

# Efeito Antimicrobiano e Citotóxico do Óleo Essencial de *Cymbopogon citratus* Sobre Células Odontoblastóides

Antimicrobial and Cytotoxic Effects of the Essential Oil of *Cymbopogon Citratus* on Odontoblast-Like Cells

Fernanda S. VARGAS<sup>1</sup>, Camila F. OLIVEIRA<sup>2</sup>, Elisa M. A. GIRO<sup>3</sup>, Luis V. S. SACRAMENTO<sup>4</sup>, Denise M. P. SPOLIDORIO<sup>5</sup>, Carlos A. S. COSTA<sup>6\*</sup>

1- Graduanda em Odontologia pela Faculdade de Odontologia, UNESP, Campus de Araraquara.

2- Pós-graduanda (doutorado) em Ciências Odontológicas, área de Odontopediatria, pela Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP.

3- Prof<sup>a</sup>. Adjunta da disciplina de Odontopediatria do Departamento de Clínica Infantil da Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP.

4- Prof. Adjunto do Departamento de Princípios Ativos Naturais e Toxicologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara - UNESP.

5- Prof<sup>a</sup>. Adjunta da disciplina de Patologia do Departamento de Fisiologia e Patologia da Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP.

6- Prof. Titular da disciplina de Patologia do Departamento de Fisiologia e Patologia da Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP.

## RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antimicrobiana e o efeito citotóxico do óleo essencial (OE) de capim-limão (*Cymbopogon citratus*). A partir do método de difusão em ágar, diferentes concentrações de OE (0,1%; 0,2% e 1%), e soluções controle (clorexidina (Chx), água destilada (Ad) e álcool de cereais (Ac) foram aplicados sobre culturas de *Candida albicans* (C.a), *Streptococcus mutans* (S.m), *Streptococcus sobrinus* (S.sob) e *Lactobacillus acidophilus* (L.a). Para C.a, S.m e S.sob, os maiores halos de inibição, em ordem decrescente foram: Chx, Ac e óleo 1%, sendo os dois últimos semelhantes estatisticamente (Mann-Whitney,  $p > 0,05$ ). Para L.a, o maior halo de inibição foi observado para a Chx, seguido do óleo a 1%, 0,2%, 0,1% e Ac. Para avaliação da citotoxicidade foram determinados os seguintes grupos: OE a

0,1%; G2: OE puro; G3 (controle positivo): H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; G4: álcool de cereais (Ac); e G5 (controle negativo): meio de cultura (DMEM). As soluções foram aplicadas sobre cultura de células MDPC-23 (30.000 células/cm<sup>2</sup>) semeadas em placas de 24 wells. O metabolismo celular foi avaliado pelo teste do MTT. Considerando G5 como 100% de metabolismo celular, foi observado para os grupos G1, G2, G3, e G4 uma redução percentual no metabolismo das células de 29,6%; 82%; 81,2%; e 33,4%, respectivamente. Concluiu-se que o OE a 0,1% foi capaz de inibir o crescimento das cepas avaliadas e de causar discreta citotoxicidade sobre células odontoblastóides MDPC-23.

**PALAVRAS-CHAVE:** Citotoxicidade, atividade antimicrobiana, óleo essencial, plantas medicinais

## INTRODUÇÃO

A preocupação com a saúde humana tem estimulado a busca por métodos complementares que visam tratar as diversas enfermidades sem causar consequências adversas ao organismo. Dentre esses métodos, destaca-se a utilização das diferentes espécies de plantas como fonte de princípios ativos. Baseada na medicina popular, a Fitoterapia tem aprofundado os estudos sobre plantas medicinais buscando obter modos capazes de prevenir e/ou auxiliar no tratamento de várias doenças<sup>1</sup>. O uso de componentes das plantas na área farmacêutica tem aumentado significativamente nas últimas décadas<sup>2</sup>. Um exemplo tem ocorrido com a espécie de planta perene originária da Índia, denominada cientificamente de *Cymbopogon citratus* pertencente à família *Poaceae*, apresentando aspecto entouceirado, compacto e robusto, com até 1,2 metros de altura e rizomas semi-subterrâneos. Essa planta pode ser encontrada e é facilmente cultivada no Brasil, como também em outros países tropicais.

O *C.citratus* tem sido usado na composição de cercas vivas e na contenção de encostas para evitar-se erosões<sup>3</sup>. Todavia, sua maior importância econômica reside na produção de um óleo essencial, rico em citral, o qual é amplamente utilizado na indústria de alimentos e cosméticos<sup>4,5</sup>. Diversos pesquisadores identificaram no óleo essencial do *C.citratus* algumas propriedades antibacterianas e antifúngicas<sup>6,7</sup>, sendo utilizado como pesticida, larvicida, e repelente de insetos<sup>8</sup>. No Brasil, as folhas do *C.citratus* são usadas popularmente na preparação de chá, o qual apresenta efeitos sedativo, diurético, antipirético, antireumático e anti-inflamatório<sup>9</sup>.

O estudo das propriedades antibacterianas, antifúngicas e antiinflamatórias apresentadas pelo óleo essencial do *C.citratus* podem ser importantes numa recomendação na área odontológica. Todavia, não há informações científicas na literatura que demonstrem os efeitos do óleo essencial do *C.citratus* na Odontologia moderna.

Estudos a respeito dos efeitos antibacterianos do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* seriam interessantes para orientar o desenvolvimento de produtos contendo ativos naturais com propriedades benéficas na higienização bucal, desinfecção de próteses, nos bochechos, e também, na lavagem prévia de cavidades em procedimentos restauradores<sup>10</sup>. Como exemplo, Cordeiro<sup>11</sup>, em 2004, aponta atividade antimicrobiana e também protetora de gel dentifrício e enxaguatório bucal formulados com extratos vegetais para problemas periodontais. Trevizani *et al*<sup>12</sup>, em 2006, verificaram ação antigengivite cumulativa *in vivo* decorrente de ação antiinflamatória ou alteração na qualidade da placa dental ao estudarem o efeito de gel dentifrício formulado com extratos vegetais.

Assim, torna-se relevante uma investigação que verifique os possíveis efeitos de princípios ativos de origem vegetal sobre células de origem pulpar em cultura, e caso sejam empregados para lavagem de cavidades, a importância recai também sobre a difusão transdentária e a citotoxicidade em odontoblastos, que são as primeiras células encontradas abaixo da dentina a estarem organizadas em monocamada revestindo-a internamente<sup>13</sup>.

Para tanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a ação de diferentes concentrações do óleo essencial de *C.citratus* sobre microrganismos presentes na cavidade bucal, empregando o teste de difusão em agar, bem como analisar sua citotoxicidade sobre a linhagem de células odontoblastóides MDPC-23 mantidas em cultura.

## MATERIAL E MÉTODO

### Obtenção do óleo essencial e análise

Folhas de *C.citratus* foram coletadas no Horto de Plantas Medicinais e Tóxicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, Campus de Araraquara. Em seguida no Laboratório de Botânica do Departamento de Princípios Ativos Naturais e Toxicologia da FCF/UNESP, realizou-se o processo de obtenção do OE empregando-se uma destilação por arraste a vapor em aparelho de *Clevenger* durante 3 horas para cada lote de folhas colhido. Amostras do OE retirado das folhas foram submetidas a estudos de identificação e quantificação do citral<sup>14</sup> utilizando-se técnicas de CG/MS, no Laboratório de Cromatografia do Departamento de Química analítica do Instituto de Química, UNESP, Campus de Araraquara.

### Teste de difusão em agar

A atividade antimicrobiana de diferentes concentrações de óleo essencial do *C.citratus* (0,1%, 0,2% e 1%) foi avaliada *in vitro* através do teste de difusão em agar<sup>15</sup> utilizando-se cepas padrão de *Streptococcus mutans* (UA159), *Streptococcus sobrinus* (*S.sob*) (ATCC #25175), *Candida albicans* (*C.a*) e *Lactobacillus acidophilus* (*L.a*) (ATCC #IAL-523).

As cepas indicadoras (padrão) cresceram em caldo BHI (*Brain Heart Infusion*, BHI<sup>TM</sup>, Difco Laboratories, Detroit, MI) por 24 h a 37°C de acordo com as condições fisiológicas de cada microrganismo para obtenção do inóculo de aproximadamente 10<sup>9</sup> UFC/mL (unidades formadoras de colônias por mL), correspondente a escala nº 8 de *McFarland*.

Para o teste de difusão, uma camada base contendo 15 mL do meio de cultura BHI agar foi preparada. Após a solidificação do meio de cultura nas placas de *Petri*, foi espalhado sobre a superfície 250 µL de um dos inóculos de microrganismo a 10<sup>9</sup> UFC/mL, sendo posteriormente posicionados 6 discos de papel esterilizados (6 mm de diâmetro e 1,5 mm de espessura) sobre o meio de cultura. Para a avaliação da atividade antimicrobiana, para cada grupo, 6 discos de papel foram embebidos pelos seguintes materiais: solução aquosa do óleo essencial de *C. citratus* foi diluída em álcool de cereais nas concentrações de 0,1%, 0,2% e 1%. Para os grupos controle foram utilizados água destilada esterilizada (grupo controle positivo), álcool de cereais (controle do diluente) e clorexidina na concentração de 0,2% (grupo controle negativo).

A apresentação das cepas, das soluções experimentais bem como a identificação dos grupos e o número de amostras estão apresentados na Tabela 1.

Os discos de papel foram posicionados a 30 mm das bordas das placas e em pontos equidistantes. Foram utilizadas 6 placas para cada microrganismo, totalizando seis espécimes para cada concentração do óleo essencial.

As placas foram mantidas por 2 horas à temperatura ambiente para difusão das soluções e incubadas em estufa a 37°C de acordo com as condições fisiológicas de cada microrganismo por 24 horas. As zonas de inibição produzidas em torno dos discos de papel para cada uma das unidades experimentais foram mensuradas em milímetros (mm), com o auxílio de um paquímetro digital (*Mitutoyo*, Japan), em duas regiões, sendo considerado o maior diâmetro tanto no sentido horizontal quanto no

**Tabela 1.** Apresentação dos microrganismos, das soluções experimentais e controles, identificação dos grupos e o número de amostras representativas de cada solução proposta pela pesquisa.

Microrganismos	Óleo Essencial 1%	Óleo Essencial 0,2%	Óleo Essencial 0,1%	Água	Álcool	CHX 0,2%	TOTAL
<i>Streptococcus mutans</i>	6	6	6	6	6	6	36
<i>Streptococcus sobrinus</i>	6	6	6	6	6	6	36
<i>Candida albicans</i>	6	6	6	6	6	6	36
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	6	6	6	6	6	6	36

vertical. Os dados obtidos foram submetidos à análise estatística, onde as médias das larguras das zonas de inibição obtidas para cada material (n=6) foram avaliadas quanto à distribuição e homogeneidade de variâncias. Como a análise forneceu dados contínuos em distribuição não-normal, o teste não paramétrico de *Kruskal-Wallis* foi realizado complementado pelo teste de *Mann-Whitney*. Os testes estatísticos foram avaliados ao nível de significância de 5% ( $\alpha = 0,05$ ).

#### Teste de Citotoxicidade do Óleo Essencial sobre Células MDPC-23

Células imortalizadas de linhagem odontoblastica MDPC-23<sup>6</sup> foram cultivadas em garrafas plásticas de 75 cm<sup>2</sup> (*Costar Corp.*, Cambridge, MA, USA) em meio de cultura  $\alpha$ -MEM (*Minimum essential medium eagle alpha modification*, *Sigma Chemical Co.*, St. Louis, MO, USA) contendo 10% de soro fetal bovino (*SFB*, *Gibco*, Grand Island, NY, USA), 100 IU/mL e 100  $\mu$ g/mL, respectivamente, de penicilina e estreptomicina, e 2 mmol/L de glutamina (*Gibco*, Grand Island, NY, USA) em uma atmosfera umedecida contendo CO<sub>2</sub> a 5% e na temperatura de 37° C. Estas células foram subcultivadas a cada três dias na concentração de 30.000 células/cm<sup>2</sup>, até se obter o número células suficiente para a execução do experimento.

As células foram semeadas na concentração de 30.000 células/cm<sup>2</sup> em placas de acrílico de 24 compartimentos (12 compartimentos por grupo) e mantidas por 72 horas na incubadora. Em seguida, o meio de cultura foi substituído pelas soluções experimentais e controles. Os grupos estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Apresentação dos grupos experimentais e controles.

Grupos	Solução experimental
G1. Controle negativo	Meio de cultura (DMEM)
G2. Controle diluente	Álcool de cereais (Ac) 93,80%
G3. Controle positivo	3% de peróxido de hidrogênio (H2O2)
G4. Soluto	óleo essencial de <i>C.citratus</i> puro
G5. Diluição	óleo essencial com o Ac (0,1%)

Para obtenção da solução experimental o óleo essencial de *C.citratus* foi diluído no meio de cultura DMEM para obtenção da concentração final de 0,1%.

Todas as soluções permaneceram em contato com as células por 120 minutos em atmosfera umedecida contendo CO<sub>2</sub> a 5% e na temperatura de 37° C.

Dez amostras de cada grupo experimental e controle foram utilizados para a avaliação do metabolismo celular. Esta avaliação foi realizada por meio da aplicação do método colorimétrico do *metiltetrazolium* (*MTT Assay*). Este método determina a atividade da SDH produzida pelas mitocôndrias presentes nas células. Para a preparação da solução de MTT, 25 mg do sal de *metiltetrazolium* foram pesados em balança analítica de alta precisão (*AG 2000 GEHAKA*, Diadema, SP, Brasil) e, posteriormente, adicionados a 5 mL de solução salina de tampão fosfato (PBS), alcançando uma mistura final de concentração igual a 5mg/mL<sup>17</sup>.

Sobre as células cultivadas em placas de 24 compartimentos

aplicou-se 900  $\mu$ L de meio de cultura (DMEM) associado a 100  $\mu$ L de solução de MTT (5 mg/mL do sal metiltetrazolium em PBS). As células em contato com a solução de MTT foram incubadas em estufa umidificada na temperatura de 37° C pelo tempo de 4 horas. Decorrido este período, a solução de MTT foi aspirada cuidadosamente e substituída por 700 mL da solução de isopropanol acidificada (0,04 N de HCl). Este procedimento tem o objetivo de dissolver os cristais violeta resultante da clivagem do anel do sal de *metiltetrazolium* pela enzima desidrogenase succínica das mitocôndrias das células viáveis. Após agitação e verificação da homogeneidade das soluções, três alíquotas de 100  $\mu$ L de cada compartimento foram transferidas para uma placa de 96 compartimentos (*Costar Corp.*, Cambridge, MA, USA). Avaliou-se viabilidade celular de maneira proporcional à absorbância determinada a 570 nm em leitor de ELISA (*Multiskan*, *Ascent 354*, *Labsystems CE*, Lês Ulis, France).

A absorbância foi expressa em valores numéricos, os resultados foram determinados através da média dos valores numéricos obtidos das três alíquotas selecionadas. Os valores finais obtidos para cada grupo experimental e controle foram submetidos à análise estatística do teste não paramétrico de *Mann-Whitney*.

## RESULTADOS

### Obtenção do óleo essencial e análise

O OE obtido de *C.citratus* para este estudo apresentou 68,56% de citral (formado pelos seus isômeros, neral e geranial). O neral (forma *cis*) foi determinado no teor de 30,42% e o geranial (forma *trans*), foi determinado no teor de 38,14%. Na Figura 1 pode-se visualizar o cromatograma gerado nos procedimentos analíticos.

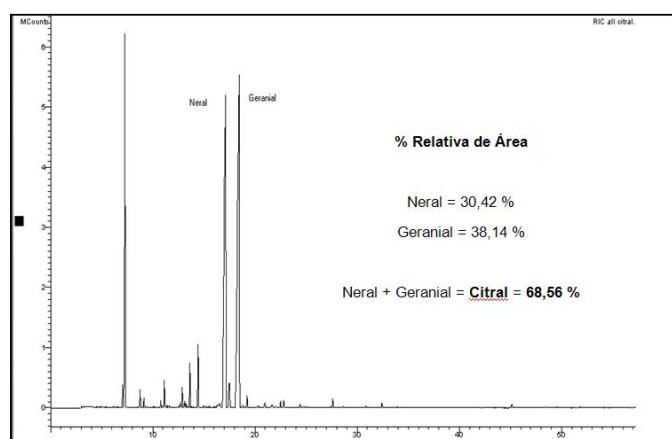


Figura 1. Cromatograma do óleo essencial do *Cymbopogon citratus*. Os Tempos de retenção para o Neral e Geranial foram 17,07 e 18,40 minutos, respectivamente.

### Teste de difusão em Agar

Quanto à análise microbiológica do óleo essencial foi realizada através das medições dos halos de inibição. Para a *Candida albicans* (*C.a*) os produtos que mais inativaram o crescimento microbiano foram o álcool de cereais, Clorexidina (Chx), óleo essencial a 1%, não sendo observada diferença estatisticamente significativa entre as três soluções.

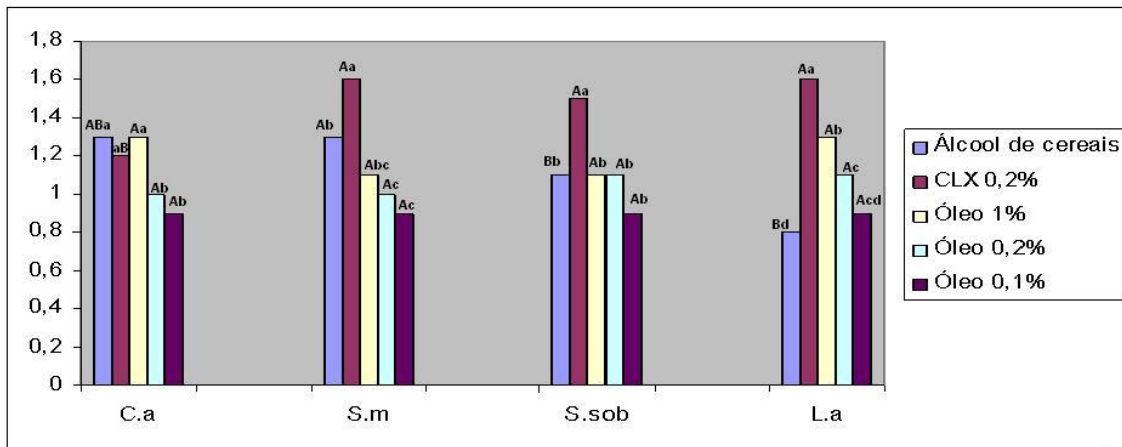


Figura 2: Comparação do efeito antimicrobiano de cada microrganismo frente a cada material testado a partir da média de diâmetros dos halos de inibição.

\*Letra maiúscula: comparação de cada material em relação aos diferentes microrganismos

\*Letra minúscula: comparação dos materiais para cada microrganismo

Para o *Streptococcus mutans* (*S.m*), a Chx revelou os maiores halos de inibição, seguida do álcool de cereais e óleo a 1%. Para o óleo essencial nas concentrações de 0,2% e 0,1%, os halos de inibição foram semelhantes aos do óleo 1% ( $p > 0,05$ ), porém estatisticamente menores do que os halos determinados para o álcool de cereais e Chx ( $p < 0,05$ ).

Em relação ao *Streptococcus sobrinus* (*S.sob*), a Chx obteve efeito inibitório superior aos demais grupos ( $p < 0,05$ ). Para o *Lactobacillus acidophilus* (*L.a*), a Chx também apresentou o maior efeito inibitório ( $p < 0,05$ ), seguido pelo óleo 1%. Os óleos 0,2 e 0,1% não apresentaram diferença entre si ( $p > 0,05$ ). Os menores halos de inibição foram determinados pelo álcool de cereais. Os valores obtidos dos halos de inibição obtidos para cada material testado estão apresentados na Figura 2.

Comparando-se o efeito de cada material sobre as diferentes cepas, observou-se que para as diferentes concentrações do óleo não houve diferença estatisticamente significativa no diâmetro dos halos de inibição, para os quatro microrganismos estudados ( $p > 0,05$ ). O álcool de cereais promoveu os maiores halos de inibição para o *S.m*, os quais foram estatisticamente maiores do que aqueles para *S.sob* e *L.a*, que não mostraram diferença entre si ( $p > 0,05$ ) e, semelhantes aos da *C.albicans*. A Chx apresentou efeito inibitório semelhante contra *S.m*, *S.sob* e *L.a* ( $p > 0,05$ ) e superior aquele apresentado contra a *C.a* ( $p < 0,05$ ).

#### Teste de citotoxicidade do óleo essencial sobre células MPDC-23

Em relação ao metabolismo celular, a análise estatística demonstrou que o óleo essencial diluído (0,1%) revelou ser menos citotóxico que os demais grupos. Considerando o grupo controle (meio de cultura) como 100% de metabolismo, foi calculada a porcentagem de redução do metabolismo celular para os demais grupos, sendo esses valores apresentados na Tabela 3.

## DISCUSSÃO

A utilização de diferentes espécies de plantas como fonte de produtos naturais é responsável pelo desenvolvimento da medicina caseira, a qual, por sua vez, tem incentivado novos es-

tudos a fim de buscar princípios ativos capazes de beneficiar a área da saúde<sup>1</sup>. O *Cymbopogon citratus*, conhecido vulgarmente por capim-limão ou erva-cidreira, é uma das plantas mais populares dos países tropicais. Seu uso na medicina caseira ocorre devido as interessantes propriedades que essa planta possui, na qual pode ser atribuído ao Citral (classificado como terpenoide), um dos princípios ativos majoritários do óleo essencial, o qual é composto por formas isoméricas denominadas de Neral (*Cis*) e Genaral (*Trans*)<sup>18</sup>. O citral é quantificado por meio de um processo conhecido como Cromatografia Gasosa/Espectrometria de Massa, sendo que na presente pesquisa foi determinado o valor percentual total de 68% de citral no óleo essencial. Na literatura específica, as concentrações de citral quantificadas pelo mesmo método variaram em torno de 65 a 85%<sup>19</sup>. Este componente é capaz de aumentar a permeabilidade da membrana celular devido uma provável interação hidrofóbica com a membrana<sup>20</sup>. Recentemente, estudos demonstraram a presença de macromoléculas, do tipo glicolipídios, presentes no lemongrass (*Cymbopogon citratus*) a partir da cromatografia. Estes glicolipídios (monogalactosilacilglicerol e digalactosilacilglicerol) são abundantes em tecidos fotossintéticos, podendo ser encontrados na porção externa das membranas celulares, na membrana mitocondrial, no retículo endotelial e cloroplastos da folha do vegetal. Nos últimos anos, estes compostos têm sido alvos de vários estudos por apresentarem atividade inibitória da *DNA-polimerase* (atividade antitumoral), das *P-selectinas* (efeito anti-inflamatório), da atividade antiviral (anti-HIV), além de inibir receptores de mem-

Tabela 3. Apresentação dos resultados do teste de citotoxicidade sobre as células odontoblastóides MDPC-23, caracterizado como inibição, em porcentagem, do metabolismo celular.

Grupos	Redução do Metabolismo Celular (%)
G1 - Óleo <i>C.Citratus</i> + Álcool de cereais (0,1%)	29,60%
G2 - Óleo Puro	82%
G3 - H2O2	81,20%
G4 - Álcool cereais	33,40%
G5 - Controle (DMEM)	0%

brana e o crescimento de linhagens de células específicas<sup>21</sup>. Tem sido também demonstrado que o óleo derivado da erva-cidreira possui efeito antimutagênico<sup>22</sup>, antioxidante<sup>23</sup>, antimicrobiano<sup>24</sup>, repelente<sup>25</sup>, ansiolítico<sup>26</sup>, analgésico<sup>27</sup>, hipoglicemiante<sup>28</sup> e não citotóxico<sup>29</sup>. Baseado na importância dessas propriedades do óleo essencial do *Cymbopogon citratus*, a presente pesquisa buscou determinar uma concentração ideal do mesmo, sendo esta suficiente para manter um efeito antimicrobiano, sobre *Candida albicans*, *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus* e não apresentar citotoxicidade para células em concentrações do óleo essencial avaliadas na presente pesquisa foram baseadas nas concentrações de clorexidina já existentes na literatura e em uso clínico, pois mesmo esta sendo uma substância sintética, ainda é considerada padrão ouro e muito utilizada como desinfetante, bem como em tratamentos alternativos para candidose<sup>30</sup>.

Diante da análise estatística dos resultados do teste microbiológico observou-se que a clorexidina 0,2% apresentou efeito inibitório para todas as cepas. Comparativamente, o óleo essencial de *Cymbopogon citratus*, em todas as concentrações, foi capaz de inibir o crescimento da *Candida albicans* (*C.a.*) de maneira dose-dependente. As concentrações do óleo essencial 0,2% e 0,1% não obtiveram diferença estatística, além disso, se mostrou inferior à inibição obtida pela Clorexidina (Chx), álcool de cereais (Ac) e óleo a 1%. A ação de inibição deste fungo seria de extrema importância, pois a *C.a.* está presente na cavidade bucal de 65% dos usuários de prótese total, sendo que este é um fungo natural e ao mesmo tempo oportunista, pois a redução da imunidade do hospedeiro pode fazer com que a *C.a.* se torne patológica para a mucosa bucal<sup>31-32</sup>.

O efeito do *C.citratus* também foi avaliado sobre *S.m.*, apresentando ação inibitória do crescimento bacteriano proporcional as diluições do óleo, porém inferior a ação do Ac. Para *S.sob* não houve diferença estatística significativa entre os grupos. Com relação ao *L.a.*, a Chx apresentou maior efeito inibitório de crescimento ( $p < 0,05$ ), seguido pelo óleo 1%, Ac, óleo 0,2% e óleo 0,1%, ou seja, a ação inibitória foi coerente com as diluições. A inativação dos microrganismos ocasionada pelo óleo essencial testado na presente pesquisa é de extrema importância, pois esses microrganismos são responsáveis por produzirem ácidos a partir da metabolização dos carboidratos oriundos da dieta do indivíduo, o que pode resultar na desmineralização do esmalte, dentina e/ou cimento, dando início ao processo de cárie dental. O *S.mutans* é o iniciador desse processo, além de proporcionar condições para o desenvolvimento do *Lactobacillus*, frequentemente encontrados em cáries com estágio avançado. Ambos constituem a substância amorfa que se encontra firmemente aderida à superfície dentária, conhecida por placa bacteriana<sup>33</sup>.

A partir do estudo microbiológico realizado neste estudo *in vitro*, foi possível selecionar a concentração de 0,1% do óleo essencial para realização do teste de citotoxicidade sobre as células odontoblastóides MDPC-23 em cultura. Os odontoblastos são células pulpares que se organizam para formar a primeira camada celular, a qual reveste internamente a dentina. Desta maneira foi interessante avaliar a citotoxicidade do óleo essencial diretamente em contato com este tipo celular, pois esta so-

lução poderá ser futuramente utilizada, devido as suas propriedades acima descritas, como agente de lavagem de cavidades no caso de tecido pulpar exposto. Nesta análise da viabilidade celular foi possível observar que o óleo essencial a 0,1% causou redução de 29,6% no metabolismo das células MDPC-23, o que caracteriza uma discreta atividade citotóxica do produto. Sendo assim, foi possível demonstrar, através dos resultados obtidos nesta pesquisa *in vitro*, a eficácia de uma baixa concentração do óleo essencial de *C.citratus* sobre microrganismos, a qual também causou discreta citotoxicidade para células de linhagem odontoblastica em cultura. Dessa maneira, é possível sugerir o desenvolvimento futuro de soluções a base *C.citratus* para limpeza de dentina contaminada após remoção parcial de cárie ou mesmo para lavagem de polpas acidentalmente expostas em decorrência da eliminação mecânica de lesões de cárie muito profundas em dentina. Porém, além da ação antimicrobiana e do baixo efeito citotóxico, novos agentes para limpeza de cavidades devem apresentar outras propriedades interessantes para tais aplicações clínicas<sup>34</sup>. Assim, novos estudos são necessários para que se possa avaliar mais profundamente esse óleo essencial de origem vegetal e sua possível aplicabilidade clínica dentro da odontologia moderna.

## CONCLUSÃO

Dentro das condições experimentais da presente pesquisa, foi possível concluir que a concentração de 0,1% do óleo essencial extraído de capim-limão (*Cymbopogon citratus*) foi eficiente para inibição das cepas avaliadas e causou discreto efeito citotóxico para as células odontoblastóides MDPC-23.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Guilherme Julião Zocolo, doutorando do Programa de Pós-graduação em Química do IQ/UNESP e ao Laboratório de Cromatografia do Departamento de Química Analítica do IQ/UNESP pela realização dos estudos de cromatografia gasosa/espectrometria de massa, e a Fernanda Campos Rosseti Lessa por sua disponibilidade em compartilhar informações técnicas importantes para a execução desta pesquisa.

## REFERÊNCIAS

01. Freitas PCD. Atividade antioxidante de espécies medicinais da família Piperaceae: *Pothomorphe umbellata* (L) Miq e *Piper regnelli* (Miq) CDC. [tese] São Paulo (SP): Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP; 1999.
02. Cavalcanti ES, Morais SM, Lima MA, Santana E. Larvicidal activity of essential oils from Brazilian plants against *Aedes aegypti* L Mem Inst Oswaldo Cruz. 2004; 99(5):541-4.
03. Costa LCB, Corrêa RM, Cardoso JCW, Pinto JEBP, Bertolucci SKV, Ferri PH. Secagem e fragmentação da matéria seca no rendimento e composição do óleo essencial de capim-limão. Hort. Bras. 2005; 23:956-9.
04. Carlini EA, Silva-Filho AR, Suchecki D, Maluf E, Calil HM, Lodder HM, et al. Farmacologia pré-clínica, clínica toxicologia do capim-cidrão, *Cymbopogon citratus*. Programa de Pesquisas em Plantas Mediciniais. 1986; 17(1):37-64.
05. Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. Inter J Food Microbiol. 2004; 94(3):223-53.

06. Mishra AK, Dubey NK. Evaluation of some essential oils for their toxicity against fungi causing deterioration of stored food commodities. *Appl Environ Microbiol.* 1994; 60(4):1101-5.
07. Cimanga K, Kambu K, Tona L, Apers S, De Bruyne T, Hermans N, et al. Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo. *J Ethnopharmacol.* 2002; 79(2):213-20.
08. Souza AEF, Araújo E, Nascimento LC. Antifungal activity of garlic and lemon Grass extracts on the development of *Fusarium proliferatum* isolated from maize grain. *Fitopatol Bras.* 2007; 32(6):465-71.
09. Blanco MM, Costa CA, Freire AO, Santos JG Jr, Costa M. Neurobehavioral effect of essential oil of *Cymbopogon citratus* in mice. *Phytomedicine.* 2009; 16(2-3):265-70.
10. Brito AMG. Avaliação da atividade antileishmanial dos óleos essenciais das plantas *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf., *Eucalyptus citriodora* Hook., *Mentha arvensis* L., e *Mentha piperita* [dissertação] Aracajú: Universidade Tiradentes; 2007.
11. Cordeiro, CHG. Atividade biológica de gel dentifríco e enxagüatório bucal contendo extratos vegetais. [dissertação] Araraquara: UNESP; 2005.
12. Trevizani, LMM; Sacramento, LVS; Sant'ana ACP; Corrêa, MA ; Pinto, RCN. Efeito de gel dentifríco a base de extratos vegetais e placebo sobre placa dental e gengivite. *Anfarmag.* 2006; 12(60):6-11.
13. Costa CAS, Hebling J, Hanks CT. Effects of light-curing time on the cytotoxicity of a restorative resin composite applied to an immortalized odontoblast-cell line. *Oper Dent.* 2003; 28(4):365-70.
14. Rauber CS, Guterres SS, Schapoval EE. LC determination of citral in *Cymbopogon citratus* volatile oil. *J Pharm Biomed Anal.* 2005; 37(3):597-601.
15. Menéndez P, Onell S, Muller S, Dellacassa B. Estudio de la actividad antimicrobiana de distintos aceites esenciales. Nota L In: Menéndez P, Onell S, Muller S, Dellacassa B. Jornada de Pesquisa da Universidade Federal de Santa Maria, 3,1993. *Anais. Santa Maria: AUGM;* 1993. 124p.
16. Hanks CT, Sun ZL, Fang DN, Edwards CA, Wataha JC, Ritchie HH, et al. Cloned 3T6 cell line from CD-1 mouse fetal molar dental papillae. *Connect Tissue Res.* 1998; 37(3-4):233-49.
17. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 1983; 65(1-2):55-63.
18. Helal GA, Sarhan MM, Abu Shahla AN, Abou El-Khair EK. Effect of *Cymbopogon citratus* L. essential oil on growth and morphogenesis of *Saccharomyces cerevisiae* ML2-strain. *J Basic Microbiol.* 2006; 46(5):375-86.
19. Nhu-Trang TT, Casabianca H, Grenier-Loustalot MF. Authenticity control of essential oils containing citronellal and citral by chiral and stable-isotope gas-chromatographic analysis. *Anal Bioanal Chem.* 2006; 386(7-8):2141-52.
20. Sikkema J, de Bont JA, Poolman B. Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. *J Biol Chem.* 1994; 269(11):8022-8.
21. Mendes BG, Machado MJ, Falkenberg M. Triagem de glicolipídios em plantas medicinais. *Ver. Bras.Farm.* 2006; 16(2):568-75.
22. Dudai N, Weinstein Y, Krup M, Rabinski T, Ofir R. Citral is a new inducer of caspase-3 in tumor cell lines. *Planta Med.* 2005; 71(5):484-8.
23. Pereira RP, Fachineto R, Prestes AS, Puntel RL, Silva GNS, Heinzmann BM, Boschetti TK, Athayde ML, Burger ME, Morel AF, Morsch VM, Rocha JBT. Antioxidant Effects of Different Extracts from *Melissa officinalis*, *Matricaria recutita* and *Cymbopogon citratus*. *Neurochem Res.* 2009; 34(5):973-83.
24. Almeida RBA, Carreto CFP, Santana RS, Furlan MR, Junqueira JC, Jorge AOC. Antimicrobial activity of *Cymbopogon citratus* (DC.) stapf against *Candida* spp. *Rev Odontol UNESP.* 2008; 37(2):147-153.
25. Olivero-Verbel J, Nerio LS, Stashenko EE. Bioactivity against *Tribolium castaneum* Herbst (Coleoptera: Tenebrionidae) of *Cymbopogon citratus* and *Eucalyptus citriodora* essential oils grown in Colombia. *Pest Manag Sci.* 2010; 66(6):664-8.
26. Leite JR, Seabra Mde L, Maluf E, Assolant K, Suchecki D, Tufik S, Klepacz S, Calil HM, Carlini EA. Pharmacology of lemongrass (*Cymbopogon citratus* Stapf). III. Assessment of eventual toxic, hypnotic and anxiolytic effects on humans. *J Ethnopharmacol.* 1986 Jul; 17(1):75-83.
27. Moron FR, Furones MA, Pinedo GZ. Ausencia de efectos antiinflamatorio y analgesico del extracto fluido de *Cymbopogon citratus* al 30 porciento por via oral. *Rev. Plant. Med.* 1996; 1(2):3-6.
28. Adeneye, AA. Protective activity of the stem bark aqueous extract of *musangacecropioides* in carbon tetrachloride and acetaminophen-induced acute hepatotoxicity in rats. *J. Trad.* 2009; 6(2):131-8.
29. Freitas MV, Netto RCM, Huss JCC, Souza TMT, Costa JO, Firmino CB, Penha-Silva N. Influence of aqueous crude extracts of medicinal plants on the osmotic stability of human erythrocytes. *Toxicol In Vitro.* 2008;22(1):219-24.
30. Ellepola ANB, Samaranyare LP. Adjunctive use of chlorhexidine in oral candidoses: a review. *Oral Dis.* 2001; 7(5):11-7.
31. Chandra J, Mukherjee PK, Leidich SD, Faddoul FF, Hoyer LL, Douglas LJ, Ghannoum MA. Antifungal resistance of candidal biofilms formed on denture acrylic *in vitro*. *J. Dent. Res.* 2001; 80(3):903-8.
32. Webb BC, Thomas CJ, Harty DW, Willcox MD. Effectiveness of two methods of denture sterilization. *J Oral Rehabil.* 1998; 25(6):416-23.
33. Zambon JJ, Kasprzak SA. The microbiology and histopathology of human root caries. *Am J Dent.* 1995; 8(6):323-28.
34. Costa, CAS. O Forramento Cavitário Ainda é uma Realidade? *Int J Braz Dent.* 2006; 2(3):192-8.

## ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the antimicrobial and cytotoxic effect of essential oil (EO) of lemon grass (*Cymbopogon citratus*). From the agar diffusion method, different concentrations of EO (0.135%, 0.2% and 1%), and control solutions (chlorhexidine (Chx), distilled water (Ad) and cereal alcohol (Ac)) were applied on cultures of *Candida albicans* (C.a), *Streptococcus mutans* (S.m), *Streptococcus sobrinus* (S.sob) and *Lactobacillus acidophilus* (L.a). For C.a, S.m and S.sob, the largest inhibition zones in descending order were: Chx, Ac and EO 1%, while the latter two were statistically similar (*Mann-Whitney*,  $p >$

0.05). For L.a, the largest inhibition halo was observed for the Chx, followed by EO at 1%, 0.2%, 0.135% and Ac. For evaluation of cytotoxicity, the following groups were set: G1: 0,1% EO; G2: pure EO; G3 (positive control): H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; G4: cereal alcohol; and G5 (negative control): culture medium – DMEM. The solutions were applied on the cultured MDPC-23 cells, which were plated (30,000 cells/cm<sup>2</sup>) in wells of 24 well-dishes. Cell metabolism was evaluated by MTT assay. Considering G5 (negative control) as 100% of cell metabolism, it was observed for G1, G2, G3 and G4 a percentage reduction in cell metabolism of 29.6%, 82%, 81.2% and 33.4%, respectively. It was concluded that the

low concentration of 0,1% OE (*C. citratus*) was able to inhibit the growth of the strains tested as well as caused mild cytotoxicity to the cultured MDPC-23 cells.

KEYWORDS: Cytotoxicity, antimicrobial activity, essential oil, medicinal plant.

---

**ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA:**

Prof. Dr. Carlos Alberto de Souza Costa  
Departamento de Fisiologia e Patologia  
Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP  
Rua Humaitá, 1680, Centro, CEP 14801-903, Araraquara - SP  
Tel.: + 55 (16) 3301 – 6477 / FAX: (16) 3301-6488  
E-mail: casouzac@foar.unesp.br