

Artigo de pesquisa científica / <http://dx.doi.org/10.15446/rcciquifa.v51n2.98452>

Avaliação do efeito antiaderente dos óleos essenciais de *Eucalyptus globulus* e *Eucalyptus citriodora* contra cepa de *Staphylococcus aureus*

Natália Oliveira Matos¹, Antônio Pereira de Araújo Neto¹, Fabiana Larissa Santos de Medeiros¹, Hillary Chystie Alves de Lima¹, Laís Sousa Maia¹, Rafaella Bandeira de Melo Souza Cavalcanti¹, Aleson Pereira de Sousa^{2*}, Abrahão Alves de Oliveira Filho¹

¹ Unidade Acadêmica de Ciências, Centro de Saúde e tecnologia Rural, Universidade Federal de Campina Grande, Patos, Brasil.

² Programa de Pós-graduação em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica de Medicamentos, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Brasil.

*Autor correspondente: aleson_155@hotmail.com

Recebido: 18 de setembro de 2021

Revisado: 15 de dezembro de 2021

Aceto: 22 de dezembro de 2021

RESUMO

Introdução: o biofilme dental é uma estrutura complexa formada a partir da adesão de variadas células microbianas à películas adquirida sobre a estrutura dentária. Essas células se aderem umas às outras enquanto sintetizam uma matriz extracelular, tornando-se uma comunidade altamente organizada, o que dificulta sua remoção e promove uma resistência aos antimicrobianos. A presença de *Staphylococcus aureus* no biofilme oral pode causar um desequilíbrio na microbiota facilitando o início de um processo de doença. **Objetivo:** avaliar a capacidade antiaderente do *Eucalyptus globulus* e *Eucalyptus citriodora* contra cepas de *Staphylococcus aureus*. **Resultados:** foi possível observar que o óleo essencial de *Eucalyptus globulus* inibiu a formação do biofilme com uma concentração inibitória mínima de aderência (CIMA) semelhante ao digluconato de clorexidina 0,12 %, ambos de 1:8. O óleo essencial de *Eucalyptus citriodora* não impediu a aderência bacteriana às paredes do tubo em nenhuma concentração avaliada. **Conclusão:** que apenas o óleo essencial da espécie *Eucalyptus globulus* possui atividade antiaderente contra *Staphylococcus aureus*, podendo ser utilizado como produto alternativo para controle do biofilme.

Palavras-chave: Biofilme dentário, óleos essenciais, fitoterapia.

SUMMARY

Evaluation of the non-stick effect of *Eucalyptus globulus* and *Eucalyptus citriodora* oils essentials against *Staphylococcus aureus* strain

Introduction: Dental biofilm is a complex structure formed from the adhesion of various microbial cells to the film acquired on the dental structure. These cells adhere to each other while synthesizing an extracellular matrix, becoming a highly organized community, which makes it difficult to remove and promotes resistance to antimicrobials. The presence of *Staphylococcus aureus* in the oral biofilm can cause an disturb in the microbiota, facilitating the beginning of a disease process.

Aim: To evaluate the non-adherent ability of *Eucalyptus globulus* and *Eucalyptus citriodora* against *Staphylococcus aureus* strains. **Results:** It was possible to observe that the essential oil of *Eucalyptus globulus* inhibited the formation of the biofilm with a Minimum Adhesive Inhibitory Concentration (MAIC) similar to 0.12 % chlorhexidine digluconate, both of 1:8. The essential oil of *Eucalyptus citriodora* did not prevent bacterial adherence to the tube walls in any evaluated concentration. **Conclusion:** Only the essential oil of the species *Eucalyptus globulus* has non-adherent activity against *Staphylococcus aureus* and can be used as an alternative product to control the biofilm.

Keywords: Dental biofilm, essential oils, phytotherapy.

RESUMEN

Evaluación del efecto antiadherente de aceites esenciales de *Eucalyptus globulus* y *Eucalyptus citriodora* frente a cepas de *Staphylococcus aureus*

Introducción: la biopelícula dental es una estructura compleja formada por la adhesión de varias células microbianas a la película adquirida en la estructura del diente. Estas células se adhieren entre sí mientras sintetizan una matriz extracelular, convirtiéndose en una comunidad altamente organizada, lo que dificulta su eliminación y promueve la resistencia a los antimicrobianos. La presencia de *Staphylococcus aureus* en el biofilm oral puede provocar un desequilibrio en la microbiota facilitando el inicio de un proceso patológico. **Objetivo:** evaluar la capacidad antiadherente de

Eucalyptus globulus y *Eucalyptus citriodora* frente a cepas de *Staphylococcus aureus*.

Resultados: se pudo observar que el aceite esencial de *Eucalyptus globulus* inhibió la formación de biopelículas con una concentración mínima inhibidora de adhesión (CIMA) equivalente al 0,12 % de gluconato de clorhexidina, ambos de 1:8. El aceite esencial de *Eucalyptus citriodora* no previno la adhesión bacteriana a las paredes del tubo en ninguna concentración evaluada. **Conclusión:** que solo el aceite esencial de la especie *Eucalyptus globulus* tiene actividad anti-adherente contra *Staphylococcus aureus*, y puede usarse como producto alternativo para el control de biopelículas.

Palabras-clave: Biopelícula dental, aceites esenciales, fitoterapia.

INTRODUÇÃO

O biofilme é definido como uma comunidade séssil de células microbianas fortemente aderidas a um substrato ou a uma superfície, composto por uma ou múltiplas espécies, embebidas em uma matriz de polímeros extracelular produzidas por elas mesmas [1]. Estes microrganismos se comunicam através de sinais emitidos a partir das células num mecanismo denominado *quorum sensing* (QS) [2]. Esta organização e composição do biofilme oral garantem uma estabilidade física que dificulta sua remoção e promove a resistência aos antimicrobianos [3].

O biofilme dental se estabelece primeiramente em áreas mais estáveis do elemento dental onde as bactérias são mais protegidas do acesso à remoção mecânica, tais como as regiões interproximais, superfícies oclusais e, supragengivalmente, ao longo da margem gengival [4]. As células organizadas em biofilmes possuem uma taxa metabólica mais eficiente, exibindo maior resistência às fontes de estresse, como mecanismos de defesa do hospedeiro [1].

Os gêneros e espécies predominantes na boca variam muito para cada indivíduo, sendo as bactérias do gênero *Staphylococcus*, um dos tipos que comumente podem ser encontrados. *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) é uma bactéria Gram-positiva, comumente associada a diversas infecções sistêmicas e localizadas [5], mas também tem demonstrado uma forte relação com infecções em implantes dentários [6]. Estes têm sido apontados como possíveis reservatórios desses microrganismos que são potencialmente patogênicos para causar infecções respiratórias [7].

O desequilíbrio da homeostasia e das respostas imune e inflamatória está diretamente associado a uma maior diversidade microbiana no biofilme. Quando isso ocorre, microorganismos que não compõem a microbiota oral podem se aproveitar dessa alteração para se integrarem no biofilme. Neste caso, com o biofilme dental desequilibrado, se inicia e se sustenta um processo de doença [8].

O controle regular do biofilme dentário através da escovação e uso do fio dental (método mecânico) e a complementação com compostos químicos compõem o principal fator de prevenção e tratamento dessas doenças. Em situações nas quais a remoção mecânica do biofilme é insatisfatória, seja por falta de destreza manual, incapacidade motora ou casos de internação hospitalar, o método químico de controle se torna ainda mais necessário [9].

Dentre os produtos químicos que podem ser utilizados como adjuvantes no controle do biofilme oral, estão os óleos essenciais que são substâncias voláteis que apresentam uma composição lipofílica, obtidos a partir de variados órgãos de plantas [10]. Vários estudos demonstraram a capacidade antibacteriana e antiaderente desses produtos naturais [11]. O eucalipto é uma das principais fontes de extração dos óleos essenciais cultivadas no Brasil, dentre as quais se destacam as espécies: *Eucalyptus globulus* (*E. globulus*), *Eucalyptus citriodora* (*E. citriodora*) e *Eucalyptus staigeriana* (*E. staigeriana*) [12].

Diante da possibilidade do uso de uma maior variedade de produtos naturais dentro da odontologia, da necessidade de compostos que causem menos efeitos indesejados e do potencial antiaderente e da atividade antimicrobiana dos óleos essenciais extraídos a partir do eucalipto, que podem contribuir na prevenção da formação do biofilme dentário, principalmente por bactérias da espécie *S. aureus*, esse estudo tornou-se justificável, tendo como objetivo a avaliação do efeito antiaderente dos óleos essenciais do *Eucalyptus globulus* e *Eucalyptus citriodora* contra *Staphylococcus aureus*.

METODOLOGIA

Ensaios in vitro

Substâncias-teste

Os óleos essenciais de *Eucalyptus globulus* e *Eucalyptos citriodora* foram adquiridos da Indústria Quinarí® (Pinhais-PR). Para a realização dos ensaios farmacológicos, o óleo

essencial puro foi solubilizada em DMSO e diluída em água destilada. A concentração de DMSO (dimetilsulfóxido) utilizada foi inferior a 0,1 % v/v.

Espécies bacterianas e meios de cultura

Foi utilizada a bactéria de origem clínica *Staphylococcus aureus* (SA 101). A cepa foi mantida em meio Agar Mueller Hinton (AMH) a uma temperatura de 4 °C, sendo utilizado para os ensaios repiques de 24 horas em AMH incubado a 35 °C. No estudo da atividade antimicrobiana foi utilizado um inóculo bacteriano de aproximadamente $1,5 \times 10^8$ UFC/mL padronizado de acordo com a turbidez do tubo 0,5 da escala de McFarland [13, 14].

Determinação da concentração inibitória mínima de aderência (CIMA)

As concentrações inibitórias mínimas de aderência (CIMA) dos óleos foram determinadas na presença de sacarose a 5 %, de acordo com Albuquerque *et al.*, (2010) [11], usando-se concentrações correspondentes ao óleo puro das espécies *E. globulus* e *E. citriodora* até a diluição 1:1024. A partir do crescimento bacteriano, a cepa de *Staphylococcus aureus* foi cultivada a 37 °C em caldo Mueller Hinton (DIFCO, Michigan, Estados Unidos), depois, foram distribuídos 0,9 mL do subcultivo em tubos de ensaio e, em seguida, adicionado 0,1 mL da solução correspondente às diluições dos óleos essenciais. A incubação foi feita a 37 °C por 24 horas com tubos inclinados a 30°. A leitura foi realizada através da observação do biofilme corado com corante fucsina, quando houvesse estrutura visual de aderência da bactéria às paredes do tubo, após a agitação do mesmo. O ensaio foi realizado em duplicata. O mesmo procedimento foi realizado para o controle positivo, com digluconato de clorexidina a 0,12 % (Periogard®, Colgate-Palmolive Company, Nova York, EUA). Foi considerada a CIMA a menor concentração do agente em contato com sacarose que impediu a aderência ao tubo de vidro.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos a partir desse estudo revelaram que a menor concentração do óleo essencial do *Eucalyptus globulus* capaz de impedir a formação do biofilme bacteriano pelo *Staphylococcus aureus* foi de 1:8, o que representa a eficiência desse óleo contra a aderência bacteriana às paredes do tubo, evidenciando um resultado compatível ao digluconato de clorexidina 0,12 %, que também apresentou uma inibição da formação do biofilme na concentração de 1:8.

Nas tabelas 1 e 2 estão representados os resultados das concentrações inibitórias mínimas de aderência dos óleos essenciais de *Eucalyptus globulus* e *Eucalyptus citriodora*

contra a cepa de *Staphylococcus aureus*, respectivamente, além do controle digluconato de clorexidina a 0,12%.

Com os resultados descritos na tabela 2 foi possível observar que o óleo de *Eucalyptus citriodora* não apresentou uma capacidade antiaderente contra a cepa de *Staphylococcus aureus* em qualquer concentração, o que é notável pela formação de biofilme nas paredes do tubo.

Tabela 1. Concentração inibitória mínima de aderência em do Óleo essencial de *Eucalyptus globulus* e do digluconato de clorexidina 0,12 % contra cepa de *Staphylococcus aureus*.

		<i>Eucalyptus globulus</i>							
Concentração	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	
	-	-	-	-	+	+	+	+	+
Digluconato de Clorexidina 0,12%									
Concentração	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	
	-	-	-	-	+	+	+	+	+

Legenda: (-) Sem adesão à parede do tubo (+) Com adesão à parede do tubo

Fonte: próprio autor (2021).

Tabela 2. Concentração inibitória mínima de aderência em do óleo essencial de *Eucalyptus citriodora* e do digluconato de clorexidina 0,12 % contra cepa de *Staphylococcus aureus*.

		<i>Eucalyptus citriodora</i>							
Concentração	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	
	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Digluconato de Clorexidina 0,12%									
Concentração	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	
	-	-	-	-	+	+	+	+	+

Legenda: (-) Sem adesão à parede do tubo (+) Com adesão à parede do tubo

Fonte: próprio autor (2021).

Os efeitos antimicrobianos do *Eucalyptus globulus* já foram evidenciados em alguns estudos como o de Mota *et al.* (2015) [15], que, ao avaliarem *in vitro* a capacidade antibacteriana deste óleo essencial através do teste de difusão em ágar, observaram que ele apresentou uma inibição superior ao controle clorexidina 0,5 % em relação ao microrganismo *Staphylococcus aureus*. O halo de inibição do óleo essencial chegou a 9 centímetros, enquanto o da clorexidina alcançou apenas 4 centímetros.

Já Rosa *et al.* (2020) [16] observou em seu estudo comparativo entre o óleo essencial e o extrato alcoólico do *Eucalyptus globulus* contra cepa do *Staphylococcus aureus* que o extrato revelou uma maior eficiência no controle da inibição do crescimento desta bactéria, com um halo de inibição de 22 milímetros frente aos 15 milímetros do óleo essencial.

Um estudo realizado por Oliveira *et al.* (2006) [17] investigaram a interferência de alguns óleos essenciais, entre eles, o de *Eucalyptus citriodora*, sobre o efeito de antibióticos utilizados na clínica. Os resultados demonstraram que o óleo essencial de *E. citriodora* apresentou sinergismo com os antibióticos ampicilina, cloranfenicol e tetraciclina contra o *Staphylococcus epidermidis* e com a tetraciclina contra o *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*. Tal estudo demonstra um moderado potencial antimicrobiano contra diversos patógenos, porém ao ser testado quanto à sua capacidade antiaderente contra *Staphylococcus aureus* não obteve resultado positivo em qualquer concentração.

Em concordância com o resultado da presente pesquisa, Ramalho *et al.* (2020) [18] ao avaliarem as concentrações inibitórias mínimas de aderência dos óleos essenciais de *Eucalyptus globulus* e *Eucalyptus citriodora* contra o microorganismo *Klebsiella pneumoniae* concluíram que houve uma inibição da adesão à parede do tubo na concentração de 1:8 do *Eucalyptus globulus* comparado ao controle digluconato de clorexidina 0,12 % que impedi a aderência microbiana na mesma concentração. Assim como o resultado do presente estudo, o óleo essencial de *Eucalyptus citriodora* não apresentou atividade antiaderente em nenhuma concentração.

Um estudo conduzido por Ramalho *et al.* (2020) [19], onde avaliaram a capacidade antiaderente dos óleos essenciais de *Eucalyptus globulus* e *Eucalyptus citriodora* contra a cepa de *Escherichia coli*, corrobora em parte o presente trabalho por ter como resultado uma Concentração Inibitória Mínima de Aderência de 1:64 para ambos os óleos essenciais, significativamente superior ao digluconato de clorexidina 0,12 %, que apresentou inibição numa concentração de 1:8. Demonstrando uma eficácia destes óleos contra a capacidade de aderência de determinadas cepas bacterianas e o potencial de uso dos mesmos como alternativa terapêutica na prevenção da formação do biofilme bacteriano.

CONCLUSÃO

Pode-se concluir, a partir dos resultados obtidos, que o óleo essencial de *Eucalyptus globulus* possui uma capacidade antiaderente contra *Staphylococcus aureus* equivalente

ao digluconato de clorexidina 0,12 %, o que salienta a possibilidade de seu uso como método alternativo favorecendo o emprego de produtos naturais, que tem o potencial de causar menos efeitos citotóxicos, na prática clínica. É importante, entretanto, que mais estudos sejam conduzidos com o objetivo expandir o conhecimento sobre o mecanismo de ação a fim de garantir o uso seguro destes produtos. No entanto, o óleo essencial de *Eucalyptus citriodora* não apresentou efeito positivo na inibição da aderência bacteriana em nenhuma das concentrações testadas para *Staphylococcus aureus*, apesar de revelar potencial antimicrobiano na literatura.

CONFLITO DE INTERESSES

Os autores declaram não haver conflito de interesses.

REFERÊNCIAS

1. W.H. Bowen, R.A. Burne, H. Wu, H. Koo, Oral biofilms: Pathogens, matrix, and polymicrobial interactions in microenvironments, *Trends in Microbiology*, **26**(3), 229-242 (2018).
2. J.S. Kavanagh, A.R. Horswill, Impact of environmental cues on staphylococcal quorum sensing and biofilm development, *Journal of Biological Chemistry*, **291**(24), 12556-12564 (2016).
3. B.W. Peterson, Y. He, A. Zerdoum, M.R. Libera, P.K. Sharma, A.J.V. Winkelhoff, D. Neut, P. Sstandley, H.C. van der Mei, H.J. Busscher, Viscoelasticity of biofilms and their recalcitrance to mechanical and chemical challenges, *FEMS Microbiology Reviews*, **39**(2), 234-245 (2015).
4. T. Larsen, N.E. Fiehn, Dental biofilm infections. An update, *APMIS*, **125**(4), 376-384 (2017).
5. H. Wang, D. Ren, Controlling *Streptococcus mutans* and *Staphylococcus aureus* biofilms with direct current and chlorhexidine, *AMB Express*, **7**, 204 (2017).
6. G.N. Belibasakis, G. Charalampakis, N. Bostanci, B. Stadlinger, Peri-implant infections of oral biofilm etiology, en: G. Donelli (editor), *Biofilm-based Healthcare-associated Infections. Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol 830, Springer, 2015, pp. 69-84.

7. LEO O'Donnell, K Smith, C Williams, CJ Nile, DF Lappin, D Bradshaw, M Lambert, DP Robertson, J Bagg, V Hannah, G Ramage. Dentures are a reservoir for respiratory pathogens. *Journal of Prosthodontics* **25**(2), 99-104, (2016).
8. M. Sanz, D. Beighton, M.A. Curtis, J.A. Cury, I. Dige, H. Dommish, R. Ellwood, R.A. Giacaman, D. Herrera, M.C. Herzberg, *et al.*, Role of microbial biofilms in the maintenance of oral health and in the development of dental caries and periodontal diseases. Consensus report of group 1 of the Joint EFP/ORCA workshop on the boundaries between caries and periodontal disease, *Journal of Clinical Periodontology*, **44**, S5-S11 (2017).
9. K. Sahni, F. Kashai, A. Forghany, T. Krasieva, P. Wilder-Smith, Exploring mechanisms of biofilm removal, *Dentistry (Sunnyvale)*, **6**(4), 371 (2016).
10. A. El Asbahani, K. Miladi, W. Badri, M. Sala, E.H.A. Addi, H. Casabianca, A. El Mousadik, D. Hartmann, A. Jilale, F.N.R. Renaud, A. Elaissari, Essential oils: From extraction to encapsulation, *International Journal of Pharmaceutics*, **483**(1-2), 220-243 (2015).
11. A.C.L. Albuquerque, M.D.S.V. Pereira, J.V. Pereira, L.F. Pereira, D.F. Silva, M.R. Macedo-Costa, J.S. Higino, Efeito antiaderente do extrato da *Matricaria recutita* Linn. sobre microorganismos do biofilme dental, *Revista de Odontologia da UNESP*, **39**(1), 21-25 (2010).
12. A.M.S. Vitti, J.O. Brito, Óleo essencial de eucalipto, *Documentos Florestais*, **17**, 1-26 (2003).
13. R. Cleeland, E. Squires, Evaluation of new antimicrobials "in vitro" and in experimental animal infections, en: V. Lorian (editor), *Antibiotics in Laboratory Medicine*, Williams & Wilkins, Baltimore, 1981, pp. 739-787.
14. F. Hadacek, H. Greger, Testing of antifungal natural products: methodologies, comparability of results and assay choice, *Phytochemical Analysis*, **11**(3), 137-147 (2000).
15. V.S. Mota, R.N.T. Turrini, V.B. Poveda, Atividade antimicrobiana do óleo de *Eucalyptus globulus*, xilitol e papaína: estudo piloto, *Revista da Escola de Enfermagem da USP*, **49**, 0216-0220 (2015).
16. P.V.S. Rosa, G.O. Everton, A.P.M. Pereira, D. Fonseca, J.C.R. Cunha, I.P. Mendonça, E.C.S. Lima, L.S. Souza, L.S. Souza, A.A.S. Dias, V.E. Mouchrek Filho,

- M.O. Arruda, Atividade bactericida do óleo essencial e extrato hidroalcoólico das folhas de *Eucalyptus globulus*, *Research, Society and Development*, **9**(7), e804974843 (2020).
17. R.A.G. Oliveira, 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, Estudo da interferência de óleos essenciais sobre a atividade de alguns antibióticos usados na clínica, *Revista Brasileira de Farmacognosia*, **16**(1), 77-82 (2006).
18. M.A.S. Ramalho, B. Santos, D.F. Ramalho, S.M.D. Cunha, R.M. Anjos, H.M.B.F. Oliveira, A.P. Sousa, A.A. Oliveira Filho, Atividade antiaderente dos óleos essenciais de *Eucalyptus globulus* e *Eucalyptus citriodora* contra cepas de *Klebsiella pneumoniae*, *Research, Society and Development*, **9**(7), e406974245 (2020).
19. D.F. Ramalho, E.F. Dantas, M.A.S. Ramalho, A.P. Sousa, H.M.B.F. Oliveira, A.A.O. Filho, Avaliação do efeito antiaderente dos óleos essenciais do *Eucalyptus citriodora* e do *Eucalyptus globulus* contra *Escherichia coli*. Editora e-Publicar, Rio de Janeiro (RJ), Brasil, 2020, 27 p.

COMO CITAR ESTE ARTIGO

N. Oliveira-Matos, A.P. de Araújo-Neto, F.L. Santos de Medeiros, H.C. Alves de Lima, L. Sousa-Maia, R.B.d.M. Souza-Cavalcanti, A. Pereira de Sousa, A.A. de Oliveira Filho, Avaliação do efeito antiaderente dos óleos essenciais de *Eucalyptus globulus* e *Eucalyptus citriodora* contra cepa de *Staphylococcus aureus*, *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, **51**(2), 871-880 (2022). Artigo de pesquisa científica / <http://dx.doi.org/10.15446/rcciquifa.v51n2.98452>