



UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA  
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA  
MESTRADO EM CLÍNICA ODONTOLÓGICA



**EFEITO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Cymbopogon citratus* (DC)  
Stapf. NO CONTROLE QUÍMICO DO BIOFILME DENTÁRIO**

NAIANA BRAGA DA SILVA

Campina Grande

2016



UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA  
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA  
MESTRADO EM CLÍNICA ODONTOLÓGICA

**EFEITO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Cymbopogon citratus* (DC)  
Stapf. NO CONTROLE QUÍMICO DO BIOFILME DENTÁRIO**

MESTRANDA: Naiana Braga da Silva

ORIENTADOR: Alessandro Leite Cavalcanti

CO-ORIENTADORA: Ana Maria Gondim Valença

Dissertação apresentada à  
coordenação do Programa de  
Pós-Graduação em  
Odontologia da Universidade  
Estadual da Paraíba para  
obtenção de título de mestre.

Campina Grande

2016

É expressamente proibida a comercialização deste documento, tanto na forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano da dissertação.

S586e Silva, Naiana Braga da.  
Efeito do óleo essencial de *Cymbopogon Citratus* (DC) Stapf. no controle químico do biofilme dentário [manuscrito] / Naiana Braga da Silva. - 2016.  
65 p. : il.

Digitado.  
Dissertação (Mestrado em Odontologia) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2016.  
"Orientação: Prof. Dr. Alessandro Leite Cavalcanti, Departamento de Odontologia".  
"Co-Orientação: Profa. Dra. Ana Maria Gondim Valença, Departamento de Odontologia/UFPB".  
1. Cárie dentária. 2. Biofilme dentário. 3. Medicamento fitoterápico. 4. Capim-santo. I. Título.

21. ed. CDD 615.321

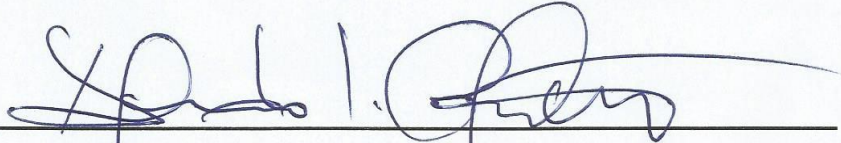
NAIANA BRAGA DA SILVA

**EFEITO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Cymbopogon citratus* NO CONTROLE QUÍMICO DO BIOFILME DENTÁRIO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Estadual da Paraíba para obtenção de título de mestre.

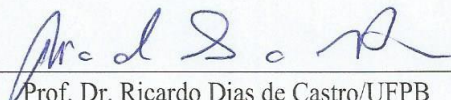
Aprovada em: 06 de maio de 2016

BANCA EXAMINADORA



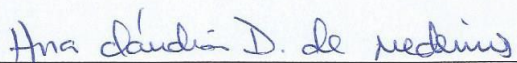
---

Prof. Dr. Alessandro Leite Cavalcanti/UEPB  
Membro titular (orientador) \*



---

Prof. Dr. Ricardo Dias de Castro/UFPB  
Membro titular (examinador externo)



---

Profa. Dra. Ana Cláudia Dantas de Medeiros/UEPB  
Membro titular (examinador interno)

# DEDICATÓRIA



Dedico este trabalho aos meus pais  
que sempre me incentivaram a  
perseguir meus sonhos e lutar por  
minhas vitórias.

# AGRADECIMENTOS



Agradeço a minha irmã, Nadja Braga da Silva, e meu cunhado, Gustavo Cesar Vasconcelos Dantas, por toda ajuda e apoio na execução dessa pesquisa, sem os quais dificilmente eu conseguiria concluí-la com êxito.

Agradeço a meus pais, José Anchieta da Silva e Maria Bertilha Braga, por estarem ao meu lado nos caminhos que escolho seguir, sempre me fortalecendo.

Agradeço a minha co-orientadora, apoiadora incondicional de meu desejo de ser professora desde a graduação. Aprendi com Ana Maria Gondim Valença como ser pesquisadora. Responsabilidade, dedicação e compromisso são raízes fortes fixadas desde a iniciação científica.

Agradeço ao professor Alessandro Leite Cavalcanti por aceitar ser meu orientador nessa etapa de minha trajetória acadêmica. Abraçou minha paixão pela fitoterapia acreditando em mim, acalmando-me em momentos mais difíceis e me guiando para materialização de mais um sonho.

Agradeço aos professores do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Estadual da Paraíba por serem exemplos do fazer ciência e docência com excelência.

Agradeço a Marianne Rangel pela parceria durante as etapas laboratoriais dessa pesquisa, compartilhando conflitos, buscando juntas soluções e concluindo atividades.

Agradeço a Jefferson Muniz pela paciência e amizade durante muitos momentos nesses últimos meses, sendo mais que parceiro de pesquisa.

Agradeço a Sócrates Golzio pela ajuda com a identificação dos fitocompostos do óleo essencial foco dessa dissertação.

Agradeço ao professor Lúcio Roberto Cançado Castellano e à professora Edja Maria Melo de Brito Costa pela generosidade de compartilhar conhecimentos e ensinamentos valiosos.

Agradeço ao professor Ricardo Dias de Castro e à professora Ana Cláudia Dantas de Medeiros por aceitarem colaborar para o refinamento desse trabalho.

Agradeço a meus amigos mestrandos, sonhadores como eu, que nunca me deixaram desistir de continuar caminhando, mesmo com tantas atividades acumuladas. Fui professora e aluna simultaneamente, mas fui mais ainda uma integrante do clã.

Agradeço a Bruno Barbosa Almeida pela confiança há anos conquistada, dividida muito respeitosamente entre aluno e professor e entre amigo e amiga.

Agradeço a Prefeitura Municipal de Araruna, na pessoa da Secretária Municipal de Saúde Cristina Targino, pela força e incentivo para seguir com meu sonho de viver a docência e fazer Odontologia por amor.

Agradeço aos colegas professores do Campus VIII da Universidade Estadual da Paraíba pelo apoio e estímulo para seguir crescendo.



Recebi minha maior riqueza quando nasci. Minha família é meu tesouro e à Deus serei sempre grata por essa e outras maravilhas:

“Louvarei o nome de Deus com cânticos e proclamarei sua grandeza com ações de graças”.

Salmos 69:30

# RESUMO



## RESUMO

O biofilme dentário é responsável por promover doenças bucais de caráter infeccioso, podendo ser controlado mecânica e quimicamente. A fitoterapia surge como uma alternativa e o óleo essencial de capim-santo se mostra promissor como método auxiliar no controle químico do biofilme. Nesse contexto, o objetivo deste estudo foi realizar análise química do óleo essencial de *Cymbopogon citratus*, obtido em empresa de referência na distribuição de essências e óleos essenciais, bem como investigar os efeitos antimicrobiano e antibiofilme do óleo essencial de *in vitro*, além da toxicidade sobre células humanas. Para análise química, foi utilizada a cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas e, para identificação do efeito antimicrobiano, foi determinada a Concentração Inibitória Mínima (CIM) sobre cepas padrão de *Streptococcus mutans* UA 159 e de *Candida albicans* ATCC 90029, pelo método da microdiluição na técnica de poços. A CIM encontrada serviu de referência para o teste antibiofilme. Para determinação da atividade antibiofilme, foi desenvolvido biofilme multiespécie com os microrganismos *Streptococcus mutans* e *Candida albicans*, verificando-se ações de inibição da formação de biofilme e remoção de biofilme maduro, com avaliação em espectrofotometria, por meio de um leitor de placas, em comprimento de onda de 525 nm. Para identificação da atividade hemolítica, foram utilizadas amostras sanguíneas de cinco doadores saudáveis, submetendo o preparado de eritrócitos às concentrações seriadas do óleo essencial em teste, com posterior leitura em espectrofotometria, a 560 nm. Os dados foram tabulados, analisados estatisticamente e apresentados na forma de tabelas e quadros. O principal composto do óleo essencial foi o citral. Foi evidenciada atividade antimicrobiana do produto, com CIM bacteriana de 1000 µg/mL e CIM fúngica de 125 µg/mL, bem como forte efeito inibidor da formação de biofilme em todas as concentrações avaliadas ( $p < 0,05$ ). Entretanto, o óleo essencial não foi capaz de remover biofilme maduro. Também foi observado que o fitoterápico apresentou efeito protetor sobre eritrócitos humanos em concentrações inferiores a 500µg/mL. Com base na metodologia adotada, verifica-se que o óleo essencial de *Cymbopogon citratus* possui potencial antibiofilme, não sendo tóxico à membrana de eritrócitos humanos.

DESCRITORES: Cárie dentária; Biofilme dentário; Medicamento Fitoterápico.

# ABSTRACT



## ABSTRACT

The dental biofilm is responsible for promoting infectious oral diseases, but it can control both mechanically and chemically. Phytotherapy comes up as an alternative, and the essential oil of lemon grass shows promising as an auxiliary method on chemical biofilm control. In this context, the aim of the study was to perform the chemical analysis of essential oil of *Cymbopogon citratus*, obtained in a company that is reference on essence and essential oil distribution, as well as to investigate the *in vitro* antimicrobial and antibiofilm effects of the oil, and its toxicity on human cells. For the chemical analysis, gas chromatography-mass spectrometry was used, and to identify the antimicrobial effect, we determinate the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) on standard strains of *Streptococcus mutans* UA159 and *Candida albicans* ATCC90029, by the microdilution method on well technic. The obtained MIC served as a reference for the antibiofilm test. To determinate the antibiofilm activity, we developed a multispecies biofilm, with *Streptococcus mutans* and *Candida albicans*, verifying the inhibitory actions of biofilm formation and the mature biofilm removal, with spectrophotometry evaluation, through a plate reader at a wavelength of 525 nm. To identify the hemolytic activity, we used blood samples from five healthy donors, subjecting the erythrocytes preparation to the serial concentrations of the essential oil on test, with later spectrophotometry reading, at 560nm. The data was tabulated, statistically analyzed and presented as tables and charts. The main compound of the essential oil was the citral. It was evidenced the antimicrobial activity of the product at bacterial MIC of 1000 µg/mL and fungal MIC at 125µg/mL, as well as the inhibitory effect on biofilm formation on every evaluated concentrations ( $p < 0,05$ ). However, the essential oil was not able to remove mature biofilm. Observed that the essential oil showed protective effect over human erythrocytes on concentrations less than 500µg/mL. Based on the used methodology, checks that the *Cymbopogon citratus* essential oil has antibiofilm potential, not being toxic to the human erythrocyte membrane.

**KEY WORDS:** Dental caries; Dental Biofilm; Phytotherapy.

## LISTA DE SIGLAS



## LISTA DE SIGLAS

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

CEP – Comitê de Ética em Pesquisa

CHX – Clorexidina

CIM – Concentração Inibitória Mínima

CBM – Concentração Bactericida Mínima

CFM – Concentração Fungicida Mínima

H – Hemólise

CH – Concentração de Hemólise

FNF – Farmacopeia Nacional de Fitoterápicos

ppm – Partes por milhão

rpm – Rotações por minuto

OE – Óleo Essencial

UEPB – Universidade Estadual da Paraíba

UFPB – Universidade Federal da Paraíba

UFC – Unidades Formadoras de Colônias

# LISTA DE TABELAS e QUADROS





TABELA 1 - DETERMINAÇÃO DO EFEITO ANTIBIOFILME .....	39
TABELA 2 - PORCENTAGENS DE INIBIÇÃO DE BIOFILME – RESULTADOS PARA G2 .....	40
QUADRO 1 - CLASSIFICAÇÃO DE INIBIÇÃO DE BIOFILME .....	27
QUADRO 2 - QUADRO DE VARIÁVEIS E PLANOS DE ANÁLISES .....	28
QUADRO 1 - CLASSIFICAÇÃO DE INIBIÇÃO DE BIOFILME .....	37
QUADRO 3 - FITOCONSTITUINTES IDENTIFICADOS POR CG/MS .....	38
QUADRO 4 - ABSORBÂNCIAS E PORCENTAGENS DE HEMÓLISE.....	40

# SUMÁRIO



## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>21</b>
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>23</b>
2.1 OBJETIVO GERAL	23
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
<b>3. METODOLOGIA</b>	<b>24</b>
3.1 DELINEAMENTO GERAL DO ESTUDO	24
3.2 ANÁLISE QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL	24
3.3 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA	24
3.4 DETERMINAÇÃO DO EFEITO ANTIBIOFILME	25
3.5 TESTE DE HEMÓLISE	27
3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA	28
3.7 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	28
<b>4. ARTIGO</b>	<b>30</b>
<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>32</b>
<b>METODOLOGIA</b>	<b>33</b>
<b>RESULTADOS</b>	<b>38</b>
<b>DISCUSSÃO</b>	<b>40</b>
<b>CONCLUSÃO</b>	<b>43</b>
<b>CONFLITOS DE INTERESSE</b>	<b>43</b>
<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>43</b>
<b>5. CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	<b>48</b>
<b>6. REFERÊNCIAS</b>	<b>50</b>
<b>7. ANEXO – NORMAS DA REVISTA</b>	<b>55</b>

# CONSIDERAÇÕES INICIAIS



## 1. INTRODUÇÃO

O biofilme dentário é um microecossistema constituído por inúmeras espécies microbianas, dentre os quais fungos, bactérias, vírus e protozoários, responsável pelo surgimento das lesões de cárie quando em contato com os dentes por tempo suficiente para fermentação de açúcares presentes na dieta humana, na deficiência ou ausência de higiene oral (STRUŻYCKA, 2014; KRZYŚCIAK et al., 2014).

O controle do biofilme pode ocorrer de forma mecânica, com a realização de profilaxia profissional para sua remoção, ou com a escovação diária que promoverá desorganização nesse aglomerado celular (RUGG-GUNN, 2013). Compostos químicos podem ser associados ao controle do biofilme, tendo efeito antimicrobiano, principalmente (LUTOFO et al., 2009; RUGG-GUNN, 2013; PITHON et al., 2015).

Pacientes com boa coordenação motora conseguem ser instruídos para realização de controle mecânico do biofilme dental, não necessitando de compostos químicos como métodos adicionais na higiene oral (LUTOFO et al., 2009). Entretanto, pacientes com alto risco/atividade de cárie necessitam do apoio de compostos químicos para adequado controle do biofilme, como adjuvantes da escovação (LUTOFO et al., 2009; SANTOS et al., 2014; PITHON et al., 2015), caracterizando a relevância da descoberta e do desenvolvimento de novos produtos/substâncias para atuarem nessas situações específicas.

Dentre os compostos disponíveis para controle químico auxiliar do biofilme, a clorexidina é citada como a mais eficiente, sendo uma bisbiguanida, com amplo espectro de ação antimicrobiana, o que pode explicar seu efeito sobre o biofilme dental, impedindo sua formação ou reduzindo os efeitos deletérios do mesmo (VARONI et al., 2012).

Contudo, a clorexidina também pode ocasionar alterações indesejadas nos tecidos humanos, principalmente quando utilizada em altas concentrações ou por períodos superiores a 30 dias (VARONI et al., 2012). Dentre esses efeitos colaterais, os mais comumente relatados por indivíduos em uso crônico de clorexidina são: manchamento dos dentes e mucosas, alterações de paladar, ardência bucal e surgimento de úlceras (VARONI et al., 2012). Todos esses achados tendem a desaparecer com o desuso do produto (GONÇALVES; RAMOS; GASPARETTO, 2006; VARONI et al., 2012; SANTOS et al., 2014).

O caminho percorrido pela Ciência atualmente busca o desenvolvimento de novos tratamentos menos citotóxicos ao homem e eficazes em doses cada vez menores, com a finalidade de evitar o surgimento de microrganismos super-resistentes e reduzir os prováveis danos das medicações em uso (RANI; NAIDU, 2008; HARADA, 2011; COLOMA, 2013).

Nessa perspectiva, a utilização de produtos naturais para manutenção da saúde tem se mostrado como alternativa viável, pois apresenta baixo custo e fácil aceitação da população, com efeitos colaterais raros, se corretamente utilizados, e possibilidade de ação em diversos sítios, com atividades diversificadas (YUNES; PEDROSA; CECHINEL-FILHO, 2001; JEON et al, 2011; PALOMBO, 2011).

Considerando que os produtos de origem vegetal apresentam inúmeras vantagens, o óleo essencial de *Cymbopogon citratus*, que possui boa ação antimicrobiana *in vitro* (PERAZZO et al., 2012; WARAD, 2013; BOUKHATEM et al., 2014; LUCENA et al., 2015), mostra-se um produto promissor no controle químico do biofilme, o que faz com que a fitoterapia seja uma alternativa para o controle químico do biofilme dentário e seu emprego na Odontologia adquira relevância para as ações preventivas.

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária lançou no ano de 2011 a Farmacopeia Nacional de Fitoterápicos (FNF), contemplando os principais produtos naturais considerados de uso seguro e suas respectivas prescrições, na qual apresenta o *Cymbopogon citratus* como alternativa em preparações indicadas para o tratamento de insônia (BRASIL, 2011).

Diante do exposto, este trabalho se propõe a analisar a composição química do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* e investigar seus efeitos antimicrobiano e antibiofilme, avaliando, também, possível toxicidade celular.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Analisar a composição química do óleo essencial de *Cymbopogon citratus*, bem como investigar seus efeitos antimicrobiano e antibiofilme, avaliando, também, possível toxicidade celular.

### 2.2 Objetivos específicos

- Quantificar os fitoconstituintes presentes no óleo essencial de *Cymbopogon citratus*;
- Identificar efeitos antimicrobianos do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* sobre células planctônicas de *Streptococcus mutans* e *Candida albicans*;
- Verificar os efeitos do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* sobre o biofilme multiespécie *in vitro*;
- Aferir o efeito do produto, aplicado em diferentes formulações, sobre membrana de eritrócitos humanos.

### 3. METODOLOGIA

Estudo com abordagem indutiva e procedimento estatístico-comparativo, com técnica de observação direta intensiva em laboratório (LAKATOS; MARCONI, 2011).

#### 3.1 Delineamento geral do estudo

O óleo essencial de *Cymbopogon citratus* foi obtido em empresa de referência na comercialização de óleos essenciais e essências (QUINARÍ®), submetido a análise química e, posteriormente, preparado para avaliação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e do efeito antiaderente de biofilme na concentração inicial de 8mg/mL. A CIM encontrada foi utilizada como parâmetro para avaliação do efeito antibiofilme e execução do teste de hemólise.

#### 3.2 Análise química do óleo essencial

A caracterização química da substância em teste foi realizada por cromatografia, utilizando um cromatógrafo de gás acoplado a um espectrômetro de massa (CG/MS Shimadzu-QP2010 - Japão) e coluna capilar, com fase estacionária de 5% fenilo e 95% de dimetilpolissiloxano, medindo 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de espessura da película, como realizado por Oliveira et al (2014), no Instituto de Pesquisas em Fármacos e Medicamentos da Universidade Federal da Paraíba (IPeFarM/UFPB).

#### 3.3 Determinação da Concentração Inibitória Mínima

A determinação da CIM, realizada no Laboratório de Microbiologia Oral do Núcleo de Medicina Tropical da Universidade Federal da Paraíba, ocorreu por meio da técnica de microdiluição seriada, acrescentando-se aos poços das placas 100 µl de meio de cultura específico para o microrganismo, mais 100 µl da diluição do insumo farmacêutico ativo vegetal em teste de forma seriada (partindo da concentração de 2000 µg/mL até 31,25 µg/mL) e finalizando com 100 µl do inóculo ajustado, restando em cada poço 200 µl.

O efeito antimicrobiano do OE foi avaliado sobre os microrganismos: *Streptococcus mutans* UA159 (UNICAMP-SP - Brasil), *Candida albicans* ATCC 90029 (FIOCRUZ-RJ – Brasil). Os inóculos foram preparados no dia anterior e ajustados no dia do experimento, por meio de espectrofotometria, em comprimentos de onda específicos para cada microrganismo em análise.



As placas de 96 poços receberam 100 µl de BHI caldo (Brain Heart Infusion - BD – Alemanha) ou caldo Sabouraud (BD – Alemanha), para bactérias e fungos, respectivamente. Em seguida, 100 µL de cada uma das diluições seriadas do óleo essencial foram adicionados aos poços, logo após, adicionou-se uma alíquota de 100 µL de cada cepa. Os ensaios foram conduzidos em triplicata e as placas incubadas a 37°C durante 24 horas.

Após esse período, 50 µL de solução TCT 1% (2,4,6-Tricloro-1,3,5-triazine) foram colocados nos poços das placas de microdiluição, que novamente foram incubadas por 24 horas a 37°C.

Foram realizados controles da viabilidade da cepa testada (meio apenas com inóculo), bem como controle positivo (meio com inóculo e clorexidina 0,12%).

Para determinação da Concentração Bactericida Mínima e Concentração Fungicida Mínima, foram removidos 20 µL dos poços correspondentes à CIM, CIMx2 e CIMx4 e gotejados, em triplicata, sobre placas de Petri contendo meio BHI ágar (BD – Alemanha) ou ágar Sabouraud dextrose (BD – Alemanha), para bactérias e fungos, respectivamente, com incubação por 24 horas a 37°C.

### **3.4 Determinação do efeito antibiofilme**

Para determinação do efeito antibiofilme foram empregadas as cepas padrão *Streptococcus mutans* UA159 e *Candida albicans* ATCC 90029 que foram inoculadas empregando-se como meio de cultura o caldo BHI (BD – Alemanha) em parte igual de caldo Sabouraud (BD – Alemanha) e enriquecidos com 5% de sacarose.

As placas foram preparadas de acordo com o tipo de biofilme a ser avaliado, com crescimento recente (biofilme inicial) e crescimento tardio (biofilme maduro). Para simular as aplicações de bochecho, as concentrações definidas por CIM, CIM x2, CIMx4 e CIMx8 foram adicionadas aos poços das placas de microdiluição e permanecendo neles pelo tempo de 1 minuto, com posterior lavagem dos poços e nova adição de meio de cultura e incubação.

Finalizadas as etapas de banhos e incubações, as placas foram preparadas para leitura em espectrofotometria, em leitor de placas (PROMEGA GloMax-Multi – EUA) no Laboratório de Cultivo e Análise Celular da Escola Técnica de Saúde da Universidade Federal da Paraíba.

Com o intuito de simular as aplicações de bochechos e avaliar se a melhor ação do óleo se dá na inibição de formação, remoção de biofilme ou em ambas as situações, adotou-se os tempos pré-definidos listados abaixo:

- G1 – Placas com formação de biofilme inicial:  
- Cepas inoculadas e incubadas por 2 horas em estufa bacteriológica a 37°C;

- O conteúdo presente nos poços das placas foram removidos e receberam 3 banhos com 150  $\mu\text{L}$  de solução tampão fosfato salino em pH neutro (PBS);
- 50  $\mu\text{L}$  de cada meio de cultura foram adicionados aos poços e em seguida acrescidos 100  $\mu\text{L}$  das concentrações teste do OE e de clorexidina, aguardando-se 1 minuto (simulando a aplicação do bochecho);
- Decorrido o tempo estabelecido, os poços foram novamente banhados por 3 vezes com PBS e preenchidos com partes iguais de meio de cultura (50  $\mu\text{L}$  de BHI caldo e 50  $\mu\text{L}$  de caldo Sabouraud), procedendo-se com nova incubação de 12 horas;
- Processo repetido até completar 48 horas.
  - G2 – Placas com formação de biofilme maduro:
    - Cepas inoculadas e incubadas por 48 horas em estufa bacteriológica a 37°C;
    - O conteúdo presente nos poços das placas foram removidos e receberam 3 banhos com 150  $\mu\text{L}$  de solução tampão fosfato salino em pH neutro (PBS);
    - 50  $\mu\text{L}$  de cada meio de cultura foram adicionados aos poços e em seguida acrescidos 100  $\mu\text{L}$  das concentrações teste do OE e de clorexidina, aguardando-se 1 minuto (simulando a aplicação do bochecho);
    - Decorrido o tempo estabelecido, os poços foram novamente banhados por 3 vezes com PBS e preenchidos com partes iguais de meio de cultura (50  $\mu\text{L}$  de BHI caldo e 50  $\mu\text{L}$  de caldo Sabouraud), procedendo-se com nova incubação de 12 horas;
    - Processo repetido até completar 48 horas.

Foram realizados controle da viabilidade da cepa testada (meio apenas com inóculo) e controle positivo (meio com inóculo e clorexidina 0,12%).

O preparo das placas para leitura em espectrofotometria respeitava o seguinte protocolo:

- Após transcorridos as 48 horas de banhos e incubações, as placas eram lavadas 2 vezes com 200  $\mu\text{L}$  de PBS e colocadas para secar em estufa, a 37°, por 45 minutos;
- Secas, recebiam 110  $\mu\text{L}$  de solução cristal violeta (4%), aguardando-se 45 minutos para corar o biofilme formado nos poços das placas;
- Decorrido o período de coloração, as placas eram lavadas 4 vezes com 200  $\mu\text{L}$  de água destilada e recebiam 200  $\mu\text{L}$  de álcool 95%, aguardando-se mais 45 minutos;
- Finalizado os 45 minutos, 100  $\mu\text{L}$  do conteúdo presente nos poços das placas eram transferidos para uma nova placa de fundo chato e levada para leitura em leitor de placas (PROMEGA GloMax-Multi – EUA), em comprimento de onda de 525 nm.

A porcentagem de inibição/remoção de biofilme pode ser calculada pela fórmula:

$$\% = \frac{\text{absorbância encontrada} - \text{absorbância do controle negativo}}{\text{absorbância do controle positivo} - \text{absorbância do controle negativo}} * 100$$

Após definidas as porcentagens, os grupos foram classificados quanto ao grau de inibição/remoção de biofilme como proposto por Ferreira et al. (2015):

**QUADRO 1 - CLASSIFICAÇÃO DE INIBIÇÃO DE BIOFILME**

ESCORE	VALOR DE REFERÊNCIA	CATEGORIA
0	≤ 25%	não inibição
1	>25% a ≥ 50%	fraca inibição
2	>50% a ≥75%	inibição moderada
3	>75% a ≥100%	forte inibição

FONTE: FERREIRA et al. (2015).

### 3.5 Teste de hemólise

Foram utilizados eritrócitos humanos para determinação da seletividade celular do óleo de *Cymbopogon citratus*, sendo a pesquisa previamente aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual da Paraíba. A amostra contou com 5 estudantes de Pós-Graduação em Odontologia, com idades variando de 25 a 30 anos, saudáveis e que não haviam feito uso de antibióticos e anti-inflamatórios nos últimos 30 dias.

O sangue coletado foi centrifugado a 1200-1500 rpm, durante 15 minutos. O sobrenadante contendo plasma e as células brancas foi então descartado e os eritrócitos lavados em solução tampão fosfato salino por três vezes. Em seguida, os eritrócitos foram diluídos em solução a 2%. Alíquotas do preparado sanguíneo foram transferidos para placas de microdiluição com fundo em “U” e adicionadas as concentrações do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* previamente definidas nos testes de Concentração Inibitória Mínima (CIM, CIMx2, CIMx4 e CIMx8). Água destilada e soro fisiológico foram utilizados como controles positivo e negativo, respectivamente.

Após uma hora, o sobrenadante presente nos poços das placas de microdiluição com fundo em “U” foi transferido para outra placa de microdiluição com fundo chato para leitura em espectrofotometria no Laboratório de Cultivo e Análise Celular da Escola Técnica de Saúde da Universidade Federal da Paraíba.

A porcentagem de hemólise pode ser calculada pela fórmula (LIMA et al., 2015):

$$\%H = \frac{\text{absorbância encontrada} - \text{absorbância do controle negativo}}{\text{absorbância do controle positivo} - \text{absorbância do controle negativo}} * 100$$

### 3.6 Análise estatística

Os dados obtidos em cada etapa de estudo foram submetidos a estatística descritiva e inferencial, de acordo com o plano de análises específico para cada etapa do estudo (QUADRO 2), por meio do programa estatístico BioStat versão 5.3, considerando o nível de significância de 5% ( $\alpha=0,05$ ).

QUADRO 2 - QUADRO DE VARIÁVEIS E PLANOS DE ANÁLISES

Variável	Descrição	Plano de análise	Estatística aplicada
<b>CIM</b>	Valores definidos em $\mu\text{g/mL}$	Valores brutos avaliados	Estatística descritiva
<b>Porcentagem de inibição/remoção de biofilme</b>	Valores definidos em porcentagem	Aplicação de fórmula matemática específica para determinação das porcentagens	Estatística descritiva
<b>Tipos de tratamento sobre biofilme</b>	G1 – Biofilme inicial em OE; G1 – Biofilme inicial em CHX; G2 – Biofilme Maduro em OE; G2 – Biofilme Maduro em CHX.	Médias de absorbâncias analisadas pelo teste de ANOVA, complementado pelo Tukey	Estatística inferencial
<b>Porcentagem de hemólise</b>	Valores definidos em porcentagem	Aplicação de fórmula matemática específica para determinação das porcentagens	Estatística descritiva

### 3.7 Considerações éticas

Este projeto obedece às determinações da Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual da Paraíba, sob CAAE: 53237916.2.0000.5187.

ARTIGO



#### **4. ARTIGO**

PERIÓDICO: Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine

ISSN: 1741-4288

QUALIS em Odontologia: B1

FATOR DE IMPACTO: 1,88

CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E EFEITO ANTIBIOFILME DO ÓLEO  
ESSENCIAL DE *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf. – ENSAIOS PRÉ-CLÍNICOS

Naiana Baga da Silva<sup>1</sup>; Jefferson Muniz de Lima<sup>2</sup>; Ana Maria Gondim Valença<sup>2</sup>; Alessandro Leite Cavalcanti<sup>1</sup>.

1 Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Universidade Estadual da Paraíba,  
58429-500 Campina Grande, PB, Brasil

2 Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Universidade Federal da Paraíba,  
58051-900 João Pessoa, PB, Brasil

Correspondência:

Naiana Braga da Silva

e-mail: [neinabs@hotmail.com](mailto:neinabs@hotmail.com)

## RESUMO

O biofilme dentário é uma estrutura microbiana tridimensional aderida às superfícies dos dentes e que deve ser controlado, sob pena de promover doenças bucais como a cárie e a doença periodontal. O objetivo deste trabalho foi realizar análise química e avaliar o efeito antibiofilme e a toxicidade do óleo essencial de *Cymbopogon citratus*. Foi realizada Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometro de Massas para caracterização química do óleo essencial. Para verificar a ação antimicrobiana, foi determinada a Concentração Inibitória Mínima (CIM), a Concentração Bactericida Mínima (CBM) e a Concentração Fungicida Mínima (CFM). A partir dos dados de CIM, CBM e CFM, foram determinadas as concentrações para verificação do efeito antibiofilme e para o teste de hemólise sobre eritrócitos humanos. Um biofilme multiespécie foi desenvolvido *in vitro* e simuladas aplicações de bochecho sobre o mesmo, para determinar inibição da formação de biofilme ou remoção de biofilme. O componente majoritário do óleo essencial é o citral. A CIM verificada para *Streptococcus mutans* foi 1mg/mL enquanto a CIM para *Candida albicans* foi 125µg/mL, apresentando efeito microbicida para os dois microrganismos em teste. O óleo essencial foi capaz de inibir formação de biofilme ( $p < 0,05$ ), apresentando porcentagem de hemólise não tóxica para as concentrações de CIM. O óleo essencial de *Cymbopogon citratus* é antimicrobiano, antibiofilme e não tóxico para eritrócitos humanos nas concentrações inferiores a 500 µg/mL.

**Descritores:** Biofilmes; Fitoterapia; Insumo Farmacêutico

## INTRODUÇÃO

O biofilme é uma estrutura tridimensional que se forma sobre diversas superfícies sólidas tidas como substrato (KRZYŚCIAK et al, 2014). Começa com a formação de uma película adsorvida de exopolímeros, constituindo uma matriz mucilagínosa, que favorece a adesão das primeiras espécies colonizadoras, em sua maioria microrganismos aeróbicos, aumentando em espessura e complexidade com a maturação (KOO; FALSETTA; KLEIN, 2013; KRZYŚCIAK et al, 2014).

Quanto mais evoluído o biofilme, maior é sua organização, bem como o número de espécies microbianas, existindo entre elas maior interação e mais dificilmente o biofilme conseguirá ser removido ou desorganizado (VERKAIK et al, 2010; STRUŻYCKA, 2014; KRZYŚCIAK et al, 2014).

O controle mecânico regular e adequado do biofilme é a melhor forma de prevenir doenças por ele causadas (RUGG-GUNN, 2013). Porém, nem todos os indivíduos estão aptos a realizar tal tarefa da melhor forma, ou mesmo algumas condições temporárias ou permanentes impedem a adequada higiene oral por escovação dentária, fazendo-se necessário o emprego de substâncias para controle químico do biofilme (RUGG-GUNN, 2013; SANTOS et al., 2014; PITHON et al., 2015).

Os principais agentes indicados para tal função são cloreto de cetilpiridíneo, compostos fluoretados, óleos essenciais e gluconato de clorexidina, substâncias essas empregadas na



Odontologia com eficácia e segurança clínica há anos. Mas deve ser destacado que o uso de grandes dosagens e tempo prolongado desses compostos pode promover desconfortos sensitivos, como perda do paladar, e alterações nos tecidos bucais (LOTUFO et al., 2009).

Na pesquisa em Odontologia, o principal uso da fitoterapia tem-se concentrado no controle/tratamento de cárie, doença periodontal e mucosite com produtos de ação anti-inflamatória e que controlam quimicamente o biofilme dentário por ação antimicrobiana e antiaderente (JEON et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2014). Nesse sentido, já existem alguns produtos liberados pela ANVISA com indicação de antisséptico bucal, a exemplo da infusão de *Lippia sidoides* e do decócto de *Siryphnoden drom adstrigens* (BRASIL, 2011).

Uma das plantas medicinais mais cultivadas e consumidas em medicina tradicional é o *Cymbopogon citratus*, conhecido por diversos nomes populares: capim-santo, capim-limão, capim-cidreira, entre outros (OLIVEIRA; OLIVEIRA; ANDRADE, 2010; LIPORACCI; SIMÃO, 2013; ZUCCHI et al., 2013; VÁSQUEZ; MENDONÇA; NODA, 2014).

Ações antimicrobiana, anti-inflamatória, antiproliferativa de células tumorais e cicatrizante fazem do *Cymbopogon citratus* um produto natural potencialmente vantajoso para uso na área da saúde (ALMEIDA et al., 2013; BOUKHATEM et al., 2014; HALIBI; SHEIKH, 2014).

Para o desenvolvimento de novos produtos para saúde humana, protocolos de investigação devem ser seguidos para garantir a eficácia e segurança clínica. A sequência de pesquisa para novas drogas ou técnicas terapêuticas segue um caminho longo e demorado, partindo de estudos pré-clínicos (TOMÁS; GARCIA-CABALLERO; SEOANE, 2012).

Face o exposto, este trabalho teve o objetivo de caracterizar quimicamente e avaliar os efeitos antimicrobiano e antibiofilme do óleo essencial de *Cymbopogon citratus*, bem como verificar a toxicidade do mesmo e assim determinar uma concentração ideal para o desenvolvimento de uma solução de bochecho formulada com o insumo farmacêutico ativo vegetal em teste.

## **METODOLOGIA**

O óleo essencial de *Cymbopogon citratus* foi obtido em empresa de referência na comercialização de óleos essenciais e essências (QUINARÍ®) analisado quimicamente e preparado para avaliação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e do efeito antiaderente de biofilme na concentração inicial de 2mg/mL. A CIM encontrada foi utilizada como parâmetro para a execução da avaliação antibiofilme e do teste de hemólise.

### **Análise química do óleo essencial**

A caracterização química da substância de teste foi realizada por cromatografia, utilizando um cromatógrafo de gás acoplado a um espectrômetro de massa (GCMS Shimadzu modelo QP2010, Japão) e coluna capilar (J & W Scientific) com fase estacionária de 5% fenilo e 95% de dimetilpolissiloxano, medindo 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de espessura da película (OLIVEIRA et al., 2014) realizada no Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos da Universidade Federal da Paraíba (IPeFarM/UFPB).

### **Determinação da Concentração Inibitória Mínima**

A determinação da CIM, realizada no Laboratório de Microbiologia Oral do Núcleo de Medicina Tropical da Universidade Federal da Paraíba, ocorreu por meio da técnica de microdiluição, colocando 100 µL de meio de cultura nos poços das placas, sobre os quais 100 µL da concentração “mãe” do OE era acrescido e, de forma seriada, transferido de poço a poço para se conseguir as diluições teste. Finalizava-se acrescentando 100 µL dos inóculos previamente ajustados.

O inóculo foi preparado no dia anterior e ajustado no dia do experimento em espectrofotometria, em comprimento de onda de 625 nm para se obter a concentração de  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL para bactérias e, em comprimento de onda de 530 nm para concentração de  $5 \times 10^6$  UFC/mL para leveduras.

Após o ajuste, os mesmos foram diluídos para se obter a concentração de  $1,5 \times 10^6$  UFC/mL de bactérias, colocando-se 100 µl de inóculo em 10ml de meio BHI e, para as leveduras colocando-se 10 µl do inóculo ajustado em 10ml de meio Sabouraud, para se obter a concentração de  $5 \times 10^3$  UFC/mL.

A CIM bacteriana foi determinada acrescentando-se às placas de 96 poços 100 µl de BHI caldo. Em seguida, 100 µL de cada uma das diluições seriadas do óleo essencial foram adicionados aos poços, seguindo a inoculação de uma alíquota ajustada de 100 µL de *Streptococcus mutans* UA159 nos poços da placa. Os ensaios foram conduzidos em triplicata e as placas incubadas a 37°C durante 24 horas, em microaerofilia.

A CIM fúngica foi determinada acrescentando-se às placas de 96 poços 100 µl de caldo Sabouraud. Em seguida, 100 µL de cada uma das diluições seriadas do óleo essencial foram adicionados aos poços, seguindo a inoculação de uma alíquota de 100 µL das cepas *Candida albicans* ATCC 90029 nos poços das placas. Os ensaios foram conduzidos em triplicata e as placas incubadas, em aerobiose, a 37°C durante 24 horas.

Foram realizados controles da viabilidade da cepa testada, utilizando meio apenas com inóculo, e positivo, utilizando meio com inóculo e clorexidina 0,12%, para bactérias e meio com inóculo e nistatina solução, para fungos.

Após esse período, 50 µL de solução TCT 1% (2,4,6-Tricloro-1,3,5-triazine) foram colocados nos poços das placas, que novamente foram incubadas por 24 horas a 37°C.

Para determinação da Concentração Bactericida Mínima, foram removidos 50 µL dos poços correspondentes à CIM, CIMx2 e CIMx4 e gotejados sobre placas de petri contendo meio BHI ágar, com incubação por 24 horas a 37°C, em microaerofilia.

Para determinação da Concentração Fungicida Mínima, foram removidos 50 µL dos poços correspondentes à CIM, CIMx2 e CIMx4 e gotejados sobre placas de petri contendo meio ágar Sabouraud Dextrose, com incubação por 24 horas a 37°C.

Os resultados encontrados foram apresentados em tabelas, por meio de estatística descritiva.

### **Determinação do efeito antibiofilme**

Para determinação do efeito antibiofilme foram empregadas as cepas padrão *Streptococcus mutans* UA159 e *Candida albicans* ATCC 90029 que foram inoculadas empregando-se como meio de cultura o caldo BHI (BD – Alemanha) em parte igual de caldo Sabouraud (BD – Alemanha) e enriquecidos com 5% de sacarose.

As placas foram preparadas de acordo com o tipo de biofilme a ser avaliado, com crescimento recente (biofilme inicial) e crescimento tardio (biofilme maduro). Para simular as aplicações de bochecho, as concentrações definidas por CIM, CIM x2, CIMx4 e CIMx8 foram adicionadas aos poços das placas de microdiluição e permanecendo neles pelo tempo de 1 minuto, com posterior lavagem dos poços e nova adição de meio de cultura e incubação.

Finalizadas as etapas de banhos e incubações, as placas foram preparadas para leitura em espectrofotometria, em leitor de placas (PROMEGA GloMax-Multi – EUA) no Laboratório de Cultivo e Análise Celular da Escola Técnica de Saúde da Universidade Federal da Paraíba.

Com o intuito de simular as aplicações de bochechos e avaliar se a melhor ação do óleo se dá na inibição de formação, remoção de biofilme ou em ambas as situações, adotou-se os tempos pré-definidos listados abaixo:

- G1 – Placas com formação de biofilme inicial:
  - Cepas inoculadas e incubadas por 2 horas em estufa bacteriológica a 37°C;
  - O conteúdo presente nos poços das placas foram removidos e receberam 3 banhos com 150 µL de solução tampão fosfato salino em pH neutro (PBS);

- 50 µL de cada meio de cultura foram adicionados aos poços e em seguida acrescidos 100 µL das concentrações teste do OE e de clorexidina, aguardando-se 1 minuto (simulando a aplicação do bochecho);
- Decorrido o tempo estabelecido, os poços foram novamente banhados por 3 vezes com PBS e preenchidos com partes iguais de meio de cultura (50 µL de BHI caldo e 50 µL de caldo Sabouraud), procedendo-se com nova incubação de 12 horas;
- Processo repetido até completar 48 horas.
  - G2 – Placas com formação de biofilme maduro:
    - Cepas inoculadas e incubadas por 48 horas em estufa bacteriológica a 37°C;
    - O conteúdo presente nos poços das placas foram removidos e receberam 3 banhos com 150 µL de solução tampão fosfato salino em pH neutro (PBS);
    - 50 µL de cada meio de cultura foram adicionados aos poços e em seguida acrescidos 100 µL das concentrações teste do OE e de clorexidina, aguardando-se 1 minuto (simulando a aplicação do bochecho);
    - Decorrido o tempo estabelecido, os poços foram novamente banhados por 3 vezes com PBS e preenchidos com partes iguais de meio de cultura (50 µL de BHI caldo e 50 µL de caldo Sabouraud), procedendo-se com nova incubação de 12 horas;
    - Processo repetido até completar 48 horas.

Foram realizados controle da viabilidade da cepa testada (meio apenas com inóculo) e controle positivo (meio com inóculo e clorexidina 0,12%).

O preparo das placas para leitura em espectrofotometria respeitava o seguinte protocolo:

- Após transcorridos as 48 horas de banhos e incubações, as placas eram lavadas 2 vezes com 200 µL de PBS e colocadas para secar em estufa, a 37°, por 45 minutos;
- Secas, recebiam 110 µL de solução cristal violeta (4%), aguardando-se 45 minutos para corar o biofilme formado nos poços das placas;
- Decorrido o período de coloração, as placas eram lavadas 4 vezes com 200 µL de água destilada e recebiam 200 µL de álcool 95%, aguardando-se mais 45 minutos;
- Finalizado os 45 minutos, 100 µL do conteúdo presente nos poços das placas eram transferidos para uma nova placa de fundo chato e levada para leitura em leitor de placas (PROMEGA GloMax-Multi – EUA), em comprimento de onda de 525 nm.

A porcentagem de inibição/remoção de biofilme pode ser calculada pela fórmula:

$$\% = \frac{\text{absorbância encontrada} - \text{absorbância do controle negativo}}{\text{absorbância do controle positivo} - \text{absorbância do controle negativo}} * 100$$

Após definidas as porcentagens, os grupos foram classificados quanto ao grau de inibição/remoção de biofilme como proposto por Ferreira et al. (2015):

**QUADRO 3 - CLASSIFICAÇÃO DE INIBIÇÃO DE BIOFILME**

ESCORE	VALOR DE REFERÊNCIA	CATEGORIA
0	$\leq 25\%$	não inibição
1	$>25\%$ a $\geq 50\%$	fraca inibição
2	$>50\%$ a $\geq 75\%$	inibição moderada
3	$>75\%$ a $\geq 100\%$	forte inibição

FONTE: FERREIRA et al. (2015).

Os resultados encontrados foram apresentados em tabelas, por meio de estatística descritiva e inferencial, na qual a hipótese de inibição de formação ou remoção do biofilme foi testada por meio dos testes estatísticos ANOVA e Tukey, considerando-se nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ).

### **Toxicidade**

Foram utilizados eritrócitos humanos para determinação da seletividade celular do óleo de *Cymbopogon citratus*, com aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual da Paraíba para sua realização (CAAE: 53237916.2.0000.5187).

A amostra foi obtida de 5 estudantes de Pós-Graduação em Odontologia, com idades variando de 25 a 30 anos, saudáveis e que não haviam feito uso de antibióticos e anti-inflamatórios nos últimos 30 dias.

O sangue foi coletado pelo mesmo operador, com seringas descartáveis de 10 mL, nas dimensões 25x7, no período da manhã, sem necessitar de jejum prévio.

O sangue coletado foi centrifugado a 1200-1500 rpm, durante 15 minutos. O sobrenadante contendo plasma e as células brancas foi então descartado e os eritrócitos lavados em solução tampão fosfato salino por três vezes. Em seguida, os eritrócitos foram diluídos em tampão fosfato a 2%.

Alíquotas de 50  $\mu$ L do preparado sanguíneo foram transferidos para placas de microdiluição com fundo em "U" e adicionados 50  $\mu$ l das concentrações do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* previamente definidas nos testes de Concentração Inibitória Mínima (CIM, CIMx2, CIMx4 e CIMx8) nas formulações em água destilada (AD) e em soro fisiológico (SF) sob pH neutro e pH natural do produto (pH 4).

Água destilada e soro fisiológico foram utilizados como controles positivo e negativo, respectivamente.

Após uma hora de contato entre as soluções e o sangue preparado, 70 µL do sobrenadante presente nos poços das placas de microdiluição com fundo em “U” foram transferidos para placas de microdiluição com fundo chato para leitura em espectrofotometria no Laboratório de Cultivo e Análise Celular da Escola Técnica de Saúde da Universidade Federal da Paraíba (espectrofotômetro GloMax-Multi detection – PROMEGA, Estados Unidos).

A porcentagem de hemólise pode ser calculada pela fórmula (LIMA et al., 2015):

$$\%H = \frac{\text{absorbância encontrada} - \text{absorbância do controle negativo}}{\text{absorbância do controle positivo} - \text{absorbância do controle negativo}} * 100$$

Os resultados encontrados foram apresentados em quadros, por meio de estatística descritiva.

## RESULTADOS

O ensaio realizado por Cromatografia Gasosa apresentou fitoconstituintes importantes, os quais estão presentes no óleo essencial de *Cymbopogon citratus*, todos da classe dos terpenos. O quadro abaixo permite avaliar quantitativamente sua composição:

**QUADRO 4 - FITOCONSTITUINTES IDENTIFICADOS POR CG/MS**

RT (min.)	Area %	Composto
6.357	0.19	
7.398	0.59	Hept-5-en-2-one<6-methyl->
7.534	0.53	Myrcene
14.316	0.49	Isogeranial
15.115	0.84	Isogeranial
17.784	43.48	2,6-octadienal,3,7-dimethyl-, (Z)-
18.319	0.62	Geraniol
19.121	53.27	Geranial

Os dados obtidos na avaliação antimicrobiana permitem definir o óleo essencial como antibacteriano e antifúngico, com efeito bactericida e fungicida nas concentrações determinadas como CIM bacteriana de 1 mg/mL e CIM fúngica de 125 µg/mL.

Na avaliação antibiofilme, o óleo essencial em teste apresentou efeito inibidor da formação deste, evidenciado na análise estatística por meio do teste ANOVA complementado pelo Tukey, adotando-se nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ), como apresentado na tabela a seguir:

**TABELA 1 - DETERMINAÇÃO DO EFEITO ANTIBIOFILME**

GRUPO TESTE	ABSORBÂNCIA
G1 CHX (µg/mL)	
<b>50</b>	0,099±0,010 ab
<b>25</b>	0,161±0,038 ab
<b>12,5</b>	0,117±0,022 ab
<b>6,25</b>	0,127±0,022 ab
G1 OE (µg/mL)	
<b>1000</b>	0,061±0,044 a
<b>500</b>	0,108±0,021 ab
<b>250</b>	0,120±0,021 ab
<b>125</b>	0,177±0,050 b
<b>Controle positivo</b>	0,733±0,259 c
<b>Controle negativo</b>	0,240±0,174 ab
GRUPO TESTE	ABSORBÂNCIA
G2 CHX (µg/mL)	
<b>50</b>	0,279±0,110 b
<b>25</b>	0,369±0,178 b
<b>12,5</b>	0,874±0,089 b
<b>6,25</b>	0,584±0,139 b
G2 OE (µg/mL)	
<b>1000</b>	0,993±0,022 a
<b>500</b>	0,994±0,020 a
<b>250</b>	1,007±0,010 a
<b>125</b>	0,977±0,043 a
<b>Controle positivo</b>	0,976±0,020 a
<b>Controle negativo</b>	0,379±0,014 b

\* Letras diferentes representam diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ )

Ao aplicar a classificação proposta por Ferreira et al., (2015), apresentada no quadro 1, é possível definir como “forte inibição” o potencial de inibição da formação do biofilme para o OE, sendo tão eficaz quanto a clorexidina (TABELA 2). O óleo essencial não foi capaz de remover biofilme maduro.

TABELA 2 - PORCENTAGENS DE INIBIÇÃO DE BIOFILME – RESULTADOS PARA G2

Conc. do OE ( $\mu\text{g/mL}$ )	%inibição	Conc. da CHX ( $\mu\text{g/mL}$ )	%inibição
1000	89,9	50	89,2
500	87,8	25	79,6
250	86,6	12,5	88,4
125	80,3	6,25	84,6

No quadro 4 são apresentados as absorvâncias médias e porcentagens de hemólise para as diferentes manipulações do OE. Seguindo a classificação de Carvalho e Silva et al. (2009) são considerados não tóxicos para membrana de eritrócitos os valores de até 10% de hemólise, de 10 a 49% são ligeiramente tóxicos, de 50 a 89% tóxicos e de 90 a 100% são altamente tóxicos.

Concentrações ( $\mu\text{g/mL}$ )	Absorvância OE pH 4 + SF	%	Absorvância OE + SF	%	Absorvância OE pH 4 + AD	%	Absorvância OE + AD	%
4000	0,194 $\pm$ 0,033	87,3	0,184 $\pm$ 0,068	81,6	0,178 $\pm$ 0,037	78,3	0,211 $\pm$ 0,037	97,8
2000	0,121 $\pm$ 0,029	44,1	0,151 $\pm$ 0,046	62,2	0,116 $\pm$ 0,020	41,5	0,172 $\pm$ 0,056	74,7
1000	0,049 $\pm$ 0,001	2,01	0,080 $\pm$ 0,025	19,8	0,061 $\pm$ 0,012	8,9	0,081 $\pm$ 0,017	20,8
500	0,048 $\pm$ 0,006	1,06	0,045 $\pm$ 0,003	-0,8	0,055 $\pm$ 0,013	5,5	0,052 $\pm$ 0,012	3,4
250	0,067 $\pm$ 0,038	12,4	0,039 $\pm$ 0,002	-3,9	0,067 $\pm$ 0,023	12,5	0,056 $\pm$ 0,015	5,6
125	0,040 $\pm$ 0,001	-3,7	0,036 $\pm$ 0,004	-53,6	0,067 $\pm$ 0,021	12,6	0,061 $\pm$ 0,025	9,1

QUADRO 5 - ABSORBÂNCIAS E PORCENTAGENS DE HEMÓLISE

## DISCUSSÃO

O componente majoritário do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* é o citral, um aldeído formado pelo monoterpene geranial em suas configurações cis e trans. Outros fitocompostos observados são mirceno e a sulcatona, compostos aromáticos que podem contribuir para o forte odor do OE. Os achados corroboram com a literatura quanto à composição química do produto, sendo variáveis as quantidades independentes dos fitocompostos (AVOSEH et al., 2015; EKPENYONG; AKPAN; NYOH, 2015; FURLAN et al., 2010). Essas variações podem estar relacionadas às diferenças no período e local de coleta das plantas para produção do óleo essencial (YUNES; PEDROSA; CECHINEL-FILHO, 2001).

É considerada segura a aplicação da clorexidina topicamente, em bochechos diários por um período não superior a 30 dias, nas concentrações de 0,2% a 0,05%. Em baixas concentrações, apresenta ação bacteriostática e, em altas concentrações, induz à lise da célula



por atuar na membrana celular aumentando sua permeabilidade. Apresenta ainda atividade sobre fungos e alguns vírus (VARONI et al., 2012). Contudo, pode apresentar efeitos indesejados em usos prolongados, o que justifica a presente investigação, que objetiva desenvolver um medicamento fitoterápico como alternativa para o controle químico do biofilme.

O óleo essencial de *Cymbopogon citratus* demonstrou efeito microbicida sobre *S. mutans* e *C. albicans*, destacando que não foi observada nenhuma Unidade Formadora de Colônia nas placas de Petri utilizadas para determinação da CFM e CBM.

Os resultados obtidos para CIMs com o OE podem ser considerados muito bons, de acordo com Alianni et al. (2001), pois estão em concentrações abaixo de 1mg/mL. Duarte et al. (2007) considera potente a substância com CIM menor que 500 µg/mL. Entretanto, para Holetz et al. (2002), o efeito sobre leveduras em nosso estudo pode ser considerado moderado, pois a CIM foi de 125µg/mL, estando entre 100-500µg/mL, enquanto que o efeito antibacteriano foi fraco, com CIM de 1mg/mL.

Estudo prévio, utilizando a formulação de tintura com *C. citratus*, não identificou efeito antibacteriano (SILVA et al., 2012). Porém, trabalho posterior evidenciou efeito antiaderente da tintura sobre *S. mutans* (SILVA et al., 2015), tendo sido os resultados desse estudo que instigaram nosso grupo de pesquisa a dar sequência às investigações com óleo essencial da planta em questão.

Perazzo et al. (2012) e Almeida et al. (2013) corroboram com os resultados aqui expostos para o efeito antibacteriano do óleo essencial de capim-santo, tendo Lucena et al. (2015) demonstrado que o OE pode agir como intensificador do efeito antimicrobiano de alguns antibióticos.

Interação entre *Streptococcus mutans* e *Candida albicans* já foi relatada na literatura como potencializadora da aderência das espécies em biofilme (BARBIERI et al., 2007; BERTOLINI et al., 2014). Por esse motivo, o biofilme multiespécie desenvolvido *in vitro* no presente estudo utilizou como associação microbiana esses microrganismos.

Devido a sua eficácia clínica comprovada, a clorexidina 0.12% foi escolhida como substância controle na determinação da CIM bacteriana e como produto de comparação para avaliação do efeito antibiofilme.

Rajesvari e Lakshmi (2013) destacam em sua revisão de literatura os efeitos do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* como um produto natural importante e promissor para compor soluções de bochechos, cremes dentais e fazer parte do arsenal terapêutico em Odontologia.

A presente pesquisa observou efeito antimicrobiano do óleo essencial de *Cymbopogon citratus*, contudo, a ação fungicida ocorreu em concentração bem menor quando comparada a concentração bactericida. Isso pode se dever ao mecanismo de ação do produto fitoterápico, ainda não elucidado completamente, que favorece toxicidade às células de leveduras mais intensamente do que às células bacterianas aqui estudadas. Lucena et al. (2015) sugerem que esse fitoterápico tenha bons efeitos microbicidas por ação dos terpenos (cital em maior quantidade) que o constitui.

Halibi e Sheikh (2014) evidenciaram efeito antiproliferativo sobre células neoplásicas e ação protetora sobre células saudáveis, com eliminação de radicais livres, sob uso de extratos aquoso e alcoólico do capim-santo. Rahim et al. (2014) observaram efeito hepatoprotetor na administração do extrato de *Cymbopogon citratus* sobre ratos, com atividade antioxidante importante. Esses trabalhos sugerem não ser tóxico o fitoterápico quando utilizado em baixas concentrações.

Entretanto, Sousa, Silva e Viccini (2010) observaram alterações cromossômicas significativas no ciclo celular em concentrações de até 30 mg/mL do fitomedicamento, utilizando como método para avaliar citotoxicidade e potencial mutagênico do produto seu uso sobre sementes e raízes de alface, o que sugere a possibilidade do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* ser tóxico em doses altas e enfatiza a necessidade de maior conhecimento sobre essa planta para indicação de doses baixas e adequadas.

É sabido que o uso do bochecho se dará majoritariamente sobre células epiteliais da mucosa bucal. Porém, é importante conhecer a possibilidade de penetração da substância nos tecidos e os efeitos tóxicos do produto. Sendo as hemácias células de composição simples, nas quais é possível aferir ação de drogas sobre a membrana celular (LIMA et al., 2015), optou-se pela investigação inicial do potencial tóxico do fitoterápico sobre eritrócitos humanos.

Monoterpenos são capazes de alterar a fluidez da membrana celular de eritrócitos e fibroblastos e, conseqüentemente, favorecer a penetração de substâncias no interior das células. Todavia, a depender dessa concentração e das interações com receptores da membrana, não é capaz de causar danos celulares (MENDANHA et al., 2013). Isso pode justificar o efeito protetor observado no teste de hemólise com a manipulação do óleo essencial em soro fisiológico e pH neutralizado nas concentrações inferiores a 500 µg/mL. Sugerimos ter ocorrido alteração na organização da membrana do eritrócito, impedindo a perda ou ganho de conteúdo para o meio, favorecendo a manutenção da célula intacta.

O presente trabalho foi realizado com controle das adversidades ambientais, possuindo limitações inerentes aos trabalhos laboratoriais, não correspondendo às reais condições

observadas em humanos, servindo como etapa inicial para investigações futuras mais próximas das situações encontradas na natureza.

## CONCLUSÃO

Diante da metodologia adotada e dos resultados obtidos, conclui-se que o óleo essencial de *Cymbopogon citratus* demonstrou efeito antimicrobiano sobre *Streptococcus mutans* e *Candida albicans*, bem como foi capaz de inibir formação de biofilme multiespécie *in vitro*, apresentando baixa toxicidade sobre membrana celular de eritrócitos nas concentrações inferiores a 500µg/mL.

## CONFLITOS DE INTERESSE

Este trabalho não apresenta conflitos de interesse.

## REFERÊNCIAS

- ALIGIANNIS, N.; KALPOUTZAKIS, E.; MITAKU, S.; CHINO, I. B. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. **J Agric Food Chem.** 2001; 49:4168-4170
- ALMEIDA. R. B. A.; AKISUE. G.; CARDOSO. L. M. L.; JUNQUEIRA. J. C.; JORGE. A. O. C. Antimicrobial activity of the essential oil of *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf. On *Staphylococcus* spp. *Streptococcus mutans* and *Candida* spp. **Rev Bras Pl Med.** Campinas. 2013; 15(4): 474-482
- AVOSEH, O.; OYEDEJI, O.; RUNGQU, P.; NKEH-CHUNGAG, B.; OYEDEJI, A. *Cymbopogon* species; Ethnopharmacology, phytochemistry and the pharmacological importance. **Molecules.** 2015; 20:7438-7453
- BARBIERI. D. S. V.; VICENTI. V. A.; FRAIZ. F. C.; LAVORANTI. O. J.; SVIDZINSKI. T. I. E.; PINHEIRO. R. L. Analysis of the *in vitro* adherence of *Streptococcus mutans* and *Candida albicans* **Braz J Microbiol.** São Paulo. 2007; 38(4)
- BERTOLINI. M. M.; CAVALCANTI. Y. W.; BORDIN. D.; SILVA. W. J.; CURY. A. A. D. B. *Candida albicans* biofilms and MMA surface treatment influence the adhesion of soft denture liners to PMMA. **Bra Oral Res. São Paulo.** 2014; 28(1)
- BOUKHATEM. M. N.; FERHAT. M. A.; KAMELI. A.; SAIDI. F.; KEBIR. H. T. Lemon grass (*Cymbopogon citratus*) essential oil as a potent anti-inflammatory and antifungal drugs. **Libyan J Med.** 2014;9 Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3402/ljm.v9.25431>>

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Formulário de Fitoterápicos da Farmacopéia Brasileira** / Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa. 2011.

CARVALHO E SILVA, V. R.; FERREIRA, S. B.; FERREIRA, V. F.; LIMA, E. S.; VASCONCELOS, M. C. Avaliação da atividade citotóxica de triazóis em *Artemia franciscana* e eritrócitos humanos. **Reg da 61ª reunião anual da SBPC**. 2009. Acesso em <<http://www.sbpcnet.org.br/livro/61ra/>>

DUARTE, M.C.T.; LEME, E.E.; DELARMELINA, C.; SOARES, A.A.; FIGUEIRA, G.M.; SARTORATTO, A. Activity of essential oils from Brazilian medicinal plants on *Escherichia coli*. **Journal of Ethnopharmacology**. 2007; 111(2):197-201.

EKPENYONG, C. E.; AKPAN, E.; NYOH, A. Ethnopharmacology, phytochemistry and biological activities of *Cymbopogon citratus* (DC.) Stap extracts. **Chin j nat med**. 2015; 13(5):321-337

FERREIRA. GLS. Atividade antifúngica. mecanismo de ação e ação antibiofilme da cloramina T sobre *Candida* spp. João Pessoa. 2015. Dissertação [Mestrado em Odontologia]. Universidade Federal da Paraíba. 2015.

FURLAN. M. R.; MARTINS. R. C. C.; RODRIGUES. E.; ACALCO. N.; NEGRI. G.; LAGO. J. H. G. Variação dos teores de constituintes voláteis de *Cymbopogon citratus* (DC) Stap. Poaceae. coletados em diferentes regiões do Estado de São Paulo. **Rev Brasileira de Farmacognosia**. 2010;20(5):686-691

GONÇALVES. L. B.; RAMOS. A. L.; GASPARETTO. A. Avaliação do efeito da clorexidina 0.12% na redução de bactérias viáveis em aerossóis gerados em procedimento de profilaxia. **Rev Dental Press Ortodon Ortop Facial**. 2006; 11(3):88-92

HALIBI. M. F.; SHEIKH. B. Y. Anti-Proliferative Effect and Phytochemical Analysis of *Cymbopogon citratus* Extract. **BioMed Research International**. 2014

HOLETZ, F. B.; PESSINI, G. L.; SANCHES, N. R.; CORTEZ, D. A. G.; NAKAMURA, C. V. DIAS-FILHO, B. P. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. 2002; 97(7):1027-1031

KOO. H. FALSETTA. M. L.; KLEIN. M. I. The exopolysaccharide matrix: a virulence determinant of cariogenic biofilm. **J Dent Res**. 2013; 92(12):1065-1073

KRZYŚCIAK W. JURCZAK A. KOŚCIELNIAK D. BYSTROWSKA B. SKALNIAK A. The virulence of *Streptococcus mutans* and the ability to form biofilms. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**. 2014; 33(4):499-515

LIMA, J.M.; SARMENTO, R. R.; SOUZA, J. R.; BRAYNER, F. A.; FEITOSA, A. P. S.; PADILHA, R.; ALVES, L. C.; PORTO, I. J.; BATISTA, R. F. B. D.; OLIVEIRA, J. E.; MEDEIROS, E. S.; BONAN, P. R. F.; CASTELLANO, L. R. Evaluation of hemagglutination activity of chitosan nanoparticles using human erythrocytes. **BioMed Res Intern**. 2015 Acesso em <<http://dx.doi.org/10.1155/2015/247965>>

LIPORACCI. H.S.N.; SIMÃO. D.G. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais nos quintais do Bairro Novo Horizonte. Ituiutaba. MG. **Rev Bras Pl Med**. 2013; 15(4):529-540

LOTUFO. R. F. M.; PANNUTI. C. M.; CALIL. C. M.; FENG. H. S.; SEKIGUCHI. R. T.; CARVALHO. V. F. Controle químico do biofilme dentário supragengival: revisão de literatura. **Rev Periodontia**. 2009; 19(1):34-42

LUCENA. B. F. F.; TINTINO. S. R. FIGUEREDO. F. G.; OLIVEIRA. C. D. M.; AGUIAR. J. J. S.; CARDOSO. E. N.; AQUINO. P. E. A.; ANDRADE. J. C.; COUTINHO. H. D. M.; MATIAS. E. F. F. Evaluación de la Actividad Antibacteriana y Moduladora de Aminoglucósidos de Aceite Escencial de *Cymbopogon Citratus* (DC.) Stapf. **Acta Biol Colomb**. 2015; 20(1):39-45

MEDANHA, S. A.; MOURA, S. S.; ANJOS, J. L. V.; VALADARES, M. C.; ALONSO, A. Toxicity of terpenes on fibroblast cells compared to their hemolytic potential and increase in erythrocyte membrane fluidity. **Tox in vitro**. 2013; 27:323-329

OLIVEIRA. G. L.; OLIVEIRA. A. F. M.; ANDRADE. L. H. C. Plantas medicinais utilizadas na comunidade urbana de Muribeca. Nordeste do Brasil **Acta Bot Bras**. 2010; 24(2):571-577

OLIVEIRA. J. A.; SILVA. I. C. G.; TRINDADE. L. A.; LIMA. E. O.; CARLO. H. L.; CAVALCANTI. A. L.; CASTRO. R. D. Safety and Tolerability of Essential Oil from *Cinnamomum zeylanicum* Blume Leaves with Action on Oral Candidosis and Its Effect on the Physical Properties of the Acrylic Resin. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**. 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1155/2014/325670>>

PERAZZO. M. F.; COSTA-NETA. M. C.; CAVALCANTI. Y. W.; XAVIER. A. F. C.; CAVALCANTI. A. L. Efeito antimicrobiano do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* sobre bactérias formadoras do biofilme dentário. **Rev Brasileira de Ciências da Saúde**. 2012; 16(4):553-558

PITHON. M. M.; SANT'ANNA. L. I. D. A.; BAIÃO. F. C. S.; SANTOS. R. L.; COQUEIRO. R. S.; MAIA. L. C. Assesment of the effectiveness of mouthwashes in reducing cariogenic biofilm in orthodontic patients: a sistematic review. **J Dentistry**. 2015; 42: 297-308

RAHIM, S. M.; TAHA, E. M.; AL-JANABI, M. S.; AL-DOURI, B. I.; SIMON, K. D.; MAZLAN, A. G. Hepatoprotective effect of *Cymbopogon citratus* aqueous extract against hydrogen peroxide-induced liver injury in male rats. **Afr J Tradit Complement Altern Med**. 2014; 11(2):447-451

RAJESVARI. R.; LAKSHIMI. T. Lemon grass oil for improvement of oral health – mini review. **Dental Hypotheses**. 2013; 4(4)

RUGG-GUNN. A. Dental caries: strategies to control this preventable disease. **Acta Medica Academica**. 2013; 42(2):117-130

SANTOS. I. R. M.; MOREIRA. A. C. A.; COSTA. M. G. C.; BARBOSA. M. C. Effect of 0.12% chlorhexidine in reducing microorganisms found in aerosol used for dental prophylaxis of patients submitted to fixed orthodontic treatment. **Dental Press J Orthod**. 2014; 19(3):95-101

SILVA, N. B.; CLAUDINO, L. V.; COSTA, A. C.; LIMA, A. L.; CARNEIRO, T. F.; ALEXANDRIA, A. F.; VALENÇA, A. M. G.; CAVALCANTI, A. L. In vitro antimicrobial activity of mouth washes and herbal products against dental biofilm-forming bacteria. **Contmp Clin Dentis**. 2012; 3:302-305

SILVA, N. B.; VALENÇA, A. M. G.; COSTA, A. C.; CAVALCANTI, A. L. Atividade antiaderente de produtos fitoterápicos sobre *Streptococcus mutans*. **Rev Bras Cienc Saúde**. 2015; 19(1):49-54

SOUSA, S. M.; SILVA, P. M. S.; VICCINI, L. F. Cytogenotoxicity of *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf (lemon grass) aqueous extracts in vegetal test systems. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**. 2010; 82(2): 305-311

TOMÁS, I.; GARCIA-CABALLERO, L.; SEOANE, J. M. Structural characteristics of in situ undisturbed human oral biofilm and activity of antimicrobial agents. **Current Microscopy Contributions to Advances in Science and Technology**. A. Mendez-Villas ed. 2012. Disponível em: < <http://www.formatex.info/microscopy5/book/91-102.pdf>>

VÁSQUEZ; S. P. F.; MENDONÇA, M. S.; NODA, S. N. Etnobotânica de plantas medicinais em comunidades ribeirinhas do Município de Manacapuru, Amazonas, Brasil. **Acta Amazonica**. 2014; 44(4): 457-472

VARONI, E.; TARCE, M.; LODI, G.; CARRASI, A. Chlorhexidina (CHX) in dentistry: state of the art. **Minerva Estomatol**. 2012; 61: 399-419

YUNES, R. A.; PEDROSA, R. C.; CECHINEL-FILHO, V. Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. **Quím Nova**. 2001; 24(1):147-152

ZUCCHI, M.R.; OLIVEIRA JÚNIOR, V.F.; GUSSONI, M.A.; SILVA, M.B.; SILVA, F.C.; MARQUES, N.E. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais na cidade de Ipameri – GO. **Rev Bras Pl Med**. 2013; 15(2):273-279

# CONSIDERAÇÕES FINAIS



## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O óleo essencial de *Cymbopogon citratus* apresentou efeito antimicrobiano e antibiofilme *in vitro*, não sendo tóxico para membrana de eritrócitos nas concentrações inferiores a 500 µg/mL, o que sugere ser o mesmo promissor como produto auxiliar no controle químico do biofilme dentário.



# REFERÊNCIAS



## 6. REFERÊNCIAS

- ALIGIANNIS, N.; KALPOUTZAKIS, E.; MITAKU, S.; CHINO, I. B. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. **J Agric Food Chem.** 2001; 49:4168-4170
- ALMEIDA. R. B. A.; AKISUE. G.; CARDOSO. L. M. L.; JUNQUEIRA. J. C.; JORGE. A. O. C. Antimicrobial activity of the essential oil of *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf. On *Staphylococcus* spp. *Streptococcus mutans* and *Candida* spp. **Rev Bras Pl Med.** Campinas. 2013; 15(4): 474-482
- AVOSEH, O.; OYEDEJI, O.; RUNGQU, P.; NKEH-CHUNGAG, B.; OYEDEJI, A. *Cymbopogon* species; Ethnopharmacology, phytochemistry and the pharmacological importance. **Molecules.** 2015; 20:7438-7453
- BARBIERI. D. S. V.; VICENTI. V. A.; FRAIZ. F. C.; LAVORANTI. O. J.; SVIDZINSKI. T. I. E.; PINHEIRO. R. L. Analysis of the in vitro adherence of *Streptococcus mutans* and *Candida albicans* **Braz J Microbiol.** São Paulo. 2007; 38(4)
- BERTOLINI. M. M.; CAVALCANTI. Y. W.; BORDIN. D.; SILVA. W. J.; CURY. A. A. D. B. *Candida albicans* biofilms and MMA surface treatment influence the adhesion of soft denture liners to PMMA. **Bra Oral Res. São Paulo.** 2014; 28(1)
- BOUKHATEM. M. N.; FERHAT. M. A.; KAMELI. A.; SAIDI. F.; KEBIR. H. T. Lemon grass (*Cymbopogon citratus*) essential oil as a potent anti-inflammatory and antifungal drugs. **Libyan J Med.** 2014;9 Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3402/ljm.v9.25431>>
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Formulário de Fitoterápicos da Farmacopéia Brasileira** / Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa. 2011.
- CARVALHO E SILVA, V. R.; FERREIRA, S. B.; FERREIRA, V. F.; LIMA, E. S.; VASCONCELOS, M. C. Avaliação da atividade citotóxica de triazóis em *Artemia franciscana* e eritrócitos humanos. **Reg da 61ª reunião anual da SBPC.** 2009. Acesso em <<http://www.sbpcnet.org.br/livro/61ra/>>
- COLOMA. P. M. Phase 0 clinical trials: theoretical and practical implications in oncologic drug development. **Open Access J of Clinical Trials.** 2013; 5:119–126
- DUARTE, M.C.T.; LEME, E.E.; DELARMELINA, C.; SOARES, A.A.; FIGUEIRA, G.M.; SARTORATTO, A. Activity of essential oils from Brazilian medicinal plants on *Escherichia coli*. **Journal of Ethnopharmacology.** 2007; 111(2):197-201
- EKPENYONG, C. E.; AKPAN, E.; NYOH, A. Ethnopharmacology, phytochemistry and biological activities of *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf extracts. **Chin j nat med.** 2015; 13(5):321-337
- FERREIRA. GLS. Atividade antifúngica. mecanismo de ação e ação antibiofilme da cloramina T sobre *Candida* spp. João Pessoa. 2015. Dissertação [Mestrado em Odontologia]. Universidade Federal da Paraíba. 2015

FURLAN. M. R.; MARTINS. R. C. C.; RODRIGUES. E.; ACALCO. N.; NEGRI. G.; LAGO. J. H. G. Variação dos teores de constituintes voláteis de *Cymbopogon citratus* (DC) Staf. Poaceae. coletados em diferentes regiões do Estado de São Paulo. **Rev Brasileira de Farmacognosia**. 2010;20(5):686-691

GONÇALVES. L. B.; RAMOS. A. L.; GASPARETTO. A. Avaliação do efeito da clorexidina 0.12% na redução de bactérias viáveis em aerossóis gerados em procedimento de profilaxia. **Rev Dental Press Ortodon Ortop Facial**. 2006; 11(3):88-92

HALIBI. M. F.; SHEIKH. B. Y. Anti-Proliferative Effect and Phytochemical Analysis of *Cymbopogon citratus* Extract. **BioMed Research International**. 2014

HARADA. Y. A new movement in drug development technology — Microdosing and its challenges. **Quarterly Review** . 2011; 4

JEON. J. G.; ROSALEN. P. L.; FALSETTA. M. L.; KOO. H. Natural Products in Caries Research: Current (Limited) Knowledge. Challenges and Future Perspective. **Caries Res**. 2011; 45:243-263

KOO. H. FALSETTA. M. L.; KLEIN. M. I. The exopolysaccharide matrix: a virulence determinant of cariogenic biofilm. **J Dent Res**. 2013; 92(12):1065-1073

KRZYŚCIAK W. JURCZAK A. KOŚCIELNIAK D. BYSTROWSKA B. SKALNIAK A. The virulence of *Streptococcus mutans* and the ability to form biofilms. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**. 2014; 33(4):499-515

LAKATOS, E. M.; MARCONI, M. A. Fundamentos da metodologia científica. 5ed. 2003

LIMA, J.M.; SARMENTO, R. R.; SOUZA, J. R.; BRAYNER, F. A.; FEITOSA, A. P. S.; PADILHA, R.; ALVES, L. C.; PORTO, I. J.; BATISTA, R. F. B. D.; OLIVEIRA, J. E.; MEDEIROS, E. S.; BONAN, P. R. F.; CASTELLANO, L. R. Evaluation of hemagglutination activity of chitosan nanoparticles using human erythrocytes. **BioMed Res Intern**. 2015 Acesso em < <http://dx.doi.org/10.1155/2015/247965>>

LIPORACCI. H.S.N.; SIMÃO. D.G. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais nos quintais do Bairro Novo Horizonte. Ituiutaba. MG. **Rev Bras Pl Med**. 2013; 15(4):529-540

LOTUFO. R. F. M.; PANNUTI. C. M.; CALIL. C. M.; FENG. H. S.; SEKIGUCHI. R. T.; CARVALHO. V. F. Controle químico do biofilme dentário supragengival: revisão de literatura. **Rev Periodontia**. 2009; 19(1):34-42

LUCENA. B. F. F.; TINTINO. S. R. FIGUEREDO. F. G.; OLIVEIRA. C. D. M.; AGUIAR. J. J. S.; CARDOSO. E. N.; AQUINO. P. E. A.; ANDRADE. J. C.; COUTINHO. H. D. M.; MATIAS. E. F. F. Evaluación de la Actividad Antibacteriana y Moduladora de Aminoglucósidos de Aceite Escencial de *Cymbopogon Citratus* (DC.) Stapf. **Acta Biol Colomb**. 2015; 20(1):39-45

MEDANHA, S. A.; MOURA, S. S.; ANJOS, J. L. V.; VALADARES, M. C.; ALONSO, A. Toxicity of terpenes on fibroblast cells compared to their hemolytic potential and increase in erythrocyte membrane fluidity. **Tox in vitro**. 2013; 27:323-329

OLIVEIRA. G. L.; OLIVEIRA. A. F. M.; ANDRADE. L. H. C. Plantas medicinais utilizadas na comunidade urbana de Muribeca. Nordeste do Brasil **Acta Bot Bras.** 2010; 24(2):571-577

OLIVEIRA. J. A.; SILVA. I. C. G.; TRINDADE. L. A.; LIMA. E. O.; CARLO. H. L.; CAVALCANTI. A. L.; CASTRO. R. D. Safety and Tolerability of Essential Oil from *Cinnamomum zeylanicum* Blume Leaves with Action on Oral Candidosis and Its Effect on the Physical Properties of the Acrylic Resin. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine.** 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1155/2014/325670>>

PERAZZO. M. F.; COSTA-NETA. M. C.; CAVALCANTI. Y. W.; XAVIER. A. F. C.; CAVALCANTI. A. L. Efeito antimicrobiano do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* sobre bactérias formadoras do biofilme dentário. **Rev Brasileira de Ciências da Saúde.** 2012; 16(4):553-558

PITHON. M. M.; SANT'ANNA. L. I. D. A.; BAIÃO. F. C. S.; SANTOS. R. L.; COQUEIRO. R. S.; MAIA. L. C. Assesment of the effectiveness of mouthwashes in reducing cariogenic biofilm in orthodontic patients: a sistematic review. **J Dentistry.** 2015; 42: 297-308

RAJESVARI. R.; LAKSHIMI. T. Lemon grass oil for improvement of oral health – mini review. **Dental Hypotheses.** 2013; 4(4)

RAHIM, S. M.; TAHA, E. M.; AL-JANABI, M. S.; AL-DOURI, B. I.; SIMON, K. D.; MAZLAN, A. G. Hepatoprotective effect of *Cymbopogon citratus* aqueous extract against hydrogen peroxide-induced liver injury in male rats. **Afr J Tradit Complement Altern Med.** 2014; 11(2):447-451

RANI. P. U.; NAIDU. M. U. R. Phase 0 – Microdosing strategy in clinical trials. **Indian J Pharmacol.** 2008; 40(6): 240-242

RUGG-GUNN. A. Dental caries: strategies to control this preventable disease. **Acta Medica Academica.** 2013; 42(2):117-130

SANTOS. I. R. M.; MOREIRA. A. C. A.; COSTA. M. G. C.; BARBOSA. M. C. Effect of 0.12% chlorhexidine in reducing microorganisms found in aerosol used for dental prophylaxis of patients submitted to fixed orthodontic treatment. **Dental Press J Orthod.** 2014; 19(3):95-101

SILVA, N.B.; CLAUDINO, L. V.; COSTA, A. C.; LIMA, A. L.; CARNEIRO, T. F.; ALEXANDRIA, A. F.; VALENÇA, A. M. G.; CAVALCANTI, A. L. In vitro antimicrobial activity of mouth washes and herbal products against dental biofilm-forming bactéria. **Contmp Clin Dentis.** 2012; 3:302-305

SILVA, N. B.; VALENÇA, A. M. G.; COSTA, A. C.; CAVALCANTI, A. L. Atividade antiaderente de produtos fitoterápicos sobre *Streptococcus mutans*. **RBCS.** 2015; 19:49-54

SOUSA. S. M.; SILVA. P. M. S.; VICCINI. L. F. Cytogenotoxicity of *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf (lemon grass) aqueous extracts in vegetal test systems. **Anais da Academia Brasileira de Ciências.** 2010; 82(2): 305-311

STRUZYCKA. I. The oral microbiome in dental caries. **Polish J of Microbiol.** 2014; 63(2):127-135

TOMÁS. I.; GARCIA-CABALLERO. L.; SEOANE. J. M. Structural characteristics of in situ undisturbed human oral biofilm and activity of antimicrobial agentes. **Current Microscopy Contributions to Advances in Science and Technology**. A. Mendez-Villas ed. 2012. Disponível em: < <http://www.formatex.info/microscopy5/book/91-102.pdf>>

VÁSQUEZ; S. P. F.; MENDONÇA. M. S.; NODA. S. N. Etnobotânica de plantas medicinais em comunidades ribeirinhas do Município de Manacapuru. Amazonas. Brasil. **Acta Amazonica**. 2014; 44(4): 457-472

VARONI. E.. TARCE. M.. LODI. G.. CARRASI. A. Chlorhexidina (CHX) in dentistry: state of the art. **Minerva Estomatol**. 2012; 61: 399-419

WARAD. S.; KOLAR. S.; KALBURGI. V.KALBURGI. N. Lemongrass essential oil gel as a local drug delivery agent for the treatment of periodontitis. **Ancient Science of Life**. 2013; 32(4):205

YUNES. R. A.; PEDROSA. R. C.; CECHINEL-FILHO. V. Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. **Quím Nova**. 2001; 24(1):147-152

ZUCCHI. M.R.; OLIVEIRA JÚNIOR. V.F.; GUSSONI. M.A.; SILVA. M.B.; SILVA. F.C.; MARQUES. N.E. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais na cidade de Ipameri – GO. **Rev Bras Pl Med**. 2013; 15(2):273-279

**ANEXOS**



## **7. ANEXO – NORMAS DA REVISTA**