

Avaliação da Ação *In Vitro* de Gel Dentifrício Contendo Óleos Essenciais sobre Bactérias Cariogênicas

Simone M.M. OLIVEIRA ¹, Jaqueline A. LORSCHIEDER ¹ & Marisa A. NOGUEIRA ^{2*}

¹ Laboratório de Farmacotécnica, Departamento de Farmácia, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, CEP 85819-110, Cascavel, Paraná, Brasil.

² Laboratório Biofármaco, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal de Viçosa, CEP 36570-000, Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

RESUMO. A carie dental é uma patologia que ataca frequentemente a cavidade bucal, sendo considerada um problema de saúde pública. O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais obtidos de *Cymbopogon citratus*, *Eugenia caryophyllata* e *Cinnamomum zeylanicum* puros e incorporados em formulações gel dentifrício sobre as bactérias cariogênicas *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus casei* usando o método de difusão em Agar. Os resultados mostraram que tanto os óleos essenciais quanto as formulações de gel dentifrício inibiram o crescimento bacteriano, podendo ser usados para prevenção de doenças periodontais e placas bacterianas.

SUMMARY. "In vitro Evaluation of a Tooth Gel Containing Essential Oils on Cariogenic Bacteria". Dental caries are among pathologies that attack more frequently the oral cavity and it is considered a public health's problem. The aim of the present work was to analyze the essential oils obtained from *Cymbopogon citratus*, *Eugenia caryophyllata* and *Cinnamomum zeylanicum*, to be incorporated in formulation of tooth gel as well as to evaluate their antimicrobial activity against cariogenic microorganisms *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus casei* using agar diffusion methods. The results showed that the essential oils and tooth gel formulation caused inhibition on bacterial growth and so they could be used in the periodontal diseases and dental plaque prevention.

INTRODUÇÃO

A cárie dentária é uma doença infecciosa e transmissível que acompanha a humanidade desde tempos imemoriais, sendo considerada um problema de saúde pública ^{1,2}. Dentre os microrganismos envolvidos neste processo destacam-se as bactérias fermentadoras, *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus casei*, que atuam sobre os carboidratos introduzidos com a dieta alimentar do homem. Acredita-se que *S. mutans* esteja envolvido com o desenvolvimento inicial da cárie, enquanto os lactobacilos sejam os responsáveis pelo comprometimento da lesão ³.

Atualmente muitos extratos de plantas medicinais têm sido incorporados a formulações gel dentifrício na tentativa de melhorar sua ação antimicrobiana e atuar como agentes terapêuticos, porém estas formulações são sempre voltadas para o consumidor adulto. Além dos extratos de plantas medicinais, todas as formulações de gel

dentifrício contêm flúor. Este tem um papel muito importante no combate e redução da cárie, pois no meio bucal, ele aumenta a solubilidade do esmalte dentário deixando-o mais resistente perante a presença dos ácidos gerados pelas bactérias cariogênicas; abranda a quebra do esmalte e acelera o processo natural de remineralização. O flúor usado sob diferentes modalidades, como colutórios bucais, vernizes e gel dentifrício, tem a finalidade de aumentar a resistência do esmalte ⁴.

O principal problema quanto ao uso de flúor está na incorporação deste em formulações de gel dentifrício infantil, nestas formulações são incorporadas essências que promovem sabor e odor agradável fazendo com que as crianças menores de cinco anos que não possuem total controle dos músculos da deglutição ingiram em média 50% de gel dentifrício por escovação. Em alguns países como a Irlanda não é recomenda-

PALAVRAS CHAVE: Gel dentifrício, *Lactobacillus casei*, Óleos essenciais, *Streptococcus mutans*.

KEY WORDS: Essential oils, *Lactobacillus casei*, *Streptococcus mutans*, Tooth gel.

* Autor a quem correspondência deve ser enviada. E-mail: marisanogueira@ufv.br

do o uso de gel dentifrício fluoretado para crianças nesta faixa etária ^{5,6}.

Aplicação de flúor em crianças pode reduzir, significativamente, o risco de cárie. Todavia, seu aumento excessivo na corrente sanguínea, que pode ocorrer no período de odontogênese, pode ocasionar a fluorose dental, uma doença que ocorre quando há um excesso de ingestão de flúor durante a amelogênese sendo que seus principais sintomas incluem alteração de cor do esmalte, que pode ficar esbranquiçado ou exibir pequenas manchas ou linhas brancas. Nos casos mais graves, o dente adquire uma coloração acastanhada ou marrom, com perda de estruturas dentais. Esta doença afeta um grande número de crianças, principalmente as menores de cinco anos de idade pela ingestão de produtos fluoretados, seja no processo de escovação, dieta ou água fluoretada de abastecimento público ^{7,8}. Por este motivo a ingestão de flúor deve ser rigorosamente controlada em crianças nesta faixa etária. Neste sentido, a busca por agentes com atividade bactericida eficiente contra microrganismos cariogênicos e que não acarretem efeitos indesejáveis é imprescindível no combate à cárie infantil ⁹.

Os óleos essenciais são substâncias dotadas de aroma forte e quase sempre agradável, provenientes do metabolismo secundário, existente em quase duas mil espécies de plantas e distribuídas em sessenta famílias ¹⁰. São compostos derivados do metabolismo do mevalonato chamados terpenos ou terpenóides ou derivados de fenilpropanóides e estão relacionados com diversas funções necessárias à sobrevivência vegetal, exercendo papel fundamental na defesa contra ataque de microrganismos. Sabe-se que cerca de 35% dos óleos essenciais estudados exibem propriedades antimicrobianas ¹¹, porém são poucas as pesquisas desenvolvidas sobre a atividade inibitória de óleos essenciais sobre bactérias causadoras da cárie ¹².

Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar as propriedades antimicrobianas *in vitro* dos óleos essenciais de *Cymbopogon citratus* Stapf. (capim limão), *Eugenia caryophyllata* Thunb. (cravo da Índia) e *Cinnamomum zeylanicum* L. (canela) puros e em formulações de gel dentifrício frente às bactérias cariogênicas *S. mutans* e *L. casei*, usando o método de difusão em agar.

MATERIAL E MÉTODOS

Bactérias utilizadas

Foram utilizados os microrganismos *Streptococcus mutans*, ATCC 25175 e *Lactobacillus ca-*

sei isolado a partir do produto lácteo Yakult 40, utilizando-se o meio MRS (Man, Rogosa and Sharpe).

Plantas utilizadas

As folhas de capim limão (*C. citratus*) foram coletadas no herbário da Cooperativa de Cascavel (Copavel), Paraná; frutos do cravo da Índia (*E. caryophyllata*) e cascas do caule de canela (*C. zeylanicum*) foram adquiridos em supermercado.

Extração dos óleos essenciais

Os óleos essenciais foram extraídos a partir de 150 g das folhas secas e picadas de capim limão, 150 g de frutos do cravo da Índia e 150 g de cascas do caule de canela por hidrodestilação em aparelho de Clevenger por um período de 4 h. Os óleos essenciais obtidos foram acondicionados em frascos de vidro e armazenados em freezer.

Elaboração da formulação

O gel dentifrício foi elaborado a partir da seguinte formulação base: Fase A: Sorbitol 70% (20%); Polietilenoglicol 6000 (5%); Carboximetilcelulose (1,2%). Fase B: Glicerina (50%); Carbonato de cálcio (8%). Fase C: Água destilada (quantidade suficiente para 100 mL); Sacarina sódica (0,05%); Sorbitol 70% (5%); Lauril sulfato de sódio (1%). Incorporaram-se separadamente os óleos essenciais de *C. citratus* (capim limão) *E. Caryophyllata* (cravo da Índia) e *C. zeylanicum* (canela), na concentração de 5%. Para a obtenção do gel dentifrício sem a incorporação dos óleos essenciais, foi utilizada a mesma formulação base. Foram feitos 20 g de cada formulação.

Padronização das bactérias cariogênicas

A partir das bactérias *S. mutans* cultivadas em meio ágar Sangue (BHI 5% sangue), retirou-se, com alça de platina, uma colônia isolada da bactéria que foi transferida para um tubo de ensaio contendo ágar Nutriente (meio NA) inclinado, pelo método de estrias contínuas. Para as bactérias *L. casei*, a partir da placa onde foi adicionado 0,1 mL do Yakult, retirou-se uma colônia isolada, com auxílio de uma alça de platina, que foi inoculada em tubo de ensaio contendo meio ágar MRS (Man, Rogosa and Sharpe) inclinado em ápice, pelo método de estrias contínuas. Os tubos foram incubados em estufa a 37 °C, por 24 h. Após o crescimento das respectivas bactérias, fez-se a padronização do inóculo para 0,5 da escala de McFarland (1,5 x 10⁸ UFC/mL).

Avaliação da Atividade antimicrobiana

A avaliação da atividade antimicrobiana *in vitro* foi realizada pelo método de difusão em agar, utilizando-se a técnica de *hole plate*¹³. Verificou-se a sensibilidade das bactérias *S. mutans*, e *L. casei* frente aos óleos essenciais puros, nas formulações de gel dentifrício contendo os óleos essenciais e na formulação gel dentifrício base sem os óleos.

Para a realização do estudo foram utilizados 2 mg/mL dos óleos essenciais. Amostras de 0,1 g do gel de dentifrício (com e sem óleo essencial) foram diluídos em 10 mL de solução salina, sendo em seguida homogeneizados e utilizados nos testes. Os testes foram realizados em 5 repetições em placas de 150 mm usando os meios ágar NA (ágar Nutriente) para *S. mutans* e meio ágar MRS (Man, Rogosa and Sharpe) para *L. casei*. Cada placa com meio contendo o inóculo bacteriano foi perfurado em oito orifícios com auxílio de um furador de metal estéril de 3 mm de diâmetro e 5 mm de altura. Em cada um dos orifícios foi adicionado 100 µL do gel dentifrício puro; 100 µL do gel dentifrício contendo cada um dos óleos essenciais; 10 µL de cada óleo essencial; e 100 µL do Digluconato de clorexidina solução a 1%, que é um agente bacteriostático de atividade inibitória conhecida frente às bactérias estudadas, utilizado como padrão (controle positivo). Incubou-se a 37 °C por 24 h. Após este período, mediram-se os diâmetros dos halos de inibição formados.

RESULTADOS

O gel dentifrício formulado contendo os óleos essenciais apresentou-se límpido, de coloração amarelo claro, odor e sabor característico de cada óleo utilizado. A formulação do gel dentifrício sem os óleos essenciais apresentou-se límpido, coloração branca opaca e sem odor. Na formulação do gel dentifrício tomamos a precaução de não adicionar conservantes, para evitar que estes interferissem no teste. Assim pôde-se comprovar que o gel dentifrício puro não foi capaz de inibir o crescimento bacteriano, pois não apresentou halo de inibição em nenhuma das placas segundo a Tabela 1.

DISCUSSÃO

O uso de plantas medicinais já é bastante difundido na medicina popular, porém é recente o uso de gel dentifrício contendo princípios ativos a partir de plantas medicinais, sendo voltado apenas para o público adulto, com algumas marcas com bastante aceitação pelos consumidores em geral¹⁴.

	Microorganismos	
	<i>Lactobacillus casei</i>	<i>Streptococcus mutans</i>
	Halo de inibição em mm*	
Óleo cravo da Índia	23,5	10,5
Gel dentifrício + óleo 5%	22,5	7,0
Óleo canela	21,0	29,5
Gel dentifrício + óleo 5%	18,0	22,5
Óleo capim limão	12,0	21,5
Gel dentifrício + óleo 5%	6,5	6,0
Clorexidina	26,0	27,0
Gel dentifrício puro	0	0

Tabela 1. Valores de halos de inibição obtidos para óleos essenciais puros e incorporados ao gel dentifrício frente aos microrganismos *L. casei* e *S. mutans*. * Média de cinco repetições; ** Controle positivo.

Os testes realizados foram de caráter qualitativo, observando-se halos de inibição para os três óleos essenciais testados, assim como para os óleos incorporados as formulações gel dentifrício indicando que estes são capazes de inibir o crescimento das bactérias responsáveis pela cárie dental (Tabela 1). Quanto ao óleo essencial de *E. caryophyllata* (cravo da Índia), observou-se um halo de inibição maior sobre o microrganismo *L. casei* (23,5 mm) em comparação com *S. mutans* (10,5 mm). Também se constatou que a formulação do gel dentifrício não causou impacto na atividade do óleo frente ao *L. casei*, visto que os diâmetros dos halos do óleo puro e do gel dentifrício contendo óleo (22,5 mm) foram valores próximos. Quanto à bactéria *S. mutans*, a incorporação do óleo ao gel dentifrício gerou a formação de um halo de diâmetro menor (7 mm), podendo indicar que neste caso pode ter ocorrido uma interferência negativa dos componentes do gel dentifrício na atividade do óleo frente a este microrganismo (Tabela 1).

O óleo essencial de *C. zeylanicum* (canela) também inibiu o crescimento dos dois microrganismos em questão, com halos de 21 mm para o *L. casei* e 29,5 mm para o *S. mutans*. Na amostra contendo o gel dentifrício, não houve diferença significativa no halo obtido para o *L. casei* (18 mm), porém para o *S. mutans* houve um aumento do tamanho do halo formado (22,5 mm), sendo que mesmo assim o diâmetro foi próximo ao do controle positivo; portanto passível de ser utilizado nesta formulação para combater a cárie.

O óleo essencial de *C. citratus* (capim limão) também apresentou atividade de inibição do crescimento de *L. casei* e *S. mutans*, apresentan-

do halos de 12 e 21,5 mm respectivamente, mas houve uma redução considerável nos diâmetros dos halos quando se testou o gel dentifrício contendo o óleo (6,5 e 6,0 mm, respectivamente) sugerindo-se que a formulação do gel dentifrício possa ter interferido na atividade do óleo essencial frente aos dois microrganismos avaliados.

De acordo com Nascimento *et al.*¹⁵ os testes e avaliações da atividade antimicrobiana de óleos essenciais podem ser dificultados pela volatilidade do óleo, sua insolubilidade em água e complexidade química, assim estes fatores tornam os resultados da literatura difíceis de serem comparados. Além disso, na técnica de difusão em ágar a vantagem é limitada à geração de dados, fornecendo somente dados qualitativos. A característica hidrófoba da maioria dos óleos essenciais pode impedir a difusão uniforme destas substâncias através do meio contendo ágar.

CONCLUSÃO

Neste estudo verificou-se que os óleos essenciais de *E. caryophyllata*, *C. zeylanicum* e *C. citratus* apresentaram atividade inibitória *in vitro* para as bactérias cariogênicas *S. mutans* e *L. casei*, puros e também quando incorporados ao gel dentifrício.

O gel dentifrício de canela apresentou-se como o mais ativo dos três frente às bactérias testadas, seguido do gel dentifrício de cravo da Índia que se apresentou mais ativo para a bactéria *L. casei*. Por sua vez, o gel dentifrício de capim limão apresentou atividade moderada para as duas bactérias testadas. Neste caso, seria adequado incorporar este óleo essencial em associação como com os outros óleos, na tentativa de potencializar seu efeito sobre as bactérias cariogênicas testadas.

Estes microrganismos foram selecionados pela sua significativa participação no processo da cárie dentária e testados isoladamente *in vitro*, isto é, fora de seu meio natural, alterando consideravelmente seu modo de atuação, principalmente em função da ausência da saliva, e por este motivo há necessidade de realizar os testes *in vivo* para confirmação da ação terapêutica.

O estudo *in vivo* é importante e necessário, para avaliar a ação dos óleos essenciais no ambiente bucal, onde existe a ação conjunta das espécies bacterianas cariogênicas e das demais bactérias da microbiota bucal, a fim de reconfirmar os resultados dos testes *in vitro*. Se os resul-

tados dos testes *in vivo* também forem satisfatórios, poder-se-á sugerir estes óleos como agentes terapêuticos fitoterápicos eficazes no combate e prevenção da cárie, principalmente na rotina profilática em crianças de zero a cinco anos que são mais susceptíveis a fluorose dental.

Agradecimentos. Ao Professor Doutor Celso Vataru Nakamura, do Laboratório de Microbiologia Aplicada aos Produtos Naturais, Universidade Estadual de Maringá.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Dias, A.A. Saúde Bucal Coletiva: Metodologia de Trabalho e Práticas. São Paulo: Santos: 2006. 365 p.
2. Narvai, P.C. (2000) *Rev. Ciênc. Saúde Coletiva* **5**: 381-92.
3. Van Houte, J. (1993) *Adv. Dent. Res.* **7**: 87-96.
4. Araújo, I.C. (2000) *Odontologia como Promoção de Saúde*. En: Odontologia Reabilitadora: Noções Básicas para o Clínico. (M.P. da Rocha, ed.). Livraria Editora Santos. São Paulo.
5. Lima, Y.B.O. & J.A. Cury (2001) *Rev. Saúde Públ.* **35**: 576-81.
6. Van Loveren, C., C.E. Ketley, J.A. Cochran, R.M. Duckworth & D.M. O'Mullane (2004) *Community Dent. Oral* **32**: 54-61
7. Kramer, P.F., C.A. Feldens & A.R. Romano (1997) *Promoção de Saúde Bucal em Odontopediatria*. São Paulo: Artes Médicas.
8. Villena, R. & M.S. Corrêa (1998) *Flúor - Aplicação Tópica*. En: Odontopediatria na Primeira Infância (M.S. Corrêa, ed.). Livraria Editora Santos. São Paulo, págs. 315-42.
9. Nogueira, M.A., G. Diaz, P.M. Tagami & J. Lorscheide (2007) *Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.* **28**: 93-7.
10. Radunz, L.L. & E.C. Melo (2002) *Rev. Bras. Plantas Med.* **5**: 79-82
11. Oliveira, R.A.G., E.O. Lima, W.L. Vieira, K.R.L. Freire, V.N. Trajano, I.O. Lima, E.L. Souza, M.S. Toledo & R.N. Silva-Filho (2006) *Rev Bras. Farmacogn.* **16**: 77-82.
12. Koo, H., B.P.F.A. Gomes, P.L. Rosalen, G.M.B. Ambrosano, Y.K. Park & J.A. Cury (2000) *Arch. Oral Bio.* **45**: 141-8.
13. Murray, P.R., E.J. Baron, M.A. Pfaller, F.C. Tenover & R.H. Tenover (2003) *Manual of Clinical Microbiology* 8 ed. Washington, DC: ASM Press.
14. Rosell, F.L., A. Valsecki-Júnior, S.R.C. Silva & L.G. Oliveira-Júnior (2004) *Saúde Rev.* **6**: 39-44.
15. Nascimento, G.G.F., J. Locatelli, P.C. Freitas & G.L. Silva (2000) *Braz. J. Microbiol.* **31**: 247-56.