

Efeito Antimicrobiano do Óleo Essencial do *Cymbopogon citratus* Sobre Bactérias Formadoras do Biofilme Dentário

Antimicrobial Effect of *Cymbopogon citratus* Essential Oil on Dental Biofilm-Forming Bacteria

MATHEUS DE FRANÇA PERAZZO¹
MARIA CATARINA DA COSTA NETA¹
YURI WANDERLEY CAVALCANTI²
ALIDIANNE FÁBIA CABRAL XAVIER³
ALESSANDRO LEITE CAVALCANTI⁴

RESUMO

Objetivo: Avaliar a atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* sobre as bactérias formadoras do biofilme dentário: *Streptococcus mutans* (ATCC 25175), *S. salivarius* (ATCC7073) e *S. oralis* (ATCC1055). **Material e Métodos:** Determinou-se a atividade antibacteriana pela Concentração Inibitória Mínima (CIM) a partir da técnica de microdiluição, de modo que, em microplacas de 96 poços foram inseridos 100 iL de caldo Brain Heart Infusion Broth duplamente concentrado, 100 iL da diluição do óleo essencial e 10 iL do inóculo bacteriano ($1,5 \times 10^8$ microorganismos/mL) em cada uma das microplacas. Realizou-se diluição seriada do produto partindo-se da concentração inicial de 8% até 0,0625%. A CIM correspondeu à menor diluição na qual se verificou ausência de crescimento bacteriano visível. Os testes foram realizados em triplicata e a clorexidina (2%) serviu de controle. **Resultados:** Verificou-se melhor desempenho do *Cymbopogon citratus* frente *S. mutans* (ATCC25175), apresentando a CIM iguais a 0,5626mg/mL, já para *S. salivarius* (ATCC7073) e *S. oralis* (ATCC1055), os resultados mostram atividade antimicrobiana semelhante (2,25mg/ml). **Conclusão:** O óleo essencial de *Cymbopogon citratus* exerce atividade antibacteriana sobre as bactérias formadoras do biofilme dentário analisadas, especialmente sobre o *Streptococcus mutans* (ATCC 25175).

DESCRITORES

Fitoterapia. Agentes Antibacterianos. Óleos Voláteis. Placa Dentária.

ABSTRACT

Objective: To evaluate the antimicrobial activity of *Cymbopogon citratus* essential oil on dental biofilm-forming bacteria: *Streptococcus mutans* (ATCC 25175), *S. salivarius* (ATCC7073) and *S. oralis* (ATCC1055). **Material and Methods:** The antibacterial activity was determined by Minimum Inhibitory Concentration (MIC) through the microdilution technique. In 96-well microplates, it was added 100 iL of Brain Heart Infusion Broth doubly concentrated, 100 iL of the essential oil dilution and 10 iL of bacterial inoculum (1.5×10^8 microorganisms / mL). Serial dilution of the product was performed ranging from an initial concentration of 8% until 0.0625%. The MIC was considered as the lowest dilution in which it was verified absence of visible bacterial growth. Tests were conducted in triplicate, and Chlorhexidine (2%) was used as control. **Results:** A better performance of *Cymbopogon citratus* was observed upon *S. mutans* (ATCC25175), showing MIC of 0.5626 mg / mL, whereas on *S. salivarius* (ATCC7073) and *S. oralis* (ATCC1055) results indicated similar antimicrobial activity (2.25 mg / mL). **Conclusion:** *Cymbopogon citratus* essential oil was found to present antibacterial activity on the dental biofilm-forming bacteria assayed, especially upon *Streptococcus mutans* (ATCC 25175).

DESCRIPTORES

Phytotherapy. Anti-bacterial Agents. Oils, Volatile. Dental Plaque.

- 1 Acadêmico do Curso de Odontologia da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), Campina Grande/PB, Brasil
- 2 Aluno de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Clínica Odontológica da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Piracicaba/SP, Brasil.
- 3 Professora da Sociedade Odontológica de Campina Grande (SOCG), Campina Grande/PB, Brasil
- 4 Professor Doutor do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), Campina Grande/PB, Brasil

O uso de plantas no tratamento e na cura de enfermidades é tão antigo quanto à espécie humana, e ainda hoje não é difícil encontrar, tanto nas regiões mais pobres do país quanto nas grandes cidades brasileiras, plantas medicinais comercializadas em feiras livres, mercados populares ou em quintais residenciais nas mais diversas formas de apresentação como “chás, sucos, xaropes, compressas, inalações, banhos, pomadas, gargarejos, bochechos, entre outros” (OLGUIN *et al.*, 2007).

Foi a partir do final do século XVIII, que o progresso muito rápido das ciências modernas veio enriquecer e diversificar em proporções extraordinárias os conhecimentos sobre as plantas, de modo que, a evolução da química moderna e o desenvolvimento industrial permitiram a manipulação dos princípios ativos de muitas plantas com características terapêuticas e suas consequentes formulações sintéticas em laboratório, atendendo, portanto, à crescente demanda populacional de medicamentos (FERREIRA, 2006).

A fitoterapia possui grande abrangência mundial devido à facilidade de acesso, baixo custo e risco e pela compatibilidade cultural com as tradições populares, fatos responsáveis por gerar uma movimentação de 22 bilhões de dólares, com um crescimento de 12% ao ano (LÓPEZ, 2006). O Brasil, que tem este ramo da ciência correspondendo a 7 % do mercado farmacêutico nacional, possui cerca de 60.000 espécies de plantas, o que corresponde a cerca de 20% de toda a flora mundial conhecida, e não menos de 75% de todas as espécies existentes nas grandes florestas (FERREIRA, 2006).

O Cymbopogon citratus, popularmente conhecido como capim-santo, capim-cheiroso, capim-limão (GOMES, NEGRELLE, 2003), pertence à família Poaceae, originária da Índia e aclimatada no Brasil (BRITO *et al.*, 2011). É cultivado em todos os países na região dos trópicos, preferindo climas quentes e úmidos, com chuvas bem distribuídas e temperatura média elevada. A partir da constatação de suas propriedades terapêuticas, está desde 2010, inclusa dentre as ervas medicinais regulamentadas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2010).

Muitos estudos já foram realizados, tanto com extratos como óleos, a fim de analisar o desempenho

terapêutico desta gramínea, os quais identificaram a sua atividade antifúngica (HEYDER, SILVA, 2004), antibacteriana (ALVARENGA *et al.*, 2007), anti-helmíntica (ALMEIDA *et al.*, 2003) e diurética (GÁLVEZ *et al.*, 1998).

Face ao exposto, o presente estudo analisou o efeito antimicrobiano do óleo essencial do *Cymbopogon citratus* sobre diferentes bactérias formadoras do biofilme dentário.

MATERIAL E MÉTODOS

Realizou-se um estudo experimental *in vitro* de abordagem indutiva, com procedimento comparativo estatístico e técnica de documentação direta em laboratório (LAKATOS; MARCONI, 2009).

As cepas de referência utilizadas no estudo foram *Streptococcus mutans* (ATCC 25175); *Streptococcus salivarius* (ATCC 7073); *Streptococcus oralis* (ATCC 1055). Os microrganismos foram obtidos do Laboratório de Materiais de Referência do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ, Rio de Janeiro - RJ, Brasil).

As cepas foram reativadas, segundo o protocolo de reativação de cepas de referência da Fundação Oswaldo Cruz, em caldo BHI (Infuso de Coração e Cérebro) e em Agar Sangue (Agar Müller Hinton adicionado de 5% de sangue de carneiro desfibrinado), em estufa bacteriológica a 37°C por 48h em atmosfera de aerobiose (para *S. oralis*, *S. salivarius*); micro-aerobiose ou (microaerofilia) mediante incubação pela técnica da chama da vela (para *S. mutans*), no Laboratório de Microbiologia Oral – Núcleo de Medicina Tropical do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba. Para condução do estudo, suspensões antimicrobianas dos microrganismos foram preparadas em solução salina, sob a concentração $1,5 \times 10^6$ microrganismos/mL, equivalente ao tubo 106 da Escala de MacFarland.

Para avaliação antimicrobiana *in vitro* foi utilizado o óleo essencial do *Cymbopogon citratus*

(capim santo) (Raizando Exploração de Óleos Vegetais Ltda, João Pinheiro, MG, Brasil).

O óleo essencial utilizado foi inicialmente diluído em água destilada estéril, obtendo-se a concentração de 16%. Para obtenção dessa diluição, considerou-se a densidade da substância igual a 0,9 g/mL, conforme especificações do fornecedor. Utilizou-se o método de diluição descrito por ALIGIANNIS *et al.* (2001) e LIMA *et al.* (2006), no qual foi adicionado em tubo de vidro estéril: 0,8 mL do óleo essencial; 0,05 mL de Tween 80; e 4,2 mL de água destilada estéril. O conjunto foi agitado durante 5 minutos em aparelho agitador de soluções tipo Vortex (Mod. AP56, Phoenix) e a concentração final obtida foi de 16%, equivalente a 144 mg/mL. Para avaliação da Concentração Inibitória Mínima (CIM), o óleo essencial foi diluído de forma seriada, mediante emprego da técnica da microdiluição.

A determinação da CIM foi realizada em placas de microdiluição com 96 poços (ALAMAR®, Diadema, São Paulo, Brasil), dispostos em 12 colunas (1 a 12) e 8 linhas (A a H). Cada uma dessas placas destinou-se a análise de um microrganismo. As colunas 1, 2 e 3 foram destinadas a análise antimicrobiana do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* e as colunas 4, 5, e 6 ao Controle Positivo (Clorexidina a 2% - 10mg/mL). A coluna 7 (A-D) foi destinada ao Controle de Crescimento e na mesma coluna 7 (E-H), foi destinado ao Controle de Esterilidade.

Em cada um dos poços das placas de microdiluição foram inseridos 100µL de caldo infusão cérebro e coração (BHI). Em seguida, inseriu-se 100µL da emulsão do óleo essencial para obtenção da concentração inicial de 8% (72,0 mg/mL) na primeira linha da placa de microdiluição. As concentrações subsequentes do óleo essencial foi obtida após diluição seriada dos produtos naturais na placa de microdiluição, partindo-se da concentração inicial de 8% (Linha A) até 0,0625% (Linha H), pela transferência de 100µL do conteúdo ao poço subsequente. Para os poços da linha H, foram dispensados 100µL do conteúdo, de modo a igualar o volume total dos poços. As concentrações (em porcentagem e em mg/mL) dos produtos analisados após a diluição seriada são apresentadas no Quadro 1.

Quadro 1. Diluições seriadas dos óleos essenciais obtidas pela técnica de avaliação antimicrobiana por microdiluição.

Linhas	Concentração (%)	Concentração (mg/mL)
A	8	72,0
B	4	36,0
C	2	18,0
D	1	9,0
E	0,5	4,5
F	0,25	2,25
G	0,125	1,125
H	0,0625	0,5625

Posteriormente, foram inseridos 100µL da suspensão microbiana (1,5x10⁶ microrganismos/mL) em todos os poços, exceto a coluna correspondente ao controle de esterilidade. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37°, por 48h. A CIM correspondeu à última diluição do óleo essencial na qual não foi verificada a presença de precipitado microbiano ou turvação no meio de cultura após o período de incubação.

Todos os testes foram realizados em triplicata. As unidades de comparação estatística foram as diluições seriadas nas quais se observou CIM. Os dados foram tabulados no programa GraphPad Prism 5.0 (Programa GraphPad for Windows, San Diego, CA - USA), pelo qual se procedeu a análise estatística pelo teste Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn, sendo adotado nível de significância de 95%.

RESULTADOS

A metodologia empregada neste estudo foi validada pela ausência de crescimento microbiano para o controle de esterilidade e controle positivo (Clorexidina a 2% - 10mg/mL), bem como pela presença de crescimento microbiano para o controle de crescimento.

Os valores da Concentração Inibitória Mínima (CIM) do produto testados, sobre as cepas de

Streptococcus mutans, *Streptococcus salivarius* e *Streptococcus oralis*, são apresentados, respectivamente, no Quadro 2.

Quadro 2. Valores da concentração inibitória mínima do óleo essencial do *Cymbopogon citratus*.

Concentração	<i>S. salivarius</i>	<i>S. mutans</i>	<i>S. oralis</i>
(%)	0,25	0,0625	0,25
(mg/ml)	2,25	0,5625	2,25

DISCUSSÃO

Os óleos essenciais são substâncias voláteis, que apresentam insolubilidade em água e complexidade química, o que dificulta a padronização de técnicas confiáveis, que possam ser reproduzidas e validadas, de modo a alcançar resultados seguros (CASTRO, LIMA, 2010, NASCIMENTO *et al.*, 2007, SCORZONI *et al.*, 2007; POZZATTI *et al.*, 2010).

Dessa forma, para minimizar a inconsistência dos resultados obtidos, foi empregada a técnica de microdiluição em caldo, com o objetivo de proporcionar maior contato entre os produtos testados e as bactérias. Utilizou-se também um agente emulsificante (Tween 80) para permitir a diluição dos óleos essenciais em meio aquoso. Essas medidas contribuem para redução de vies metodológico (CASTRO, LIMA, 2010, SCORZONI, 2007). Conforme reportado por ELOFF (1998), a técnica da microdiluição, além de sua alta eficácia antimicrobiana, possui como vantagens: baixo custo das microplacas, requer pequena quantidade de amostra, pode ser usado para grande número de amostras e deixa um registro permanente.

O Controle Positivo (Clorexidina 2%), o Controle de Esterilidade e o Controle de Crescimento foram empregados de modo a validar a técnica utilizada neste estudo. A ausência de crescimento bacteriano diante da Clorexidina demonstra a susceptibilidade das amostras frente a um antimicrobiano sintético. Os Controles de Esterilidade e de Crescimento comprovaram,

respectivamente, a ausência de contaminação do meio de cultura e a viabilidade das cepas testadas.

A literatura encontra-se escassa em relação a outras pesquisas de igual metodologia e amostras, onde a maioria dos estudos, relacionados à ação antibactericida do *C. citratus*, não utilizam a técnica da microdiluição, mas sim, a da difusão seriada (VARGAS *et al.*, 2010, NOGUEIRA, OLIVEIRA, LORSCHIEDER, 2008, SCHUCK *et al.*, 2001).

De qualquer modo, estas pesquisas demonstram a alta eficácia antimicrobiológica do óleo essencial sobre a bactéria *S. mutans*, o que o torna de suma importância para a odontologia já que a inativação de microrganismos relacionados ao processo cariogênico é relevante pelo fato desses serem responsáveis por produzir ácidos a partir da metabolização dos carboidratos oriundos da dieta do indivíduo que acabam por desmineralizar o esmalte, dentina e cimento proporcionando o desenvolvimento da cárie dental (VARGAS *et al.*, 2010).

Pesquisa anterior que avaliou a atividade antimicrobiana *in vitro* do *C. citratus* pelo método de difusão em agar sobre o *S. mutans* observou um halo de inibição de 21,5 mm, enquanto o da clorexidina foi de 27 mm, apresentando uma diferença relativamente pequena, principalmente quando comparado ao outro microorganismo em estudo, o *Lactobacillus casei*, o qual apresentou um halo de 12mm. Tal estudo comprova, portanto, a grande susceptibilidade do *S. mutans* frente ao *C. citratus* (NOGUEIRA, OLIVEIRA, LORSCHIEDER, 2008).

A composição química do óleo essencial do *C. citratus* é bastante diversificada: sabieno (1,4%); mirceno (14,6%); limoneno (0,4%); terpinoleno (1%); Metil cavicol (1,2%); citronela (2,1%); neral (32,8%); geranial (44,6%). O neral e o geranial, componentes majoritários da composição química, são compostos estereoisômeros, e suas misturas constituem o citral, principal elemento responsável pelo caráter antimicrobiano do *C. citratus*, cujo seu mecanismo de ação baseia-se em aumentar a permeabilidade da membrana celular, a partir de uma provável interação hidrofóbica com a membrana (SIKKEMA *et al.*, 1994; OLIVEIRA *et al.*, 2011).

Porém, por mais efetivo que o *C. citratus* tenha se apresentado sobre as bactérias formadoras do biofilme dental, é de suma importância outros estudos a fim de avaliar seu grau de toxicidade sobre as mucosas orais e estruturas dentárias, de modo que, se comprovado, possa no futuro servir como alternativa terapêutica para o arsenal odontológico.

CONCLUSÃO

O produto avaliado exerceu atividade antimicrobiana contra cepas de *Streptococcus mutans*, *Streptococcus salivarius* e *Streptococcus oralis*.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Laboratório de Microbiologia Oral – Núcleo de Medicina Tropical do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba.

REFERÊNCIAS

- ALIGIANNIS N, KALPOUTZAKIS E, MITAKU S, CHINOUB JB. Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oils of Two Origanum Species. *J Agric Food Chem.*, 49(9):4168-4170, 2001.
- ALMEIDA MAO, BOTURA MB, SANTOS MM, ALMEIDA GN, DOMINGUES LF, COSTA SL, BATATINHA MJM. Efeitos dos extratos aquosos de folhas de *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf (Capim Santo) e *Digitaria insularis* (L) Fedde (Capim-Açu) sobre cultivo de larvas de nematóides gastrintestinais de caprinos. *Rev Bras Parasitol.*, 12(3):125-129, 2003.
- ALVARENGA AL, SCHWAN RF, DIAS DR, SCHWAN-ESTRADA KRF, BRAVO-MARTINS CEC. Atividade antimicrobiana de extratos vegetais sobre bactérias patogênicas humanas. *Rev Bras Pl Med*, 9(4):86-91, 2007.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Diário Oficial da União*, 2010. p. 52, 54, 10 de março de 2010.
- BRITO ES, GARRUTI DS, ALVES PB, BLANK AF. Caracterização odorífera dos componentes do óleo essencial de capim-Santo (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf., Poaceae) por cromatografia gasosa (CG) – Olfatometria. Fortaleza, CE: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA, 2011. 9p.
- CASTRO RD, LIMA EO. Atividade antifúngica in vitro do óleo essencial de *Eucalyptus globulus* L. sobre *Candida* spp. *Rev Odontol UNESP*, 39(3):179-184, 2010.
- FERREIRA MGR. Aspectos sociais da fitoterapia. Porto Velho, RO: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA, p.17, 2006.
- GÁLVEZ JLH, TORRES IP, AGUILAR OEA, LARA ML. Estudio del efecto diurético de la hoja de *Cymbopogon citratus* en modelo de ratas. *Rev Cubana Plantas Medicinales*, 3(2):79-82, 1998.
- HEYDER CDT, SILVA DAK. Avaliação da atividade antifúngica do óleo volátil de *Cymbopogon citratus* sobre *Candida krusei* e *Candida parapsilosis*. *Rev Saúde e Ambiente*, 5(2):7-12, 2004.
- LAKATOS EM, MARCONI MA. *Fundamentos de metodologia científica*. 6. ed. São Paulo: Atlas, 2009, 379p.
- LIMA IO, OLIVEIRA RAG, LIMAEO, FARIAS NMP, SOUZA EL. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de *Candida*. *Rev Bras Farmacogn*, 16(2):197-201, 2006.
- LÓPEZ CAA. Considerações gerais sobre plantas medicinais. *Rev Ambiente: Gestão e Desenvolvimento*, 1(1):19-27, 2006.
- NASCIMENTO PFC, NASCIMENTO AC, RODRIGUES CS, ANTONIOLLI ÂR, SANTOS PO, BARBOSA JÚNIOR AM, TRINDADE RC. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais: uma abordagem multifatorial dos métodos. *Rev Bras Farmacogn*, 17(1):108-113, 2007.
- NOGUEIRA MA, OLIVEIRA SMM, LORSCHIEDER JA. Avaliação da ação in vitro de gel dentifício contendo óleos essenciais sobre bactérias cariogênicas. *Acta Farmaceutica Bonaerense*, 27(2):266-269, 2008.
- OLGUIN CFA, CUNHAM B, DAL BOSCO CB, SCHNEIDER MB, BOCARDI JMB. Plantas medicinais: estudo etnobotânico dos distritos de Toledo e produção de material didático para o ensino de ciências. *Acta Sci Human Soc Sci*, 29(2):205-209, 2007.
- OLIVEIRAMMM, BRUGNERADF, CARDOSOMG, PICCOLI RH. Rendimento, composição química e atividade antilisterial de óleos essenciais de espécies de *Cymbopogon*. *Rev Bras Plantas Med.*, 12(1):8-15, 2011.
- POZZATTI P, LORETO ES, LOPES PGM, ATHAYDE ML, SANTURIO JM, ALVES SH. Comparison of the susceptibilities of clinical isolates of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* to essential oils. *Mycoses*, 53(1):12-15, 2010

18. GOMES EC, NEGRELLE RRB. *Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf: Aspectos botânicos e ecológicos. *Visão Acadêmica*, 4(2):137-144, 2003.
19. SCHUCK VEJA, FRATINI M, RAUBER CS, HENRIQUES A, SCHAPOVAL EES. Avaliação da atividade antimicrobiana de *Cymbopogon citratus*. *Rev Bras Ciênc Farm.*, 37(1):45-49, 2001.
20. SCORZONI L, BENADUCCI T, ALMEIDAAMF, SILVA DHS, BOLZANI VS, MENDES-GIANNINI MJS. Comparative study of disk diffusion and microdilution methods for evaluation of antifungal activity of natural compounds against medical yeasts *Candida spp* and *Cryptococcus sp*. *Rev Ciênc Farm Básica Apl.*, 28(1):25-34, 2007.
21. SIKKEMA J, DE BONT JA, POOLMAN B. Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. *J Biol Chem*, 269(11):8022-8028, 1994.
22. VARGAS FS, OLIVEIRA CF, SACRAMENTO LVS, GIRO EMA, COSTA CAS. Efeito Antimicrobiano e Citotóxico do Óleo Essencial de *Cymbopogon citratus* sobre Células Odontoblastóides. *Rev Odontol Bras Central*, 19(49):101-107, 2010.

CORRESPONDÊNCIA

Matheus de França Perazzo
Rua Prof. Abel da Silva, n. 154
Bairro: Centro
Areia – Paraíba – Brasil
CEP: 58.397-000
E-mail: matheusperazzo@hotmail.com