

Sensibilidade de cepas *Staphylococcus aureus* resistentes a beta-lactâmicos ao óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf

SAMUEL FERREIRA GONÇALVES¹, YHAGO PATRYCKY ANTUNES SOUZA ASSIS², CINTYA NEVES DE SOUZA³, KEICY SANDY SILVESTRE DE SOUZA⁴, PAULA KAROLINE SOARES FARIAS⁵, LIVIA MARA VITORINO DA SILVA⁶, ALCINEI MISTICO AZEVEDO⁷, ALESSANDRA REJANE ERICSSON DE OLIVEIRA XAVIER⁸

1 - UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

2 - UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

3 - UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

4 - UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

5 - UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

6 - UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

7 - UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

8 - UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MONTES CLAROS

RESUMO - A pecuária leiteira atualmente é um dos setores que apresentam crescimento contínuo gerando alta rentabilidade ao país, porém hoje a mesma se encontra com dificuldades, uma vez que doenças podem acometer o rebanho tais como a mastite. A mastite se caracteriza pela inflamação da glândula mamária trazendo consigo a queda da produção do animal, além de a aplicação sucessiva de antibióticos podem ser um dos fatores a causar multiresistência e não conseguindo sanar a doença. Atualmente estuda-se a utilização de óleos essenciais, como o *Cymbopogon citratus*, sendo isto como solução alternativa para o combate de microrganismos multirresistentes, utilizou-se quatorze cepas de *Staphylococcus aureus* frente ao teste de disco-difusão com concentrações diferentes do óleo, sendo estas concentrações 0µl, 30µl, 60µl, 120µl e 240 µl. *Staphylococcus aureus* resistentes a beta-lactâmicos foram sensíveis aos óleo essencial de *Cymbopogon citratus* a partir da concentração de 30µl/ml. Observou-se que o óleo em estudo apresentou variação na capacidade de inibição de crescimento de cepas *Staphylococcus aureus* agri em diferentes municípios, fazendas, grupos genéticos e perfis genotípicos. ^

Palavras-chave: Capim-limão, Multiresistência, Beta-lactâmicos

Sensitivity of *Staphylococcus aureus* strains resistant to beta-lactams to the essential oil of *Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf

ABSTRACT - In present days, dairy farming is one of the sectors that shows continuous growth generating high profitability to the country, but it has difficulties, since the herd can be affected by diseases such as mastitis. Mastitis is characterized by the inflammation of the mammary gland causing the fall of animal's production, and the successive application of antibiotics can be an important reason for multiresistance's increase and most of times it can't cure the disease. Studies have started to find alternative solutions for the control of multiresistant microorganisms and the use of essential oils have obtained recognition, highlighting *Cymbopogon citratus*. Fourteen *Staphylococcus aureus* strains were used in the disc diffusion test with different concentrations of the oil - 0µl, 30µl, 60µl, 120µl and 240µl. *Staphylococcus aureus* resistant to beta-lactams were sensitive to the essential oils of *Cymbopogon citratus* from the concentration of 30 µl / ml. It was observed that the oil in the study presented variation in the capacity of inhibition of growth of strains *Staphylococcus aureus* grouped in different municipalities, farms, genetic groups and genotypic profiles.

Keywords: Lemon grass, Multiresistance, Beta-lactams

Introdução

A bovinocultura de leite é um dos setores mais produtivos no ramo agroindustrial do Brasil, colocando o país em destaque como produtor de leite, o setor a cada ano vem crescendo com continua expansão. O país hoje conta com a região sul do país como a maior produtora no geral representando cerca de 34,7% do total da produção no ano de 2014, porém o maior estado produtor de leite é representado por Minas Gerais com a produção total de 9,4 bilhões de litros de leite (IBGE, 2014). Atualmente a pecuária leiteira enfrenta sérios problemas relacionados a doenças, causado pela mastite. A etiologia da doença ocorre em diversas formas sendo a sua contração por infecção, traumática, alérgica, metabólica ou tóxica, sendo causadas principalmente por bactérias ou fungos. Os prejuízos desta doença caracterizam em perda de produção chegando a 70% da redução total dos quartos mamários e 8% da perda do leite total por alterações nos padrões físico-químicos do leite e resíduos com tratamentos para sanar o problema (PERES NETO, ZAPPA, 2011). Em razão da maioria das mastites serem causadas por bactérias, o uso indiscriminado de antibióticos por um longo período tem causado inúmeros problemas para o produtor, sendo uma das maiores dificuldades para controle a resistência bacteriana. Atualmente estuda-se a utilização de óleos essenciais como alternativas viáveis para o controle eficaz da doença, visto que é um método com menor agressividade e risco para o combate desses microrganismos, óleos essenciais tais como o *Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf, conhecido popularmente como capim limão, são estudados uma vez que propriedades efetivas frente a microrganismos. Objetivou-se neste estudo verificar a sensibilidade de cepas de *Staphylococcus aureus* multirresistentes a beta-lactâmicos frente à utilização do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf.

Revisão Bibliográfica



As bactérias do gênero *Staphylococcus* são relacionadas pelas suas associações com doenças, uma das cepas de *Staphylococcus*, o *Staphylococcus aureus* é um dos maiores responsáveis pelas adversas patologias que acometem os animais. De 30 a 50 % das cepas de *S. aureus* e mais de 50% das bactérias do gênero *Staphylococcus* são resistentes a antimicrobianos adversos utilizados em tratamentos as patologias acometidas (Miyamoto, 2010). A resistência dos *Staphylococcus* spp. a diversos fármacos do grupo dos beta-lactâmicos se dá principalmente pelo gene *mecA* que codifica uma proteína de baixa afinidade a estes fármacos sendo ela a PBP2a (SOARES *et al.*, 2008). Na produção leiteira, a mastite é uma das causadoras principais de perdas econômicas, o *S. aureus* é um dos importantes agentes infecciosos, pois é produtor de enterotoxinas termotolerantes que inflamam as glândulas mamárias e contamina o leite que se consumido causa danos para saúde pública como intoxicação alimentar e alergia (FACIOLI, 2010). Alguns aditivos alternativos aos antimicrobianos têm se mostrado favoráveis ao desenvolvimento animal, sendo benéficos a utilizações em tratamentos para patologias (Azevedo *et al.*, 2017), muitos desses aditivos são os óleos essenciais, onde são encontrados em diversas partes das plantas, eles são originários do metabolismo secundário das mesmas sendo eles, ácidos, ésteres, compostos fenólicos, álcoois, terpenos e apresentam como característica principal alta diversidade química, volatibilidade e insolubilidade, sendo considerados substâncias ativas, e muitos estudos comprovam seus efeitos contra microrganismos pois possuem resultados comprovatórios como melhoradores de desempenho (PERAZZO, 2012; SOUZA *et al.* 2015). Quanto a composição dos óleos, elas possuem bastante diferença, pois podem variar de acordo com o clima, região, época de colheita dentre outros fatores (LEIMANN, 2001). O *Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf é popularmente conhecido por capim-limão e possui como componente principal o citral que é um aldeído alifático composto pela mistura dos isômeros neral e geranial, o citral e confere ao óleo o aroma de limão, além do citral, o óleo de capim-limão possui outros componentes em menores quantidades sendo o mirceno, linalol, geraniol, limoneno (AZEVEDO, 2017), a planta é pertencente à família Poaceae e tem origem indiana sendo bastante difundida no Brasil, aonde desde culturas antigas vem sendo utilizada contra a gripe e diarreias, e como calmantes, analgésico e diurético.

Materiais e Métodos

O óleo de *Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf, popularmente conhecido como Capim limão foi obtido através da colheita de plantas do horto medicinal do Instituto de Ciências Agrárias da UFMG, a técnica de extração para a obtenção do óleo por arraste a vapor a destilador piloto, (Linax®, modelo D20) Após a extração foi armazenado em frasco âmbar sob refrigeração (4-8°C). As análises cromatográficas foram realizadas em cromatógrafo a gás, Agilent Technologies (GC 7890A), acoplado a espectrômetro de massas (MS 5975C) dotado de coluna capilar DB-5 MS (Agilent Technologies, fase estacionária 5% fenil e 95% metilpolissiloxano, 30 m x 250 µm d.i. x 0,25 µm espessura do filme) e hélio (99,9999% de pureza) como gás de arraste, (1 mL min⁻¹). A amostra foi injetada (1 µL) no modo split 1:5 com injetor mantido a 220 °C. A rampa de aquecimento da coluna iniciou a 60 °C com taxa de 3 °C min⁻¹ até 240 °C, em seguida, com um gradiente de temperatura de 10°C min⁻¹ até 270 °C mantendo constante por 7 min. A interface com o espectrômetro de massas foi mantida a 240 °C e o mesmo operado por impacto de elétrons (70 eV), no modo full scan, monitorando uma faixa de massa (40 a 550 *m/z*). O índice de retenção de todos os compostos foi calculado a partir do tempo de retenção de uma mistura de *n*-alcanos (C8- C32, Sigma USA) 20 ppm, split 1:100. Os dados gerados foram analisados utilizando o software MSD Chemstation juntamente com a biblioteca *National Institute of Standards and Technology* (NIST, 2002). Foram utilizadas 14 cepas identificadas como *S. aureus* provenientes de tetos de vacas com mastite subclínica provenientes de 12 fazendas em seis municípios da região norte de Minas Gerais. As cepas foram identificadas em etapa anterior por ensaio de PCR com o marcador genético *femA* foi utilizado para confirmação da espécie *S. aureus* e quanto ao perfil genético por RAPD-PCR (Idil & Bilkay, 2014). Estas foram classificadas genotipicamente como resistentes aos beta-lactâmicos penicilina, ampicilina e amoxicilina por teste de difusão em disco. Avaliou-se a sensibilidade das cepas ao óleo essencial de alecrim pimenta nas concentrações de 0µl, 30µl, 60µl, 120µl e 240 de disco-difusão em ágar descrito por CLSI (2015), frente a cepas em estudos padronizada em 0,5 da escala de

MacFarland. Após a incubação em estufa de crescimento a 37°C por um período de 24 horas realizou-se a leitura de cada halo de diâmetro em milímetros (mm). Foram realizadas a análise de variância (ANOVA) e de regressão pelo programa R versão 1.1.2 Para a análise de regressão escolheu-se o modelo linear, baseado na significância dos seus coeficientes.

Resultados e Discussão

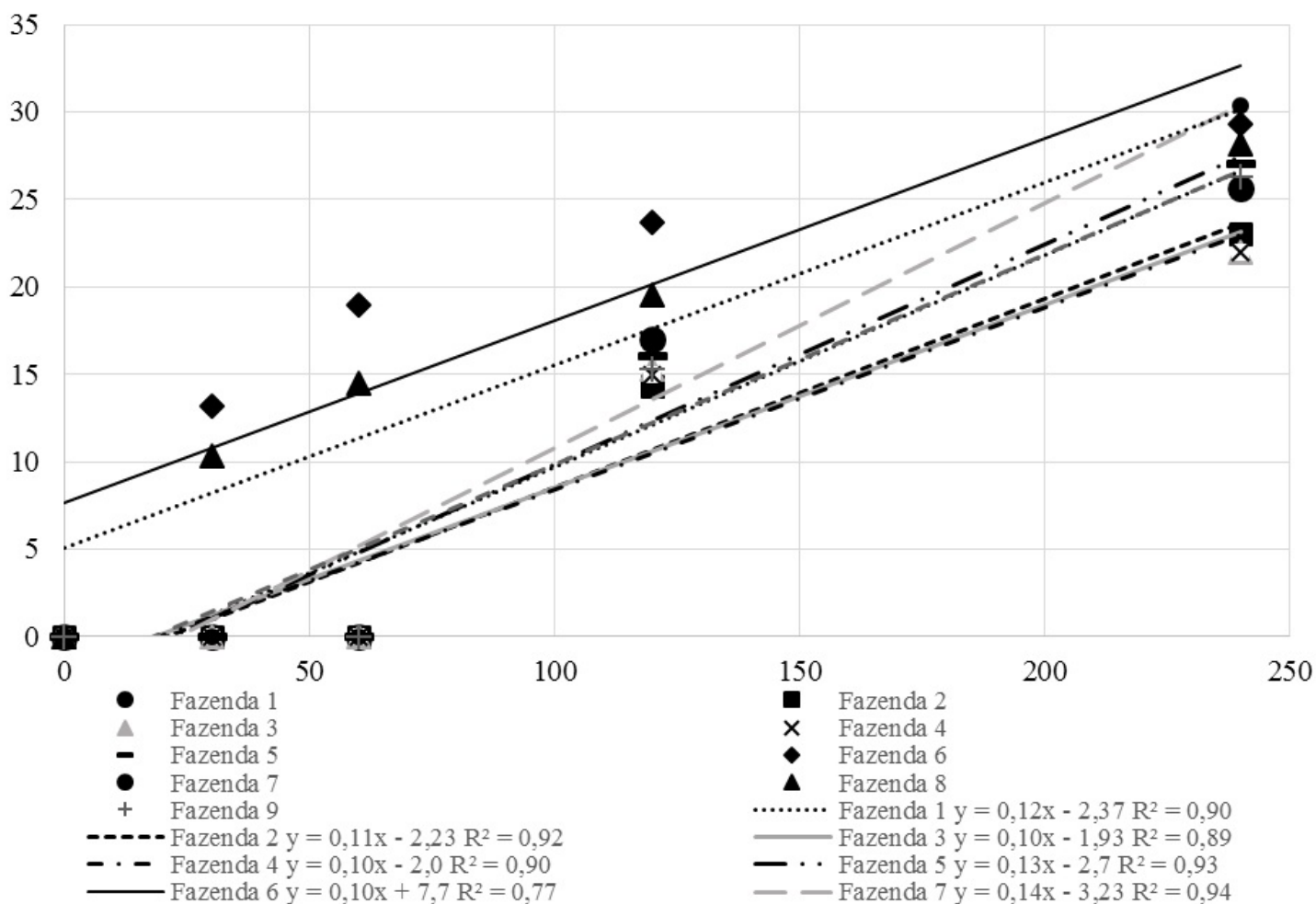
Os compostos majoritários presentes no óleo essencial em estudo foram β -citral (24,62%), β -mirceno (25,372%) e α -citral (31,899%) (Tabela 1), sendo estes compatíveis com descrito na literatura que descreve atividade antimicrobiana do óleo essencial de *C. citratus* (AJAYI, SADIMENKO, AFOLAYAN, 2016; AZEVEDO et al., 2017). A menor dose do óleo de capim limão (30 μ l/ml) se mostrou eficiente para promover formação de halo de inibição de crescimento, sendo os maiores halos observados com a concentração do óleo em 240 μ l/ml, estando estes resultados associados com a atividade antimicrobiana dose-dependentes dos óleos essenciais (Oliveira et al. 2014). Observou-se interação entre as diferentes concentrações dos óleos com tamanho dos halos de inibição entre os municípios, as fazendas, os grupos genéticos e perfis genotípicos. A partir dos resultados obtidos quando avalia-se as diferentes doses do óleo capim limão em relação aos municípios, pode-se inferir que a cada aumento em 01 μ l do óleo de capim limão aumenta-se o diâmetro do halo de inibição dos municípios 1 e 3 em 5,11 mm e 4,32 mm respectivamente (Gráfico 1). Quando a análise foi feita pela interação das doses com as fazendas, verificou-se diferença entre o tamanho dos halos de inibição formados, sendo que a fazenda 6 foi a que apresentou maiores halos de inibição com o aumento das concentrações dos óleos (Gráfico 2) e esta fazenda está localizada no município 3, que também apresentou comportamento semelhante. Na avaliação das respostas de inibição de crescimento com diferentes concentrações, verifica-se que para o grupo genético *S.aureus* II a cada 01 μ l do óleo de capim limão aumenta 8,45 mm o diâmetro do halo de inibição (Gráfico 3) e este grupo esteve presente na fazenda (Gráfico 2) e município (Gráfico 1) que apresentaram maior halo de inibição. O perfis genotípicos V, K e D apresentaram-se maiores halos de inibição em resposta à concentrações do óleo (Gráfico 4), comparando com os demais perfis. As cepas de *Staphylococcus aureus* classificadas em grupos e perfis genotípicos diferentes utilizadas neste trabalho apresentam multirresistência frente aos antimicrobianos do grupo beta-lactâmicos e também diferentes padrões de sensibilidade ao óleo essencial de capim limão. No entanto, ainda são necessárias pesquisas que avaliem a sensibilidade de cepas aos óleos baseando-se em capacidade de formar halos de inibição maiores ou menores. A resistência de bactérias à ação dos óleos essenciais ainda é objeto de estudo, e neste trabalho ficou evidente que grupos genéticos e perfis genotípicos diferentes de *S. aureus* apresentaram sensibilidade à ação do óleo em níveis diferentes. Pesquisas que estudam o mecanismo de ação dos óleos sobre as paredes de bactérias, bem como a atividade isolada ou em conjunto de diferentes componentes químicos dos óleos são relatadas em revisões de trabalhos descritas em importantes veículos de divulgação científica (SEOW et al., 2015, BASSOLÉ). No entanto, na literatura consultada, não foram encontrados trabalhos que descrevessem mecanismos que explicassem a diferença de sensibilidade para cepas de um mesmo microrganismo frente a um mesmo óleo, como também não foram encontrados trabalhos que indicassem alguma relação entre a resistência de bactérias aos antimicrobianos e aos óleos essenciais.

Conclusões

As cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a beta-lactâmicos foram sensíveis aos óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf a partir da concentração de 30 μ l/ml. Observou-se que o óleo em estudo apresentou variação capacidade de inibição de crescimento de cepas *Staphylococcus aureus* agrupadas em diferentes municípios, f grupos genéticos e perfis genotípicos.

Gráficos e Tabelas

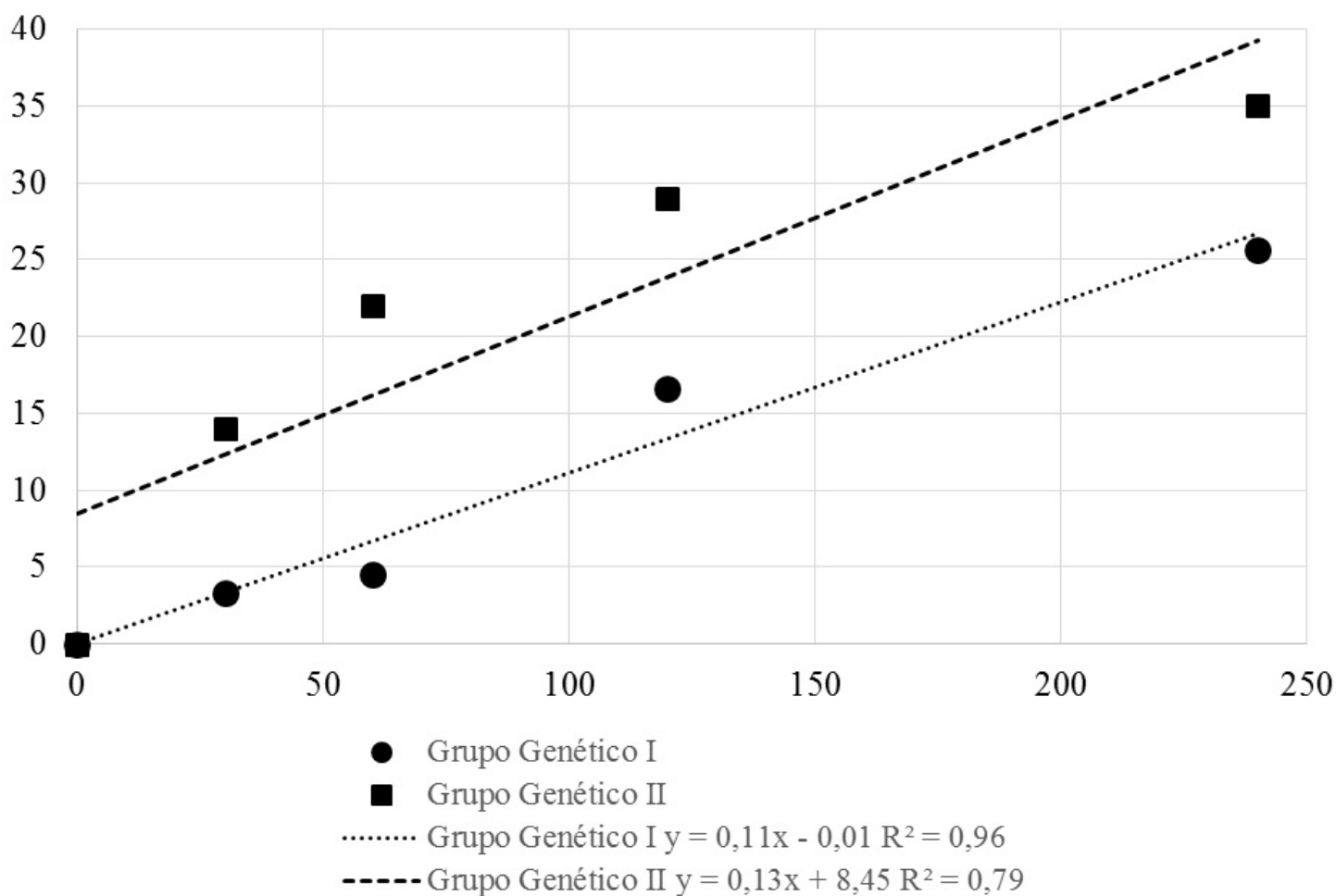
Gráfico 2: Tamanho do halo de inibição de acordo com a interação das doses 0, 30, 60, 120 e 240 µl do óleo de capim limão em relação as Fazendas



(<http://abz.org.br/wp-content/uploads/2017/04/Gráfico-2-Capim-Limão.jpg>)



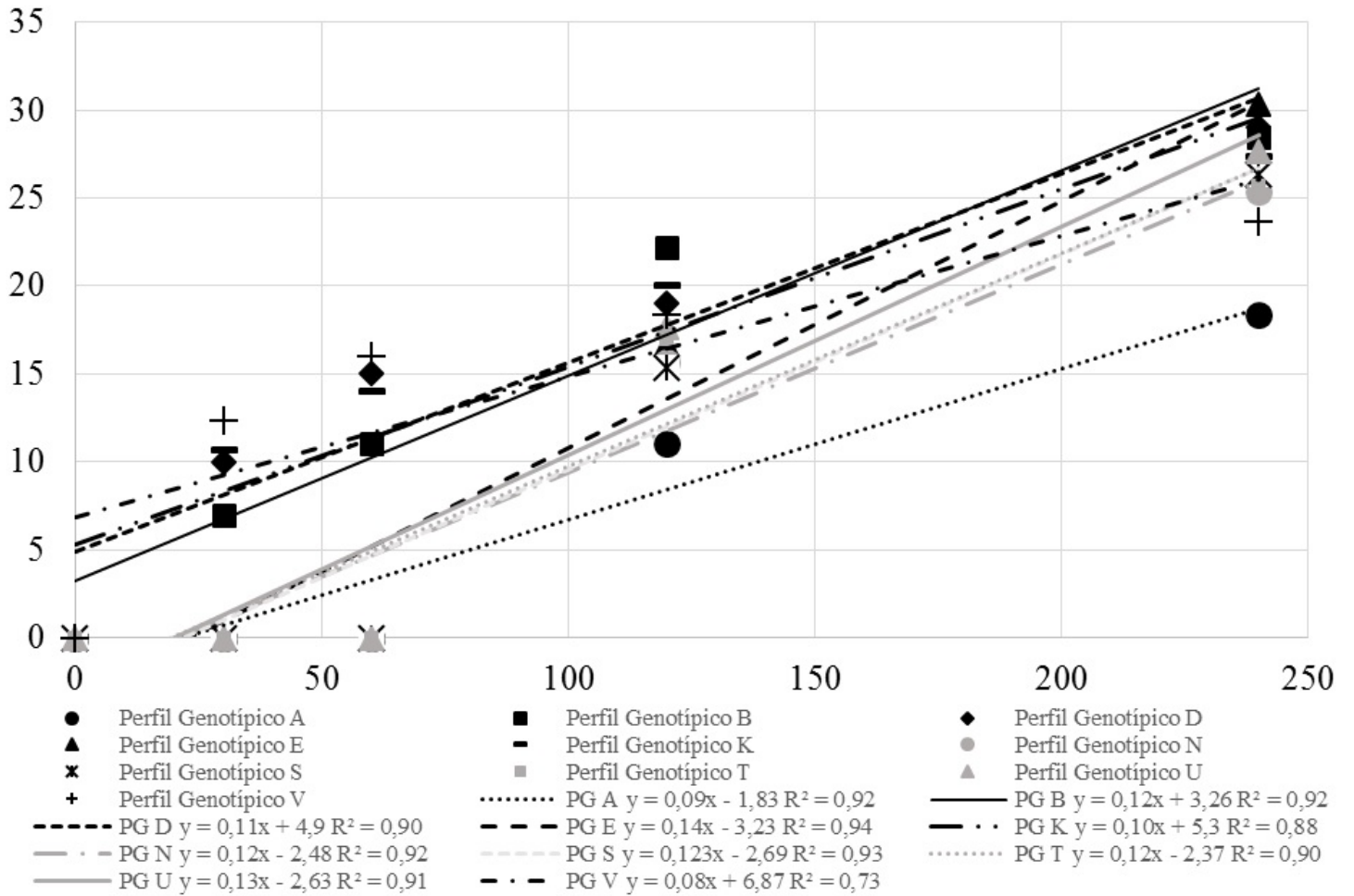
Gráfico 3: Tamanho do halo de inibição de acordo com a interação das doses 0, 30, 60, 120 e 240 µl do óleo de capim limão em relação aos Grupos Genéticos



(<http://abz.org.br/wp-content/uploads/2017/04/Gráfico-3-Capim-Limão.jpg>)



Gráfico 4: Tamanho do halo de inibição de acordo com a interação das doses 0, 30, 60, 120 e 240 µl do óleo de capim limão em relação aos Perfis Genotípicos



(<http://abz.org.br/wp-content/uploads/2017/04/Gráfico-4-Capim-Limão.jpg>)



Tabela 1. Lista dos compostos obtidos a partir da análise cromatográfica dos óleos essenciais de *Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf.

Nº	Composto	T.R.	(%, área)
1	6-metil-5-hepteno-2-ona	6,978	0,693
2	β -mirreno	7,178	25,372
3	β -trans-ocimeno	8,667	0,903
4	β -ocimeno	9,042	0,552
5	β -linalol	11,038	1,076
6	β -citral	12,775	1,526
7	Isômero do verbenol	13,529	3,898
8	Carane, 4,5- epóxi-, trans	14,328	6,002
9	β -citral	16,849	24,62
10	trans-geraniol	17,302	1,268
11	α -citral	18,175	31,899
12	2-undecanona	19,121	0,513
13	Cariofileno	24,355	0,512
14	β -bisaboleno	28,045	1,165
Monoterpenos Hidrocarbonetos			26,28
Monoterpenos Oxigenados			60,94
Sesquiterpenos Hidrocarbonetos			1,68
Outros			11,10
Total			100

(<http://abz.org.br/wp->

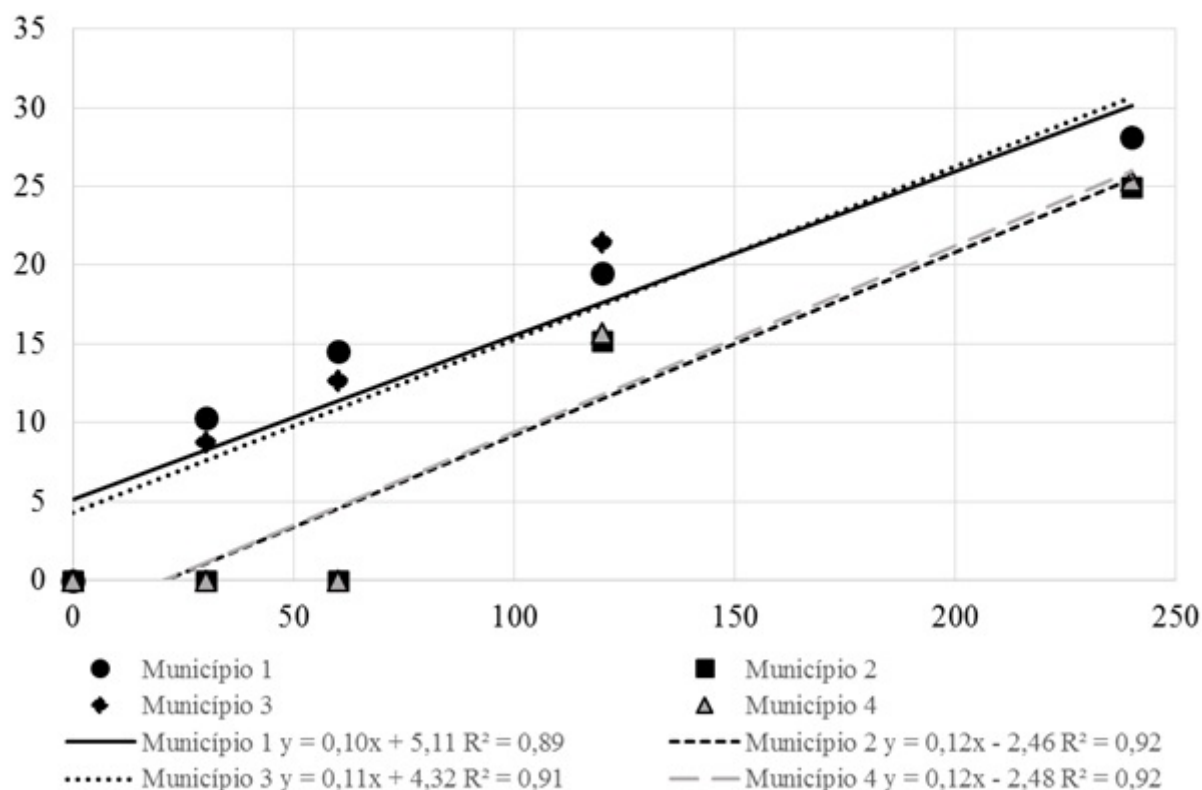
(1) Tempo de Retenção.

content/uploads/2017/04/Tabela-1-cp.jpg)



Gráfico 01: Tamanho do halo de inibição de acordo com a interação das doses 0,

30, 60, 120 e 240 µl do óleo de capim limão em relação aos municípios



(<http://abz.org.br/wp-content/uploads/2017/04/GRAFICO-1-CAPIM-L..jpg>)

Referências

ADAMS R.P. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectroscopy. 4th ed. Allure, Allured Publishing Corp., USA. 2012. AZEVEDO, I. L. et al. Use of *Lippia rotundifolia* and *Cymbopogon flexuosus* essential oils, individually or in combination, in broiler diets. *R. Bras. Zootec.* vol.46, n.1, pp.13-19, 2017. BALAKRISHNAN, B. et al. Evaluation of the lemongrass plant (*Cymbopogon citratus*) extracted in different solvents for antioxidant and antibacterial activity against human pathogens. *Asian Pac J of Trop Dis* 4:134-139. (2014) BASSOLÈ, I. H.N., JULIANI, R. H. Essential Oils in Combination and Their Antimicrobial Properties. *Molecules* 2012, 17, 3989-4006; doi:10.3390/molecules17043989 CLSL. Clinical Laboratory Standar Institute. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; Approved standard – Anos 90, n M07- A9. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2015. E.O. AJAYI A, A.P. SADIMENKO A, A.J. AFOLAYAN B, GC-MS evaluation of *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf oil obtained using modified hydrodistillation and microwave extraction methods **Food Chemistry** 209 (2016) 262–266 FACCIOLI, P. Y. Detecção molecular de *staphylococcus aureus* e de suas toxinas no leite de tanque de rebanhos bovinos, em condições de refrigeração e sob temperatura ambiente. 2010. 134 p-Tese (Doutorado em Medicina Veterinária). Universidade estadual paulista. Faculdade de medicina veterinária e zootecnia. Botucatu. 2010. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE. Disponível em <
<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/producaoagropecuaria/>> Acesso em 30 Mar
LEIMANN, F, V. Microencapsulação do óleo essencial de capim limão utilizado no processo de coacervação. 200? Dissertação (Mestrado em Engenharia Química)- Centro Tecnológico, Universidade Federal de Santa Catarina,

Florianópolis. 2001. OLIVEIRA M.L.M., BEZERRA B.M.O., LEITE L.O., GIRÃO V.C.C. & NUNES-PINHEIRO D.C.S. 2014. Topical continuous use of *Lippia sidoides* Cham. essential oil induces cutaneous inflammatory response, but does not delay wound healing process. *J. Ethn.* 153(1):283-289. PERAZZO, M, F; COSTA NETA, M, C; CAVALCANTI, Y, W; XAVIER, A, F, C; CAVALCANTI, A, L. Efeito antimicrobiano do óleo essencial do *Cymbopogon citratus* sobre bactérias formados do biofilme dentário. *Revista brasileira de ciências da saúde.*, v.16, n.4, p.553-558, 2012. PERES NETO, F.; ZAPPA, V.; Mastite em vacas leiteiras. *Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária*, ISSN:1679-7353. Ano IX, número 16, janeiro de 2011. SEOW YX, et al. Plant essential oils as active antimicrobial agents. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2014;54(5):625-44. doi: 10.1080/10408398.2011.599504. SOARES, L. C. et al.,. Caracterização fenotípica da resistência a antimicrobianos e detecção do gene *meca* em *Staphylococcus* spp. Coagulase-negativos isolados de amostras animais e humanas. *Ciência Rural*, v.38, n.5, ago, 2008. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.38, n.5, p.1346-1350, ago, 2008. SOUZA, D, S; ALMEIDA, A, C; ANDRADE, N, A; MARCELO, N, A; AZEVEDO, I, L; MARTINS, E, R; FIGUEIREDO, L, S, Atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Lippia origanoides* e *Lippia rotundifolia* frente a bactérias isoladas de aves. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, Belo Horizonte, v. 67, n. 3, p. 940-944, 2015.

Associação Brasileira de Zootecnistas

SEPS 709/909, Bloco D - sala 113

Brasília/DF

CEP 70390-089



(<http://fb.com/abzootecnistas>)



(<http://twitter.com/abzootecnistas>)



(<https://www.linkedin.com/company/associa%C3%A7%C3%A3o-brasileira-de-zootecnistas-abz->)



(<https://instagram.com/abzootecnistas/>)

✉ Fale Conosco (<http://abz.org.br/contato/>)

abz@abz.org.br

