

## ***Cymbopogon citratus*: potencialização de antibióticos associados ao óleo essencial**

Ana Paula Alexandre Augusto Gonçalves<sup>1</sup>, Paloma de Souza Pereira<sup>1</sup>, Maria Silvia Bergo Guerra<sup>2</sup>

1. Graduanda do 8º semestre do Curso de Enfermagem do Centro Universitário Amparense – UNIFIA.
2. Fisioterapeuta, especialista em Fisiologia Humana, Mestre em Saúde Coletiva, Docente do Centro Universitário Amparense – UNIFIA.

### **Resumo**

**Introdução:** O uso indiscriminado de antibióticos leva ao aumento da resistência bacteriana e reflete o elevado número de casos de morbidade e mortalidade. A literatura aponta a interferência dos óleos essenciais sobre a ação de antibióticos em determinadas bactérias.

**Objetivo:** analisar a ação antimicrobiana do óleo essencial de *Cymbopogon citratus*, bem como analisar sua interferência sobre a ação de antibióticos em cultura de bactérias gram-negativa e gram-positiva.

**Metodologia:** Para alcançar os objetivos propostos foi realizado um estudo experimental, prospectivo, com grupo controle, no Laboratório de Microbiologia do Centro Universitário Amparense - UNIFIA.

**Resultados e Discussão:** Nos grupos de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* não foi observado crescimento bacteriano e foram excluídos da análise.

Na análise da *Pseudomonas aeruginosa* verificou-se que a Ceftriaxona e a Amicacina, apresentaram dados que chamaram atenção devido ao importante aumento dos seus halos.

**Conclusão:** conclui-se que o óleo associado a Amicacina e a Ceftriaxona apresentaram diâmetro de halo de sensibilidade superior a ação dessas drogas isoladas e superior ao recomendado pelo fabricante do disco de antibióticos, porém sem significância estatística, na análise da *Pseudomonas*.

**Palavras – Chave:** *Cymbopogon citratus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, óleo essencial e antibiótico.

### **Abstract**

**Introduction:** The indiscriminate use of antibiotics leads to increased bacterial resistance and reflects the high number of cases of morbidity and mortality. The literature points out the interference of essential oils on the action of antibiotics on certain bacteria. Aim: to analyze the antimicrobial action of the essential oil of *Cymbopogon citratus*, as well as to analyze its

interference on the action of antibiotics in gram-negative and gram-positive bacterial culture. Methodology: To reach the proposed objectives, an experimental, prospective study with control group was carried out at the Laboratory of Microbiology of Centro Universitário Amparense - UNIFIA. Results and Discussion: The groups of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*, no bacterial growth was observed were excluded from the analysis. In the analysis of *Pseudomonas aeruginosa*, it was verified that Ceftriaxone and Amicacina presented data that attracted attention due to the important increase of their halos. Conclusion: it was concluded that the oil associated with Amicacin and Ceftriaxone showed a halo diameter of sensitivity higher than that recommended by the manufacturer of antibiotics and the action of these drugs alone, but without statistical significance, when compared to the isolated action of the drugs, for to *Pseudomonas*.

**Key words:** *Cymbopogon citratus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, essential oil and antibiotic.

## Introdução

O capim-santo, cujo nome científico é *Cymbopogon citratus* Stapf, é também conhecido como capim-limão, capim-cidreira, capim-cheiroso, capim-cidrão, dentre outros (SANTOS et al., 2009). Pertencente à família Poaceae, de espécie herbácea com longas folhas estreitas, ásperas, agudas, aromáticas, apresentando nervura central, originária da Índia, encontrada em vários países, inclusive no Brasil (FONSECA; RECK; SILVA, 2016), tem seu cultivo atrelado à produção comercial de óleo essencial (CANAES, 2011).

Um de seus constituintes, o citral, é mistura de isômeros, geranial ( $\alpha$ -citral) e neral ( $\beta$ -citral). Ele apresenta propriedades antibacterianas e antifúngicas comprovadas (CANAES, 2011) e é relatado como capaz de aumentar a permeabilidade da membrana celular, propiciando a lise da mesma, levando a morte bacteriana (SILVA et al., 2014).

O capim-limão tem sido estudado apontando seu emprego como analgésico, calmante, espasmolítico leve, anticarcinogênico, larvicida, anti-helmíntico, inseticida, antifúngico, antibacteriano, atribuídos ao mirceno,  $\alpha$ -citral e  $\beta$ -citral, compostos de seu óleo essencial (FONSECA; RECK; SILVA, 2016).

O problema está no uso indiscriminado de antibióticos, que leva ao aumento da resistência bacteriana e reflete o elevado número de casos de morbidade e mortalidade e elevados custos com internações hospitalares. As bactérias comumente encontradas como responsáveis pelas infecções comunitárias ou hospitalares são, *Staphylococcus aureus*,

*Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*, respectivamente (BAPTISTA,2017). A proposta de associar substâncias biologicamente ativas, através de óleos essenciais adicionados aos tratamentos tradicionais pode contribuir com o aumento da sensibilidade bacteriana.

A *Staphylococcus aureus* é uma bactéria gram-positiva, anaeróbica facultativa, organizada em grupos semelhantes a cachos de uvas (CHAMPE; HARVEY; FISFHER, 2008). O seu potencial infeccioso é descrito pelo mecanismo de multiplicação e adaptação além de produzir enzimas e toxinas (ALMEIDA et al., 2016). Ela pode causar doenças como infecções localizadas da pele, infecções localizadas e profundas, endocardite aguda, septicemia, pneumonia necrosante grave, toxicoses, síndrome do choque tóxico e gastroenterite estafilocócica (CHAMPE; HARVEY; FISFHER, 2008).

A *Escherichia coli* por sua vez, é uma bactéria anaeróbica facultativa, gram-negativa (CHAMPE; HARVEY; FISFHER, 2008), tem flagelos, e o habitat é o cólon e o ambiente. Ela pode causar doenças como a diarreia e infecções urinárias (INGRAHAM; INGRAHAM, 2010)

Já a *Pseudomonas aeruginosa* é uma bactéria gram-negativa, encapsulada e aeróbica obrigatória, (CHAMPE; FISFHER; HARVEY, 2008). É caracterizada pela grande resistência antibacteriana, sendo o agente responsável por até 30% das infecções em Unidades de Terapia Intensiva (Neves et al. 2011). O tratamento é específico e se dá pela associação de antibióticos, pois apresenta mutações de resistência (CHAMPE; FISFHER; HARVEY, 2008).

A literatura aponta a interferência dos óleos essenciais sobre a ação de antibióticos em determinadas bactérias e embora valorize a medicina popular e o uso de novas substâncias biologicamente ativas, carece de aprofundamento e investigação antes de recomendar seu uso (OLIVEIRA et al, 2005).

O objetivo desta pesquisa foi analisar a ação antimicrobiana do óleo essencial de *Cymbopogon citratus*, bem como analisar sua interferência sobre a ação de antibióticos em cultura de bactérias gram-negativa e gram-positiva.

## **Metodologia**

Para alcançar os objetivos propostos foi realizado um estudo experimental, prospectivo, com grupo controle, no Laboratório de Microbiologia do Centro Universitário Amparense - UNIFIA. A pesquisa dispensou submissão ao Comitê de Ética em Pesquisa da instituição por não envolver animais ou seres humanos.

Os discos de antibiótico eram da marca DME® e continham quinze tipos de antibióticos, específicos para cada tipo de gram. O óleo essencial possuía *Cymbopogon citratus*, foi

adquirido em farmácia de manipulação, pelas pesquisadoras, com rotulação comprovando pureza.

Foram utilizadas bactérias em estado liofilizado de *Staphylococcus aureus* CCCD-S013, *Pseudomonas aeruginosa* CCCD-PO04, *Escherichia coli* CCCD-E003 que passaram por reativação em caldo lactosado e armazenados em estufa a 36°C. A *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* foram semeadas após 24hrs, ambas em meio Brain Heart Infusion Agar (BHI) através do método de espalhamento em placa.

Após o tempo de crescimento bacteriano no BHI, as cepas foram novamente semeadas em placas de petri, ambas em Ágar Mueller Hinton. O procedimento foi realizado em capela de fluxo laminar.

As bactérias foram extraídas da placa de BHI por meio da alça de inoculação, devidamente flambada, e rediluídas em solução de NaCl, estéril e homogeneizada, até obter uma solução turva. Foram pipetadas 60µl de cada solução e espalhadas nas placas através do método de espalhamento em placa, com uso da alça de Drigalski, previamente flambada.

Entretanto, a *Pseudomonas aeruginosa* permaneceu em meio lactosado durante sete dias. Decorrido esse período foram pipetados 60 µl do caldo lactosado e semeado em placas de Petri de Ágar Muller Hinton através do método de espalhamento em placa, com uso da alça de Drigalski flambada. Todo o preparo foi realizado em capela de fluxo laminar.

Cada grupo de bactéria foi preparado de forma individual. Durante a semeadura, as placas foram divididas do seguinte modo: grupo 1, chamado antibiótico, continha três placas semeadas com bactéria. Cada placa foi exposta a um disco de antibióticos, utilizados de acordo com o gram da bactéria e colocados com o auxílio da pinça estéril.

O grupo 2, denominado óleo essencial, continha três placas com bactérias que foram expostas ao óleo essencial puro, através de quinze discos estéreis de papel filtro, distribuídos na placa, do mesmo modo que o disco de antibiótico.

O grupo 3, chamado antibiótico + óleo, também contendo três placas com a bactéria, foram expostos aos discos de antibióticos associados ao óleo essencial; primeiramente foram colocados os discos e sobrepostos a ele o papel filtro embebido em óleo essencial.

Para cada tipo de bactéria foi feita uma placa de controle, contendo apenas a bactéria cultivada.

Após a realização dos procedimentos supracitados, as placas foram armazenadas em estufa aquecida, com controle de temperatura à 36°C. As placas foram avaliadas após 24 e 48 horas, através da medição dos halos de inibição.

## Análise Estatística

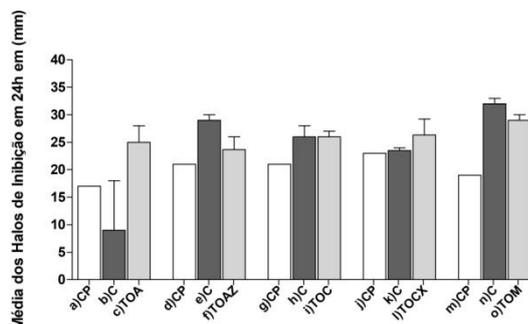
Os dados foram demonstrados em média e erro padrão da média. Todos os dados passaram pelo Teste de Normalidade de Kolmogorov-Smirnov. As medidas outliers foram desprezadas e para os dados que se enquadraram na curva de normalidade foi utilizado o teste estatístico ANOVA One-Way (medidas repetidas) para comparação entre os tempos experimentais dentro de grupos diferentes, realizado no software GraphPad Prism. 5.0. O nível de significância pré-estabelecido foi  $p < 0,05$ .

## Resultados

Na análise de 24 horas dos grupos 2 e 3 de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, não foi observado crescimento bacteriano, porém na análise das 48 horas, houve crescimento bacteriano nas extremidades das placas, sem a formação de halos de inibição. Dessa forma, todos os grupos dessas bactérias foram excluídos da análise estatística.

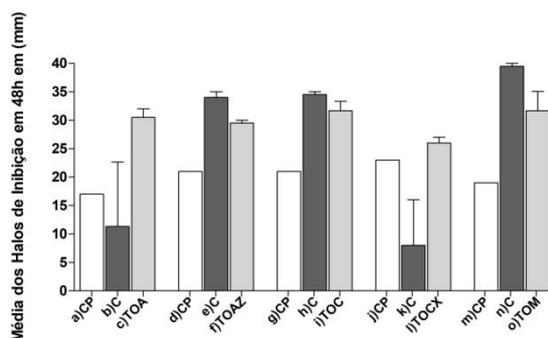
Na análise dos grupos cultivados com *Pseudomonas aeruginosa* observou-se crescimento bacteriano, possibilitando a medição dos halos de inibição nos grupos 1 e 3 e, portanto, foram submetidos a análise estatística. A partir de então os grupos tiveram suas denominações modificadas, ficando da seguinte forma: grupo 1 - antibiótico, passou a ser chamado de controle; grupo 2 – óleo essencial foi excluído da análise, grupo 3 - antibiótico + óleo passou a ser chamado de tratamento. Para o controle positivo foi considerado os diâmetros mínimos de halo de inibição, determinados pelo fabricante dos discos de antibióticos.

A figura 1 demonstra a análise estatística de 24 horas, onde o grupo tratamento foi capaz de ultrapassar a sensibilidade do grupo controle positivo comprovado pelo aumento do diâmetro dos halos de inibição, porém sem significância estatística ( $p > 0,05$ ). Os antibióticos pertencentes a esta análise foram: Amicacina, Aztreonam, Ceftazidima, Ceftriaxona e Meropenem.



Após 48 horas foi procedida uma nova medição, onde o grupo 3 – tratamento apresentou maior medida de halo de inibição quando comparado ao grupo 1 – controle, para os antibióticos

Amicacina e Ceftriaxona, novamente sem relevância estatística na comparação entre grupos, devido ao valor do desvio padrão ( $p > 0,05$ ).



## Discussão

O fato de ter havido crescimento bacteriano de *Pseudomonas* no interior dos halos do grupo controle na análise de 48 horas, pode ser justificado pela característica impermeável das membranas das bactérias gram negativas (CATÃO; DANTAS; FERREIRA, 2014 e ZAGO et al. 2009) e pela bomba de efluxo presente no mecanismo de resistência (LUCENA et al 2014). Por outro lado, a metodologia utilizada no preparo da *Pseudomonas aeruginosa* pode ter influenciado no crescimento excessivo da bactéria nas placas de Ágar Muller Hinton, inviabilizando a diferença estatística.

Ainda sobre a análise da *Pseudomonas aeruginosa* de 48 horas verificou-se que no grupo tratamento a Ceftriaxona e a Amicacina, sendo esta última da classe dos aminoglicosídeos, apresentaram dados que chamaram atenção devido ao importante aumento dos seus halos, concordando com o relatado por Lucena et al. em 2014, que descreveu o aminoglicosídeo associado ao óleo, como capaz de modificar a atividade do antibiótico, auxiliando na diminuição da concentração inibitória mínima frente a *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e a *Pseudomonas aeruginosa*.

A *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* tiveram metodologia diferente da *Pseudomonas aeruginosa* e durante a análise das placas do grupo antibiótico + óleo e do grupo óleo essencial, não houve crescimento bacteriano e portanto, não houve halo que pudesse ser medido sendo desconsiderados da análise. Porém, no grupo antibiótico, foi possível essa medição, levantando a dúvida sobre uma inibição em massa, mas que não pôde ser quantificada. Pesquisas realizadas por outros autores afirmam a ação antimicrobiana do óleo essencial, como por exemplo, Silva et al. em 2014, que relata que o óleo apresentou atividade antimicrobiana

quando testada para *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e a levedura *Candida albicans*.

Coincidindo com a presente pesquisa, Zago et al em 2009, demonstrou que o óleo essencial do *Cymbopogon citratus* potencializou a ação de antibióticos, através do estudo de várias plantas medicinais associadas a antibióticos, registrando sinergismo do *Cymbopogon citratus* com oito tipos de antibióticos para *Staphylococcus aureus*, e em seguida a hortelã com sete e o gengibre com cinco drogas. Já a *Escherichia coli*, o óleo de capim cidreira e alecrim apresentaram sinergismo com cinco fármacos, sendo o cloranfenicol com maior sinergismo ao ser associado ao óleo de capim cidreira.

Em outra pesquisa realizada por Alves et al. em 2012, quando testado o óleo, percebeu-se inibição de bactérias resistentes e também eficácia contra fungos e outros tipos de bactérias, destacando que o mirceno potencializou o efeito do citral frente a *Staphylococcus aureus*.

## **Conclusão**

Esta pesquisa verificou o sinergismo do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* com antibióticos, sobre o crescimento de cepas de bactérias gram negativa e gram positiva, porém sem significância estatística.

Na *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* não foi possível realizar contra testes para confirmar a inibição bacteriana, todavia, podemos afirmar que houve crescimento bacteriano visível apenas nas extremidades das placas no período de 48 horas, sugerindo inibição maciça do crescimento bacteriano.

Para a *Pseudomonas aeruginosa* conclui-se que o óleo associado a Amicacina e a Ceftriaxona apresentaram diâmetro de halo de sensibilidade superior ao recomendado pelo fabricante do disco de antibióticos e pela ação dessas drogas isoladas, porém sem significância estatística, quando comparado a ação isolada dos fármacos.

Mediante aos resultados apresentados sugere-se novas pesquisas com enfoque no óleo essencial buscando outras metodologias a fim de obterem resultados mais claros e conclusivos.

## **Agradecimentos/ Colaboradores**

Agradecemos a Orientadora Maria Silvia Bergo Guerra por aceitar o convite de orientar no nosso TCC, pelo apoio e incentivo durante toda pesquisa, ao Centro Universitário Amparense pelos materiais e recursos disponibilizados, ao Prof. Dr. Luis Romano pelas

orientações nas aulas práticas de biomedicina no Laboratório de Microbiologia e ao Prof. Ms. Rogério Marchete pela realização da análise estatística e elaboração das figuras.

### Referências

SANTOS, A. et al. Determinação do rendimento e atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf em função de sazonalidade e consorciamento. **Revista Brasileira de Farmacognosia**; vol. 19 n. 2ª, p. 436-441, 2009. Disponível em: < <http://www.scielo.br/pdf/rbfar/v19n2a/a17v192a.pdf> >. Acesso em: 08 de set. 2016.

SILVIA, F.L. et al. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Cymbopogon citratus*. **Arq. Ciênc. Vet. Zool. UNIPAR**: vol. 17, n. 03, p. 181-184, 2014. Disponível em < <http://revistas.unipar.br/index.php/veterinaria/article/view/4942/2881> >. Acesso em: 09 de abr. 2018.

INGRAHAM, J.L. INGRAHAM, C.A.; tradução de All Tasks. Introdução à microbiologia. In: **Células procariontes e eucariontes: estrutura e função**. CENGAGE Learning, 2010, p. 81.\_\_\_\_\_. In: **Metabolismo dos micro-organismos**. p. 111.

HARVEY, R.A. CHAMPE, P.C. FISHER, B.D.; tradução de Augusto Scharnk; Marilene Henning Vainstein. Microbiologia Ilustrada. In: *Estafilococos*. Porto Alegre: Artmed, 2007. P. 69-73, 77.\_\_\_\_\_. In: **Bacilos Gram- Negativos Gastrintestinais**. p. 111, 115.\_\_\_\_\_. In: **Outros Bacilos Gram- Negativos**, p. 137-139.

ALMEIDA, M.S. et al. *Staphylococcus Aureus*. **Mostra Científica em Biomedicina**; vol. 1, n. 01, 2016. Disponível em < <http://publicacoesacademicas.fcrs.edu.br/index.php/mostrabiomedicina/article/view/842> > Acesso em: 17 de ago de 2018

BAPTISTA, A.B. As Bactérias Multirresistentes Hospitalares e as Plantas Medicinais. **Revista Desafios**; vol. 4, n. 4, 2017. Disponível em < <https://sistemas.uft.edu.br/periodicos/index.php/desafios/article/view/5030/12706> > Acesso em: 23 de ago de 2018.

CANAES, Taissa de Souza. Capim-limão (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf) na alimentação de cabras saanen nos parâmetros hematológicos, bioquímicos, produção, composição e aceitação do leite. 2011. 198f. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Universidade Estadual Paulista “Júlio De Mesquita Filho” Faculdade De Ciências Agrárias e Veterinárias Campus de Jaboticabal, São Paulo.

FONSECA, Francisco Noé da; RECK, Regina Tatiana; SILVA, Letícia de Pinho da. Desenvolvimento de formas farmacêuticas semissólidas a partir de capim-limão (*Cymbopogon citratus*). **Saúde & Meio Ambiente**. v. 5, n. 2, p. 82-92, jul./dez. 2016. Disponível em: < <http://www.periodicos.unc.br/index.php/sma/article/view/1069> > Acesso em 23 de ago de 2018.

OLIVEIRA RAG, et al. Estudo da interferência de óleos essenciais sobre a atividade de alguns antibióticos usados na clínica. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 16(1): 77-82, Jan./Mar. 2006

LUCENA, B.F.F. et al. Avaliação da atividade antibacteriana e moduladora de aminoglicosídeos do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf. **Acta biol. Colomb.** Vol. 20, n. 01, p.39-45, 2015. Disponível em < [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0120548X2015000100005&lng=es&nrm=iso&tlng=pt](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120548X2015000100005&lng=es&nrm=iso&tlng=pt) >. Acesso em: 25 de agos. 2016.

ZAGO, J.A.A. et al. Sigergismo entre óleos essenciais e drogas antimicrobianas sobre linhagens de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* isoladas de casos clínicos humanos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**: vol.19, n. 04, p. 828- 833, 2009. Disponível em < <http://www.scielo.br/pdf/rbfar/v19n4/05.pdf> >. Acesso em: 08 de set. 2016.

NEVES,P.R. et al. *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente: um problema endêmico no Brasil. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**; Vol. 47,n. 4, pag. 409-420, 2011. Disponível em< <http://www.producao.usp.br/handle/BDPI/5876> > Acesso em 19 de ago de 2018.

FERREIRA, S.B., DANTAS, I.C., CATÃO, R.M.R. Avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial de sucupira (*Pterodon emarginatus* Vogel). *Rev. Bras. PI. Med.*; vol. 16, n. 2, pag. 225-230, 2014. Disponível em < [http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1516-05722014000200009&script=sci\\_abstract&tlng=es](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1516-05722014000200009&script=sci_abstract&tlng=es) > Acesso em 04 de Nov. 2018.