10 vezes em solução salina tamponada com fosfato estéril a pH 7,3. As contagens de colónias foram realizadas em duplicado e foi calculada a média dessas contagens.

Análise estatística

Todas as experiências foram replicadas três vezes de forma independente. O teste de variância multivariada UNIANOVA utilizando o pacote de software estatístico SPSS (versão 21) foi analisado pelos testes de Kolmogorov Smirnov para avaliar a normalidade dos dados. $P < 0,05$ foi considerado o nível de diferença significativa.

Resultados

Atividade antibacteriana

As atividades antibacterianas dos extratos de cravo e manjerona, metronidazol e Persica contra as bactérias orais são apresentadas na Tabela 1.

Table 1 - Antibacterial activity of clove and marjoram extract against oral bacteria (mg/mL).

Tabela 1 - Atividade antibacteriana do extrato de cravo e manjerona contra bactérias orais (mg/mL).

Strain / Estirpe	Clove extract / Extrato de cravo		Marjoram extract / Extrato de manjerona		Metronidazole / Metronidazol		Persica	
	MIC / CIM	MBC/ CMB	MIC / CIM	MBC/ CMB	MIC / CIM	MBC/ CMB	MIC / CIM	MBC / CMB
<i>C. albicans</i>	4	8	12.5	25	0	0	0	0
<i>S. salivarius</i>	0.5	1	6.25	12.5	0.625	1.25	0.625	1.25
<i>S. sanguinis</i>	0.5	1	0.78	1.56	0.625	1.25	0.321	0.625
<i>S. mutans</i>	0.25	1	0.78	1.56	0.078	0.156	0.000	0.001

Table 2 - Antibacterial activity of clove and marjoram extract against oral bacteria (mg/mL).

Tabela 2 - Atividade antibacteriana do extrato de cravo e manjerona contra bactérias orais (mg/mL).

Strain / Estirpe	<i>S. mutans</i>	<i>S. sanguinis</i>	<i>S. salivarius</i>	<i>C. albicans</i>
FIC / CIF	3.6	2.4	6.36	2.37

Additive effect

The results of the FIC test showed that the combination of clove and marjoram extracts had an additive effect on *C. albicans*, *S. mutans* and *S. sanguinis* strains and a reducing effect on *S. salivarius* species (Table 2).

Time-killing testing

The results of the Time Kill Testing of clove and marjoram extracts were based on the number of colonies counted over 24 hours compared with the controls on *C. albicans* species. The vertical column indicates the number of colonies.

The results showed that the clove and marjoram extracts were more effective than metronidazole and Persica extracts on *C. albicans* species. Our results showed that the number of *C. albicans* colonies after exposure to clove and marjoram extracts reached its lowest within 8 hours. The extract of clove was more lethal than marjoram (Figure 1).

For *S. salivarius*, the number of colonies exposed to clove and marjoram extracts within 24 hours decreased significantly compared to metronidazole and Persica, reaching zero in a shorter time. Exposure to clove extract decreased the number of *S. salivarius* colonies faster than those exposed to marjoram extract over 24 hours (Figure 2).

Efeito sinérgico

Os resultados do teste CIF mostraram que a combinação dos extratos de cravo e manjerona teve um efeito aditivo nas estirpes de *C. albicans*, *S. mutans* e *S. sanguinis* e um efeito redutor nas espécies de *S. salivarius* (Tabela 2).

Testes de tempo de eliminação

Os resultados do teste de tempo de eliminação dos extratos de cravo e manjerona basearam-se no número de colónias contadas ao longo de 24 horas, em comparação com os controlos nas espécies de *C. albicans*. A coluna vertical indica o número de colónias.

Os resultados mostraram que os extratos de cravo e manjerona tiveram um melhor efeito letal do que os extratos de metronidazol e Pêrsica nas espécies de *C. albicans*. Os nossos resultados mostraram que o número de colónias de *C. albicans* após exposição ao cravo e à manjerona atingiu o seu nível mais baixo em 8 horas. O efeito letal do cravo foi mais potente que o da manjerona (Figura 1).

Para o *S. salivarius*, o número de colónias expostas aos extratos de cravo e manjerona em 24 horas diminuiu significativamente em comparação com o metronidazol e o Persica, atingindo zero num tempo mais curto. Além disso, o número de colónias de *S. salivarius* expostas ao cravo diminuiu mais rapidamente do que as expostas à manjerona em 24 horas (Figura 2).

For the *S. sanguinis* species, the time to reach zero colony count was faster with clove and marjoram than metronidazole and Persica at 24 hours. The time to reach zero was calculated to be 18 hours for clove and marjoram extracts and 24 hours for metronidazole and persica (Figure 3).

For the *S. mutans* species, metronidazole, Persica, marjoram and clove were almost equally effective in reducing the number of colonies during the first 8 hours. The speed of reaching zero *S. mutans* colonies in 24 hours was faster with exposure to clove and marjoram compared to persica and metronidazole. Marjoram and clove had almost the same effect on *S. mutans* within 24 hours (Figure 4).

Para a espécie *S. sanguinis*, o tempo para atingir a contagem zero de colónias foi mais rápido com cravo e manjerona do que com metronidazol e Persica em 24 horas. O tempo para atingir o zero foi calculado em 18 horas para os extratos de cravo e manjerona e 24 horas para o metronidazol e persica (Figura 3).

Para a espécie *S. mutans*, o metronidazol, a Persica, a manjerona e o cravo foram quase igualmente eficazes na redução do número de colónias durante as primeiras 8 horas. A velocidade de atingir zero colónias de *S. mutans* em 24 horas foi maior com a exposição ao cravo e à manjerona em comparação com a persica e o metronidazol. A manjerona e o cravo tiveram quase o mesmo efeito sobre o *S. mutans* em 24 horas (Figura 4).

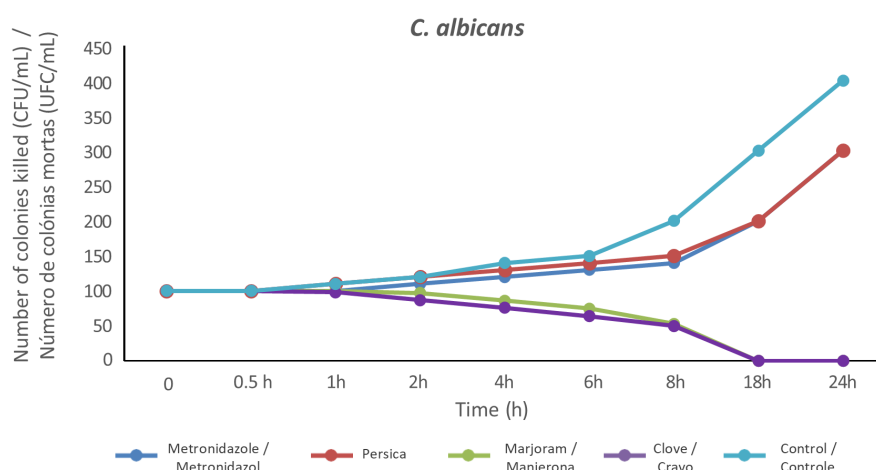


Figure 1 - Time Kill testing of clove and marjoram extracts against *C. albicans*.

Figura 1 - Teste Tempo de Eliminações de extractos de cravo e manjerona contra *C. albicans*.

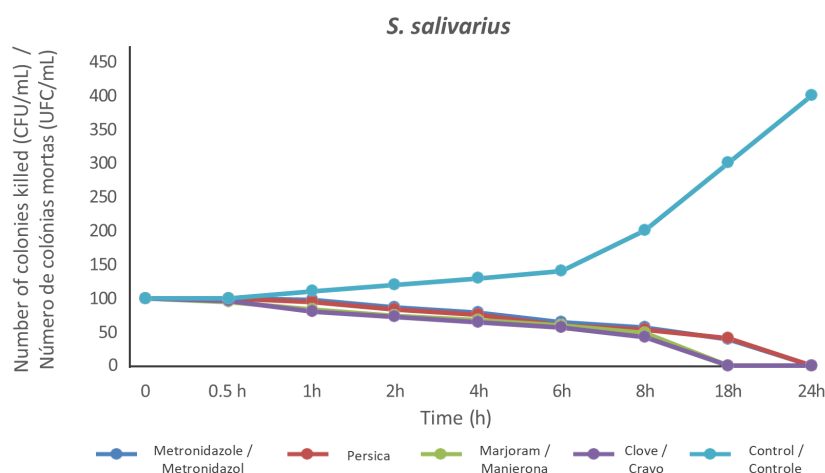


Figure 2 - Time Kill testing of clove and marjoram extracts against *S. salivarius*.

Figura 2 - Teste Tempo de Eliminações de extractos de cravo e manjerona contra *S. salivarius*.

Discussion

The results showed that the MIC of clove extract on *S. salivarius* and *S. sanguinis* was 0.5 mg/ml, which showed a better effect than marjoram extract and metronidazole. The MIC of clove extract on *S. mutans* species was 0.25, showing a better inhibitory effect than marjoram extract (MIC = 0.78 mg/mL).

Also, metronidazole and Persica had a better inhibitory effect on *S. mutans* than clove and marjoram extracts (metronidazole with MIC = 0.078, Persica with MIC = 0.00039). Our results showed that clove extract (MBC = 1) killed *S. salivarius* and *S. sanguinis* bacteria more effectively than marjoram extract and metronidazole. The results in Table 1 show that clove extract significantly impacted

Discussão

Os resultados mostraram que a CIM do extrato de cravo sobre *S. salivarius* e *S. sanguinis* foi de 0,5 mg/ml, o que apresentou um melhor efeito do que o extrato de manjerona e o metronidazol. O CIM do extrato de cravo sobre a espécie *S. mutans* foi de 0,25, apresentando um melhor efeito inibitório do que o extrato de manjerona (CIM = 0,78 mg/mL).

Além disso, o metronidazol e o Persica tiveram um melhor efeito inibitório sobre o *S. mutans* do que os extratos de cravo e manjerona (metronidazol com CIM = 0,078, Persica com CIM = 0,00039). Os nossos resultados mostraram que o extrato de cravo (MBC = 1) matou melhor as bactérias *S. salivarius* e *S. sanguinis* do que o extrato de manjerona e o metronidazol. Os resultados da Tabela 1 mostram que o extrato

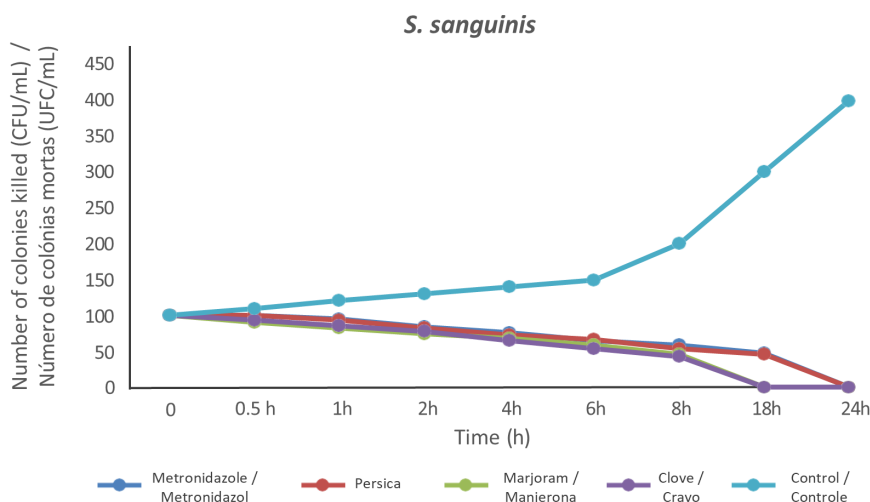


Figure 3 - Time Kill testing of clove and marjoram extracts against *S. sanguinis*.

Figura 3 - Teste Tempo de Eliminações de extractos de cravo e manjerona contra *S. sanguinis*

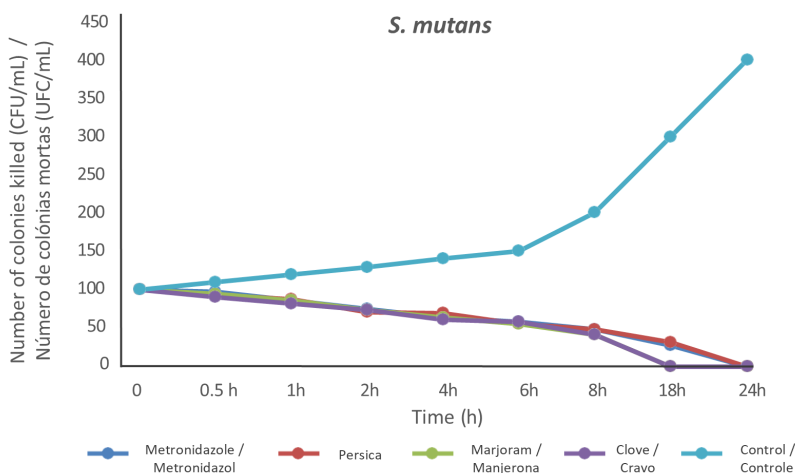


Figure 4 - Time Kill testing of clove and marjoram extracts against *S. mutans*.

Figura 4 - Teste Tempo de Eliminações de extractos de cravo e manjerona contra *S. mutans*.

the inhibition and lethality of *C. albicans* species. In contrast, marjoram extract and metronidazole did not affect the growth of *C. albicans* species. The results demonstrate that clove and marjoram extracts exhibit significant antimicrobial activity against oral pathogens. Notably, clove extract consistently outperformed marjoram extract in inhibiting and killing bacteria, likely due to its higher concentration of bioactive compounds. The FIC indices, however, reveal that the combination of these extracts results in an additive effect rather than true synergy, except for *S. salivarius*, where an antagonistic or indifferent effect was observed.

Many herbal drugs traditionally used in medical systems are documented in pharmacopoeias as agents used to treat infections, and many of these medicines have recently been investigated for their efficacy in controlling oral microbial pathogens (13,20,25). Previous studies have thoroughly investigated and analysed the broad-spectrum antimicrobial activities of medicinal plants and plant-derived products, such as essential oils and extracts. Numerous studies have convincingly demonstrated the synergistic effects of essential oil and extracts from different plants when combined with synthetic drugs, resulting in highly effective antifungal and antibacterial agents (26,27).

Clove has a significant ability to effectively disrupt the structural integrity of cell walls and membranes in various microorganisms and, as a result, disrupt their overall function. In addition, this potent natural drug can cross cytoplasmic membranes or even penetrate the cellular matrix itself, thereby gaining access to the inner sanctum of these microorganisms. Once inside, the clove exerts its inhibitory effects on the normal synthesis of DNA and proteins, disrupting the intricate processes crucial to proper functioning (28).

The present work applied a serial broth dilution method to examine and evaluate clove and marjoram extracts' in vitro antibacterial properties. The objective was to ascertain the effectiveness of these extracts against specific microorganisms (*C. albicans*, *S. salivarius*, *S. sanguinis*, and *S. mutans*) that contribute to the development of numerous medical conditions. Metronidazole and Persica were used as positive controls. Our results indicated that the MICs

de cravo teve um impacto significativo na inibição e letalidade das espécies de *C. albicans*, enquanto o extrato de manjerona e o metronidazol não afetaram o crescimento das espécies de *C. albicans*. Os resultados demonstram que os extratos de cravo e manjerona apresentam uma atividade antimicrobiana significativa contra agentes patogénicos orais. Notavelmente, o extrato de cravinho superou consistentemente o extrato de manjerona na inibição e eliminação de bactérias, provavelmente devido à sua maior concentração de compostos bioativos. Os índices CIF, no entanto, revelam que a combinação destes extratos resulta num efeito aditivo em vez de uma verdadeira sinergia, exceto para *S. salivarius*, onde foi observado um efeito antagónico ou indiferente.

Muitos medicamentos à base de plantas tradicionalmente utilizados nos sistemas médicos estão documentados nas farmacopeias como agentes utilizados para tratar infeções, e muitos destes medicamentos foram recentemente investigados quanto à sua eficácia no controlo de agentes patogénicos microbianos orais (13,20,25). Estudos anteriores investigaram e analisaram exaustivamente as atividades antimicrobianas de largo espectro de plantas medicinais e produtos derivados de plantas, como óleos essenciais e extratos. Numerosos estudos demonstraram de forma convincente os efeitos sinérgicos do óleo essencial e dos extratos de diferentes plantas quando combinados com fármacos sintéticos, resultando em agentes antifúngicos e antibacterianos altamente eficazes (26,27).

O cravo tem uma capacidade significativa de romper eficazmente a integridade estrutural das paredes e membranas celulares em vários microrganismos e, como resultado, perturbar a sua função global. Além disso, este potente fármaco natural pode atravessar as membranas citoplasmáticas ou mesmo penetrar na própria matriz celular, ganhando assim acesso ao santuário interno destes microrganismos. Uma vez no interior, o cravinho exerce os seus efeitos inibitórios na síntese normal de ADN e proteínas, interrompendo os intrincados processos cruciais para o funcionamento adequado (28).

O presente trabalho aplicou um método de diluição em caldo em série para examinar e avaliar as propriedades antibacterianas in vitro dos extratos de cravo e manjerona. O objetivo foi verificar a eficácia destes extratos contra microrganismos específicos (*C. albicans*, *S. salivarius*, *S. sanguinis* e *S. mutans*) que contribuem para o desenvolvimento de inúmeras condições médicas. O metronidazol e a Persica foram utilizados como controlos positivos. Os nossos resultados indicaram que os CIMs dos

of the tested extracts exhibited potent antibacterial activity against *C. albicans* compared to the positive controls, metronidazole and Persica.

Interestingly, the combination of clove and marjoram possessed comparable or even superior antifungal and antibacterial properties compared to the well-known pharmaceutical agents, including metronidazole and Persica. This observation strongly suggests the synergistic effect against the notorious pathogens *C. albicans*, *S. salivarius*, and *S. mutans*. Consequently, the use of these natural mixtures could potentially lead to a reduction in the adverse effects commonly associated with traditional antimicrobial drugs. Remarkably, when comparing the effectiveness of the individual plant extracts against three different bacterial species, it was evident that the singular extract demonstrated superior antibacterial properties compared to the mixtures of clove and marjoram. However, it is worth noting that there were instances where the minimum inhibitory concentrations (MICs) of the plant extract were occasionally less favourable than those of the extract mixtures when explicitly tested against *C. albicans*.

While additive effects still enhance antimicrobial efficacy, the terminology in the discussion must reflect this distinction. Describing the interaction as "synergistic" is inconsistent with the FIC values and may mislead readers. The observed additive effects are nonetheless valuable, as they suggest that combining these extracts could reduce the required concentrations of individual components, potentially lowering toxicity risks.

A series of experiments known as time-kill assays were designed and conducted to assess and measure the dynamic and intricate nature of the process by which the extract derived from the clove plant eradicates and eliminates harmful microorganisms. These assays involved the use and application of inhibitory and bacteriostatic concentrations, which allowed for a comprehensive understanding and evaluation of the extract's potent and effective properties. The subsequent time-kill kinetic study yielded intriguing and compelling results, demonstrating that the ethanolic extract of both marjoram and clove exhibited significant efficacy and effectiveness against the notorious and harmful oral pathogenic microorganisms that pose a significant threat to human health.

extratos testados exibiram uma potente atividade antibacteriana contra *C. albicans* em comparação com os controlos positivos, metronidazol e Persica.

Curiosamente, a combinação de cravo e manjerona possuía propriedades antifúngicas e antibacterianas comparáveis ou mesmo superiores às dos agentes farmacêuticos mais conhecidos, incluindo o metronidazol e o Persica. Esta observação sugere fortemente o efeito sinérgico contra os notórios agentes patogénicos *C. albicans*, *S. salivarius* e *S. mutans*. Consequentemente, a utilização destas misturas naturais poderá potencialmente levar a uma redução dos efeitos adversos habitualmente associados aos medicamentos antimicrobianos tradicionais. Notavelmente, ao comparar a eficácia dos extratos individuais da planta contra três espécies bacterianas diferentes, tornou-se evidente que o extrato singular demonstrou propriedades antibacterianas superiores em comparação com as misturas de cravo e manjerona. No entanto, é de salientar que houve casos em que as concentrações inibitórias mínimas (CIMs) do extrato da planta foram ocasionalmente menos favoráveis do que as das misturas de extratos quando testadas explicitamente contra *C. albicans*.

Embora os efeitos aditivos ainda aumentem a eficácia antimicrobiana, a terminologia na discussão deve reflectir esta distinção. Descrever a interação como "sinérgica" é inconsistente com os valores da FIC e pode induzir em erro os leitores. Os efeitos aditivos observados são, no entanto, valiosos, pois sugerem que a combinação destes extratos pode reduzir as concentrações necessárias de componentes individuais, diminuindo potencialmente os riscos de toxicidade.

Uma série de experiências meticulosamente concebidas e executadas, conhecidas como ensaios de eliminação de tempo, foram realizadas para avaliar e medir a natureza dinâmica e complexa do processo pelo qual o extrato derivado da planta cravo erradica e elimina microrganismos nocivos. Estes ensaios envolveram a utilização e aplicação de concentrações inibitórias e bacteriostáticas, o que permitiu uma compreensão e avaliação abrangentes das propriedades potentes e eficazes do extrato. O estudo cinético de tempo de eliminação subsequente, que foi meticulosamente concebido e conduzido, produziu resultados intrigantes e convincentes, demonstrando que o extrato etanólico de manjerona e cravo exibiu uma eficácia e eficiência significativas contra os notórios e prejudiciais microrganismos patogénicos orais que representam uma ameaça significativa para a saúde humana.

A challenge associated with this particular form of testing is the lack of consistency in the criteria chosen to test the antimicrobial properties of extracts. The final results of a given test can be influenced by several factors, including the specific technique used to extract the extracts from the plant material, the exact composition of these extracts, the organism tested, the volume of sample used, the growth stage of the organism, the specific culture medium used, the pH of the medium, and the duration and temperature of incubation. As a result of these many variables, the process of comparing and contrasting published data becomes quite complex and convoluted (29,30).

The measured minimum inhibitory concentrations (MIC) of clove extract against *C. albicans* documented in this study were comparatively lower than those reported in a separate published report (25). This variation could be attributed to environmental factors that affect the extract constituents. In other studies, the MIC value of clove and marjoram essential oils against *C. albicans* was lower than in our study, indicating the favourable inhibitory effect of the essential oil compared to the extract (31,32). The potent antimicrobial activity of clove extract has been demonstrated against microorganisms that cause dental caries.

In one study, the highest antimicrobial activity of ethanol extract of clove was found against *Streptococcus mutans* with MIC 25 mg/ml (33), which is higher than MIC in this study (0.25 mg/ml). The observed difference may be due to the different extraction methods, the plant collection time or the experiment's precision. The MIC and MBC values of clove essential oil obtained in the present study against *S. mutans* and *S. sanguinis* were relatively similar to previous reports (34). The MIC and MBC values of clove extract against *S. salivarius* are comparable to other studies and confirm the results of the present study (35).

Another study analysing the time to kill and kill kinetics of clove essential oil against *S. suis* found that survival was stopped entirely after 15 min of exposure to clove essential oil, indicating strong effects. Clove essential oil is bactericidal. The difference in killing time in the present study was due to the difference between the essential oil and extract and the tested pathogens (36). Notably, the results of the present work are comparable to various studies about the antimicrobial effects of the tested plants.

Um desafio associado a esta forma específica de teste é a falta de consistência nos critérios escolhidos para testar as propriedades antimicrobianas dos extratos. Os resultados finais de um determinado teste podem ser influenciados por vários fatores, incluindo a técnica específica utilizada para extrair os extratos do material vegetal, a composição exata desses extratos, o organismo testado, o volume de amostra utilizado, a fase de crescimento do organismo, o meio de cultura específico utilizado, o pH do meio e a duração e temperatura da incubação. Como resultado destas muitas variáveis, o processo de comparação e contraste dos dados publicados torna-se bastante complexo e confuso (29,30).

As concentrações inibitórias mínimas (CIM) medidas do extrato de cravo contra *C. albicans* documentadas neste estudo foram comparativamente mais baixas do que as relatadas num relatório publicado separado (25). Esta variação pode ser atribuída a fatores ambientais que afetam os constituintes do extrato. Noutros estudos, o valor de CIM dos óleos essenciais de cravo e manjerona contra *C. albicans* foi inferior ao do nosso estudo, indicando o efeito inibitório favorável do óleo essencial em comparação com o extrato (31,32). A potente atividade antimicrobiana do extrato de cravo foi demonstrada contra microrganismos causadores de cáries dentárias.

Num estudo, a maior atividade antimicrobiana do extrato etanólico de cravo foi encontrada contra *Streptococcus mutans* com CIM 25 mg/ml (33). Que é superior ao CIM neste estudo (0,25 mg/ml). A diferença observada pode dever-se aos diferentes métodos de extração, ao tempo de recolha da planta ou à precisão da experiência. Além disso, os valores de CIM e MBC do óleo essencial de cravo obtidos no presente estudo contra *S. mutans* e *S. sanguinis* foram relativamente semelhantes aos relatórios anteriores (34). O *S. salivarius* é também uma das espécies patogénicas orais investigadas no presente estudo. Os valores de CIM e MBC do extrato de cravo contra esta estirpe são comparáveis aos de outros estudos e confirmam os resultados do presente estudo (35).

Outro estudo que analisou o tempo de morte e a cinética de morte do óleo essencial de cravo contra *S. suis* descobriu que a sobrevivência foi interrompida completamente após 15 minutos de exposição ao óleo essencial de cravo, indicando efeitos fortes. O óleo essencial de cravo é bactericida. A diferença no tempo de eliminação no presente estudo deveu-se à diferença entre o óleo essencial e o extrato e os agentes patogénicos testados (36). Notavelmente, os resultados do presente trabalho são comparáveis a vários estudos sobre os efeitos antimicrobianos das plantas testadas.

While this study demonstrated the antimicrobial potential of clove and marjoram extracts against oral pathogens, it is crucial to acknowledge the limitations of in vitro models. These findings may not fully translate to in vivo conditions due to the complexity of the human oral environment, including factors such as dilution by saliva, interactions with other microbiota, enzymatic activity, and immune responses. Future studies should focus on validating these results using animal models or clinical trials to assess efficacy and safety under physiological conditions.

Although clove and marjoram extracts showed promising antimicrobial activity, the potential toxicity of these extracts at the concentrations tested has not been evaluated. When used in high concentrations, natural extracts can still cause adverse reactions such as mucosal irritation, allergic responses, or toxicity (37). Cytotoxicity studies on oral epithelial cells and systemic toxicity assessments in animal models are necessary before these extracts can be recommended for use in formulations like mouthwashes or dental gels (12).

To bridge the gap between in vitro and clinical applications, future studies should include testing the efficacy and safety of clove and marjoram extracts in reducing oral pathogen loads in vivo, conducting randomized controlled trials to evaluate their effectiveness in humans and comparing them with conventional oral care products, and determining safe concentration thresholds and potential adverse effects through comprehensive toxicological evaluations. Chemical characterization and antigenotoxic and antioxidant studies regarding these extracts could bring valuable insight (38–40).

Embora este estudo tenha demonstrado o potencial antimicrobiano dos extratos de cravo e manjerona contra agentes patogênicos orais, é crucial reconhecer as limitações dos modelos in vitro. Estas descobertas podem não ser totalmente traduzidas para condições in vivo devido à complexidade do ambiente oral humano, incluindo fatores como a diluição pela saliva, interações com outra microbiota, atividade enzimática e respostas imunitárias. Estudos futuros devem focar-se na validação destes resultados utilizando modelos animais ou ensaios clínicos para avaliar a eficácia e a segurança em condições fisiológicas.

Embora os extratos de cravo e manjerona tenham apresentado uma atividade antimicrobiana promissora, a potencial toxicidade destes extratos nas concentrações testadas não foi avaliada. Quando utilizados em concentrações elevadas, os extratos naturais podem ainda causar reações adversas, como irritação da mucosa, respostas alérgicas ou toxicidade (37). Estudos de citotoxicidade em células epiteliais orais e avaliações de toxicidade sistêmica em modelos animais são necessários antes que estes extratos possam ser recomendados para utilização em formulações como colutórios ou géis dentários (12).

Para preencher a lacuna entre as aplicações clínicas e in vitro, os estudos futuros devem incluir testes de eficácia e segurança de extratos de cravo e manjerona na redução das cargas de agentes patogênicos orais in vivo, conduzindo ensaios clínicos randomizados para avaliar a sua eficácia em humanos e comparando-os com produtos convencionais de cuidados orais, e determinando limites de concentração seguros e potenciais efeitos adversos através de avaliações toxicológicas abrangentes. Além disso, a caracterização química e os estudos antigenotóxicos e antioxidantes destes extratos podem trazer insights fascinantes (38-40).

Conclusion

This study highlights the antimicrobial potential of clove and marjoram extracts against oral pathogens, demonstrating additive effects when used in combination. Clove extract showed superior efficacy compared to marjoram, and the combination improved killing efficiency, as confirmed by time-kill assays. While these findings are promising, the FIC results indicate additive effects rather than true synergy for most strains, underscoring the need for precise interpretation of data.

Using these extracts as supplementary agents in oral care formulations, such as mouthwashes and dental gels, warrants further exploration. However, translating these findings into clinical applications requires addressing the limitations of in vitro studies, including potential differences in vivo and toxicity risks. Future research should prioritize safety evaluations, mechanism studies, and trials in complex biological systems.

Authors Contributions Statement

Conceptualization: Ebrahim Salimi-Sabour; Methodology, validation, analysis, investigation, and resources: Mohammad Sheykhan, Ebrahim Salimi-Sabour, Reza Mirnejad, Seyed Mohammad Zarei, Mozghan Kheirandish, Mohammad Amrollahi-Sharifabadi, Sahar Abdelaziz; Data curation, original draft preparation, editing, and reviewing: Mohammad Sheykhan, Reza Mirnejad, Seyed Mohammad Zarei, Ebrahim Salimi-Sabour, Mohammad Amrollahi-Sharifabadi, Mozghan Kheirandish, Sahar Abdelaziz, Sara Gonçalves, Maryam Mosaffa-Jahromi; Visualization, supervision, and project administration: Ebrahim Salimi-Sabour, Mohammad Sheykhan, Reza Mirnejad, Seyed Mohammad Zarei, Mozghan Kheirandish, Mohammad Amrollahi-Sharifabadi, Sahar Abdelaziz. All authors read and approved the final version of the manuscript.

Funding

The Baqiyatallah University of Medical Sciences's research council supported this research.

Conclusões

Este estudo destaca o potencial antimicrobiano dos extratos de cravo e manjerona contra agentes patogênicos orais, demonstrando efeitos aditivos quando utilizados em combinação. O extrato de cravo demonstrou uma eficácia superior quando comparado com a manjerona, e a combinação melhorou a eficiência de eliminação, como confirmado pelos ensaios de tempo de eliminação. Embora estas descobertas sejam promissoras, os resultados do CIF indicam efeitos aditivos em vez de verdadeira sinergia para a maioria das estirpes, sublinhando a necessidade de interpretação precisa dos dados.

A utilização destes extratos como agentes suplementares em formulações de cuidados orais, como colutórios e géis dentários, justifica uma exploração mais aprofundada. No entanto, traduzir estas descobertas em aplicações clínicas exige abordar as limitações dos estudos in vitro, incluindo potenciais diferenças in vivo e riscos de toxicidade. A investigação futura deve priorizar avaliações de segurança, estudos de mecanismos e ensaios em sistemas biológicos complexos.

Declaração sobre as contribuições do autor

Conceituação: Ebrahim Salimi-Sabour; Metodologia, validação, análise, investigação e recursos: Mohammad Sheykhan, Ebrahim Salimi-Sabour, Reza Mirnejad, Seyed Mohammad Zarei, Mozghan Kheirandish, Mohammad Amrollahi-Sharifabadi, Sahar Abdelaziz; Curadoria de dados, preparação do rascunho original, edição e revisão: Mohammad Sheykhan, Reza Mirnejad, Seyed Mohammad Zarei, Ebrahim Salimi-Sabour, Mohammad Amrollahi-Sharifabadi, Mozghan Kheirandish, Sahar Abdelaziz, Sara Gonçalves, Maryam Mosaffa-Jahromi; Visualização, supervisão e administração do projeto: Ebrahim Salimi-Sabour, Mohammad Sheykhan, Reza Mirnejad, Seyed Mohammad Zarei, Mozghan Kheirandish, Mohammad Amrollahi-Sharifabadi, Sahar Abdelaziz. Todos os autores leram e aprovaram a versão final do manuscrito.

Financiamento

O conselho de investigação da Universidade de Ciências Médicas Baqiyatallah apoiou esta investigação.

Ethical Approval

This study was approved by the ethics committee of Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran, under the ethics code of IR.BMSU.BLC.1401.003.

Acknowledgements

We want to thank the deputy of the research council and the Baqiyatallah University of Medical Sciences research council members who supported the current work.

Conflict of Interests

The authors declare no conflict of interest.

Aprovação Ética

Este estudo foi aprovado pelo comitê de ética da Universidade de Ciências Médicas Baqiyatallah, Teerão, Irão, sob o código de ética IR.BMSU.BLC.1401.003.

Agradecimentos

Gostaríamos de agradecer ao deputado do conselho de investigação e aos membros do conselho de investigação da Universidade de Ciências Médicas de Baqiyatallah que apoiaram o trabalho atual.

Conflito de Interesses

Os autores declaram não haver conflito de interesses.

References / Referência

1. Kraker, M. E. A. de, Stewardson, A. J., & Harbarth, S. (2016). Will 10 Million People Die a Year due to Antimicrobial Resistance by 2050? *PLOS Medicine*, 13(11), e1002184. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1002184>
2. Loesche, W. (2007). Dental caries and periodontitis: Contrasting two infections that have medical implications. *Infectious Disease Clinics of North America*, 21(2), 471–502, vii. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2007.03.006>
3. Miladi, H., Zmantar, T., Chaabouni, Y., Fedhila, K., Bakhrouf, A., Mahdouani, K., & Chaieb, K. (2016). Antibacterial and efflux pump inhibitors of thymol and carvacrol against food-borne pathogens. *Microbial Pathogenesis*, 99, 95–100. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2016.08.008>
4. Feres, M., Figueiredo, L. C., Faveri, M., Stewart, B., & de Vizio, W. (2010). The effectiveness of a preprocedural mouthrinse containing cetylpyridinium chloride in reducing bacteria in the dental office. *Journal of the American Dental Association (1939)*, 141(4), 415–422. <https://doi.org/10.14219/jada.archive.2010.0193>
5. Jardim, J. J., Alves, L. S., & Maltz, M. (2009). The history and global market of oral home-care products. *Brazilian Oral Research*, 23 Suppl 1, 17–22. <https://doi.org/10.1590/s1806-83242009000500004>
6. Lopes, F., Caramelo, A. C. L. M., Monteiro, M. J. F. S. P., Rodrigues, V. M. C. P., Pereira, M. da C. A. R. S., & Barros, I. M. o A. R. da C. (2024). Literacia em Saúde nos Cuidados Primários. *Motricidade*, 20(1), Artigo 1. <https://doi.org/10.6063/motricidade.34006>
7. Stefanovska, E., Nakova, M., Radojkova-Nikolovska, V., & Ristoska, S. (2010). Tooth-brushing intervention programme among children with mental handicap. *Bratislavske Lekarske Listy*, 111(5), 299–302.
8. Allaker, R. P., & Douglas, C. W. I. (2009). Novel anti-microbial therapies for dental plaque-related diseases. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 33(1), 8–13. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2008.07.014>
9. Höglberg, L. D., Heddi, A., & Cars, O. (2010). The global need for effective antibiotics: Challenges and recent advances. *Trends in Pharmacological Sciences*, 31(11), 509–515. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2010.08.002>
10. Dewey, H. M., Jones, J. M., Keating, M. R., & Budhathoki-Uprety, J. (2022). Increased Use of Disinfectants During the COVID-19 Pandemic and Its Potential Impacts on Health and Safety. *ACS Chemical Health & Safety*, 29(1), 27–38. <https://doi.org/10.1021/acs.chas.1c00026>
11. Garrido, L., Lyra, P., Rodrigues, J., Viana, J., Mendes, J. J., & Barroso, H. (2023). Revisiting Oral Antiseptics, Microorganism Targets and Effectiveness. *Journal of Personalized Medicine*, 13(9), 1332. <https://doi.org/10.3390/jpm13091332>
12. Müller, H.-D., Eick, S., Moritz, A., Lussi, A., & Gruber, R. (2017). Cytotoxicity and Antimicrobial Activity of Oral Rinses In Vitro. *BioMed Research International*, 2017, 4019723. <https://doi.org/10.1155/2017/4019723>
13. Cha, J.-D., Jeong, M.-R., Jeong, S.-I., Moon, S.-E., Kim, J.-Y., Kil, B.-S., & Song, Y.-H. (2005). Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of *Artemisia scoparia* and *A. capillaris*. *Planta Medica*, 71(2), 186–190. <https://doi.org/10.1055/s-2005-837790>
14. Gonçalves, S., & Gaivão, I. (2021). Natural Ingredients Common in the Trás-os-Montes Region (Portugal) for Use in the Cosmetic Industry: A Review about Chemical Composition and Antigenotoxic Properties. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 26(17), 5255. <https://doi.org/10.3390/molecules26175255>
15. Palombo, E. A. (2011). Traditional Medicinal Plant Extracts and Natural Products with Activity against Oral Bacteria: Potential Application in the Prevention and Treatment of Oral Diseases. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine: eCAM*, 2011, 680354. <https://doi.org/10.1093/ecam/nep067>
16. Park, K. M., You, J. S., Lee, H. Y., Baek, N. I., & Hwang, J. K. (2003). Kuwanon G: An antibacterial agent from the root bark of *Morus alba* against oral pathogens. *Journal of Ethnopharmacology*, 84(2), 181–185. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(02\)00318-5](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(02)00318-5)
17. Huang, Y., Ho, S.-H., Lee, H.-C., & Yap, Y.-L. (2002). Insecticidal properties of eugenol, isoeugenol and methyleugenol and their effects on nutrition of *Sitophilus zeamais* Motsch. (Coleoptera: Curculionidae) and *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae). *Journal of Stored Products Research*, 38(5), 403–412. [https://doi.org/10.1016/S0022-474X\(01\)00042-X](https://doi.org/10.1016/S0022-474X(01)00042-X)
18. Núñez, L., D'Aquino, M., & Chirife, J. (2001). Antifungal properties of clove oil (*Eugenia caryophyllata*) in sugar solution. *Brazilian Journal of Microbiology*, 32, 123–126. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822001000200010>
19. Meeker, H. G., & Linke, H. A. (1988). The antibacterial action of eugenol, thyme oil, and related essential oils used in dentistry. *Compendium (Newtown, Pa.)*, 9(1), 32, 34–35, 38 passim.
20. Matan, N., Rimkeeree, H., Mawson, A. J., Chompreeda, P., Haruthaithanasan, V., & Parker, M. (2006). Antimicrobial activity of cinnamon and clove oils under modified atmosphere conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 107(2), 180–185. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.07.007>
21. Bina, F., & Rahimi, R. (2017). Sweet Marjoram: A Review of Ethnopharmacology, Phytochemistry, and Biological Activities. *Journal of Evidence-Based Complementary & Alternative Medicine*, 22(1), 175–185. <https://doi.org/10.1177/2156587216650793>
22. Amor, G., Caputo, L., La Storia, A., De Feo, V., Mauriello, G., & Fechtali, T. (2019). Chemical Composition and Antimicrobial Activity of *Artemisia herba-alba* and *Origanum majorana* Essential Oils from Morocco. *Molecules*, 24(22), 4021. <https://doi.org/10.3390/molecules24224021>
23. Ben Salha, G., Herrera Diaz, R., Lengliz, O., Abderrabba, M., & Labidi, J. (2019). Effect of the Chemical Composition of Free-Terpene Hydrocarbons Essential Oils on Antifungal Activity. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 24(19), 3532. <https://doi.org/10.3390/molecules24193532>
24. Vasireddy, L., Bingle, L. E. H., & Davies, M. S. (2018). Antimicrobial activity of essential oils against multidrug-resistant clinical isolates of the Burkholderia cepacia complex. *PLoS One*, 13(8), e0201835. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0201835>
25. Pinto, E., Vale-Silva, L., Cavaleiro, C., & Salgueiro, L. (2009). Antifungal activity of the clove essential oil from *Syzygium aromaticum* on *Candida*, *Aspergillus* and dermatophyte species. *Journal of Medical Microbiology*, 58(Pt 11), 1454–1462. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.010538-0>
26. Hemaiswarya, S., & Doble, M. (2009). Synergistic interaction of eugenol with antibiotics against Gram negative bacteria. *Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology*, 16(11), 997–1005. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2009.04.006>
27. Mahboubi, M., & Bidgoli, F. G. (2010). Antistaphylococcal activity of *Zataria multiflora* essential oil and its synergy with vancomycin. *Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology*, 17(7), 548–550. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2009.11.004>
28. Xu, J.-G., Liu, T., Hu, Q.-P., & Cao, X.-M. (2016). Chemical Composition, Antibacterial Properties and Mechanism of Action of Essential Oil from Clove Buds against *Staphylococcus aureus*. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 21(9), 1194. <https://doi.org/10.3390/molecules21091194>
29. Arulmozhi P, Vijayakumar S, Kumar T. Phytochemical analysis and antimicrobial activity of some medicinal plants against selected pathogenic microorganisms. *Microb Pathog*. 2018;123:219-226. doi:10.1016/j.micpath.2018.07.009
30. Burt, S. (2004). Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94(3), 223–253. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022>
31. Ahmad, N., Alam, M. K., Shehbaz, A., Khan, A., Mannan, A., Hakim, S. R., Bisht, D., & Owais, M. (2005). Antimicrobial activity of clove oil and its potential in the treatment of vaginal candidiasis. *Journal of Drug Targeting*, 13(10), 555–561. <https://doi.org/10.1080/10611860500422958>
32. Souza, E. L., Stamford, T. L. M., Lima, E. O., & Trajano, V. N. (2007). Effectiveness of *Origanum vulgare* L. essential oil to inhibit the growth of food spoiling yeasts. *Food Control*, 18(5), 409–413. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2005.11.008>
33. Karkun, A. (2015). Comparative study of Clove oil Against Bacteria and Fungal Species. *International Journal of Clinical Biochemistry and Research*. https://www.academia.edu/67000097/Comparative_study_of_Clove_oil_Against_Bacteria_and_Fungal_Species
34. Moon, S.-E., Kim, H.-Y., & Cha, J.-D. (2011). Synergistic effect between clove oil and its major compounds and antibiotics against oral bacteria. *Archives of Oral Biology*, 56(9), 907–916. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2011.02.005>
35. Mirpour, M., Gholizadeh Siahmazgi, Z., & Sharifi Kiasaraie, M. (2015). Antibacterial activity of clove, gall nut methanolic and ethanolic extracts on *Streptococcus mutans* PTCC 1683 and *Streptococcus salivarius* PTCC 1448. *Journal of Oral Biology and Craniofacial Research*, 5(1), 7–10. <https://doi.org/10.1016/j.jobocr.2015.02.002>

36. Wongsawan, K., Chaisri, W., Tangtrongsup, S., & Mektrirat, R. (2019). Bactericidal Effect of Clove Oil against Multidrug- Resistant *Streptococcus suis* Isolated from Human Patients and Slaughtered Pigs. *Pathogens* (Basel, Switzerland), 9(1), 14. <https://doi.org/10.3390/pathogens9010014>
37. Philp, J. R. (1990). Allergic Drug Reactions. Em H. K. Walker, W. D. Hall, & J. W. Hurst (Eds.), *Clinical Methods: The History, Physical, and Laboratory Examinations* (3rd ed.). Butterworths. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK327/>
38. Gonçalves, S., Monteiro, M., Gaivão, I., & Matos, R. S. (2024). Preliminary Insights into the Antigenotoxic Potential of Lemon Essential Oil and Olive Oil in Human Peripheral Blood Mononuclear Cells. *Plants*, 13(12), Artigo 12. <https://doi.org/10.3390/plants13121623>
39. Gonçalves, S., Peixoto, F., Schoss, K., Glavač, N. K., & Gaivão, I. (2024). Elderberry Hydrolate: Exploring Chemical Profile, Antioxidant Potency and Antigenotoxicity for Cosmetic Applications. *Applied Sciences*, 14(14), Artigo 14. <https://doi.org/10.3390/app14146338>
40. Gonçalves, S., Peixoto, F., Silveria, T. F. F. da, Barros, L., & Gaivão, I. (2024). Antigenotoxic and cosmetic potential of elderberry (*Sambucus nigra*) extract: Protection against oxidative DNA damage. *Food & Function*, 15(21), 10795– 10810. <https://doi.org/10.1039/D4FO03217A>