

Sensibilidade de *Staphylococcus sp.* oxacilina resistentes ao óleo essencial de capim-limão (*Cymbopogonflexuosus (steud) watts*)

Sensitivity of *Staphylococcus sp.* Oxacillin resistant to lemongrass essential oil (*Cymbopogonflexuosus (steud) watts*)

Sensibilidade de *Staphylococcus sp.* Oxacilina resistentes al aceite esencial de capim-limão (*Cymbopogonflexuosus (steud) watts*)

Pedro Henrique de Almeida Souto Santos¹, Gabriel Santos Persiquini Cunha², Stephanie Pedrosa Oliveira², Livia Mara Vitorino Silva², Cintya Neves de Souza², Marcela de Oliveira Nogueira², João Matheus de Almeida Silva³, Raphael Rodrigues Porto⁴, Anna Christina de Almeida²

RESUMO

Objetivo: Avaliar a sensibilidade de cepas de *Staphylococcus sp.* oxacilina resistentes ao óleo essencial de capim-limão (*Cymbopogonflexuosus (Steud) Wats*), microencapsulado. **Material e Métodos:** Cepas de *Staphylococcus sp.*, de origem animal e identificadas como resistentes à oxacilina foram analisadas quanto à sensibilidade ao óleo essencial de capim-limão microencapsulado. As análises foram realizadas utilizando-se metodologia de macrodiluição em tubos e definiu-se a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM). Os testes foram realizados em triplicatas e os resultados foram analisados por meio da análise de regressão, pelo modelo Probit, utilizando o programa estatístico R. **Resultados e Discussão:** O óleo essencial de capim-limão no teste CIM, frente aos microrganismos em estudo, apresentou 100% de eficácia na concentração de 160µL/mL e 80% na concentração de 80µL/mL. Observou-se a CBM em 25% das cepas na concentração de 160µL/mL. Observou-se que para o capim-limão no CIM e CBM, houve confiabilidade de 98% e 99% pela equação do modelo estatístico, respectivamente. **Conclusão:** O óleo de *Cymbopogonflexuosus (Steud) Wats* microencapsulado apresentou atividade inibitória e bactericida frente a *Staphylococcus sp.* oxacilina resistente.

Descritores: Concentração Inibitória Mínima; Capim-limão; Fitoterapia.

ABSTRACT

Objective: To evaluate the sensitivity of *Staphylococcus sp.* oxacillin strains resistant to the essential oil of microencapsulated lemon grass (*Cymbopogonflexuosus (Steud) Wats*). **Material and Methods:** Strains of *Staphylococcus sp.*, of animal origin and identified as resistant to oxacillin were analyzed for sensitivity to the essential oil of microencapsulated lemon grass. The analyzes were performed using a macrodilution method in tubes and the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) were defined. The tests were performed in triplicates and the results were analyzed by regression analysis, by the Model Probit, using the statistical program R. **Results and Discussion:** Lemon grass essential oil in the MIC test, reacting with the microorganisms in study, showed 100% efficacy at the concentration of 160µL / mL and 80% at the concentration of 80µL / mL. The CBM was observed in 25% of the strains at the concentration of 160 µL / mL. It was observed that for lemongrass in the CIM and CBM, there was 98% and 99% reliability by the equation of the statistical model, respectively. **Conclusion:** Microencapsulated *Cymbopogonflexuosus (Steud) Wats* oil showed inhibitory and bactericidal activity against resistant *Staphylococcus sp.*

Keywords: Minimum Inhibitory Concentration; Lemon grass; Phytotherapy

¹ Acadêmico de Medicina do ICS Faculdades Unidas do Norte de Minas-FUNORTE.

² Universidade Federal de Minas Gerais- Campus Montes Claros.

³ Acadêmico de Medicina do Centro Universitário UNIPAM.

⁴ Especialista em Políticas e Gestão da Saúde da Secretaria Estadual de Saúde Minas Gerais.

RESÚMEN

Objetivo: Tenía hasta evaluarla sensibilidad de aceite esencial resistentes a oxacilina cepas de *Staphylococcus* microencapsulado de hierba de limón (*Cymbopogon flexuosus* (Steud) Wats). **Material y métodos.** *Staphylococcus* sp, animales y identificados como oxacilina resistentes se seleccionaron para la sensibilidad a aceite esencial de hierba de limón microencapsulado. Los análisis se realizaron utilizando métodos de dilución y tubos para definir la concentración mínima inhibitoria (MIC) y bactericida mínima (MBC). El ensayo se realizó por triplicado y los resultados se analizaron mediante análisis de regresión, por modelo Probit, utilizando los estadísticos programa R. **Resultados y Discusión:** el aceite esencial de hierba de limón en el ensayo de MIC contra microorganismos bajo estudio mostró 100% de concentración eficaz en 160 µL / ml y 85% a una concentración de 80 µL / ml. CBM se observó en 30% de las cepas en la concentración de 160 µL / ml. Se observó que para hierba de limón el MIC y MBC, era fiabilidad de 98% y 99% por la ecuación de modelo estadístico, respectivamente. **Conclusión:** El aceite *Cymbopogon flexuosus* (Steud) Wats microencapsulado mostró actividad inhibitoria y bactericida contra oxacilina resistente *Staphylococcus* sp.

Palabras-clave: Concentración Mínima Inhibitoria; hierba de limón; Fitoterapia.

INTRODUÇÃO

O uso de plantas medicinais é uma prática amplamente difundida na medicina tradicional/popular que passou a ser difundida em programas de Saúde Pública no Brasil e no mundo. A Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS (PNPIC) aprovada pelo Ministério da Saúde em 2006, contemplam o estímulo aos estudos e uso da fitoterapia e plantas medicinais, conforme recomendado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) (BRASIL, 2012)

Óleos essenciais são produtos de metabolismo secundário de plantas aromáticas com variadas atividades farmacológicas e entre estes, está o óleo essencial de capim-limão [*Cymbopogon flexuosus* (Steud) Wats], que tem como principal constituinte o citral que conferem o aroma de limão e as propriedades medicinais da planta, incluindo a atividade antimicrobiana (GANJEWALA, 2012) Tecnologias que possibilitem o uso destes óleos em sistemas *in vivo* e em produtos farmacêuticos como a microencapsulação, são objetos de estudo.

A multirresistência de bactérias aos antimicrobianos é um problema de saúde pública e estímulos ao desenvolvimento de produtos novos como os bioativos de plantas que possam substituir ou reduzir o uso das moléculas tradicionais é tema de pesquisas na atualidade.

Altos índices de multirresistência antimicrobiana é descrita em *Staphylococcus* sp, incluindo cepas oxacilina-resistente isoladas de humanos. Estudos abordando epidemiologia molecular identificaram *Staphylococcus* sp. multiresistentes circulando entre diferentes ambientes como hospitais, animais e trabalhadores em fazendas (VANDENDRIESSCHE *et al.*, 2014; CUNY *et al.*, 2017)

Teve-se por objetivo avaliar a sensibilidade de cepas *Staphylococcus* sp. oxacilina resistentes ao óleo essencial de capim-limão microencapsulado.

METODOLOGIA

Óleos essenciais de capim-limão obtido pela técnica de arraste de vapor foi analisado cromatograficamente e microencapsulado pelo método de coacervação com polímeros comestíveis (AZEVEDO *et al.*, 2017)

Foram utilizadas 65 cepas de *Staphylococcus* sp. resistentes à oxacilina (1 µg), isoladas de animais de origens distintas, provenientes do laboratório de Sanidade Animal, CPCA-UFMG. Estas estavam congeladas em glicerol e para uso, estas foram ativadas em caldo BHI por três subcultivos e avaliação de pureza antes de utilização nos testes (ANVISA, 2007)

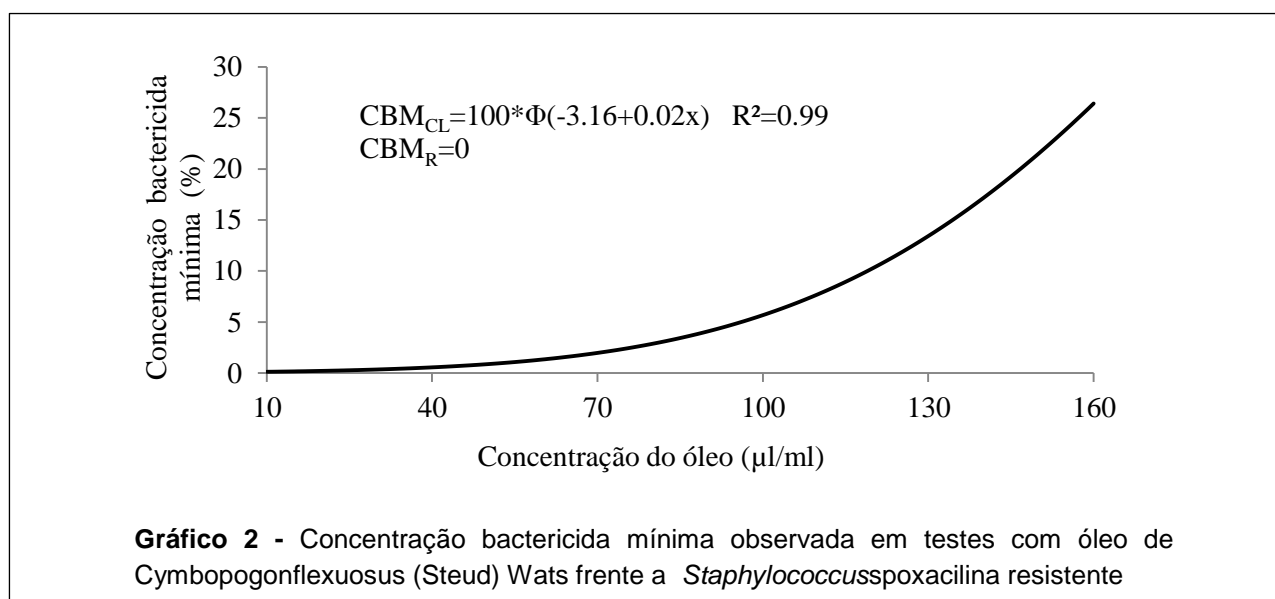
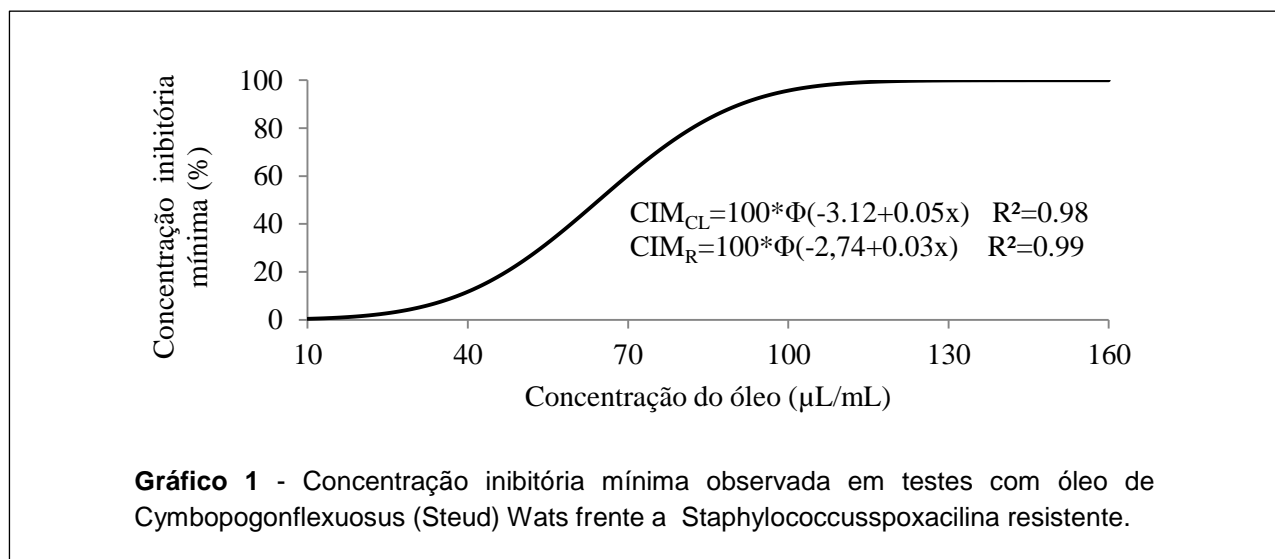
A sensibilidade das cepas em estudo ao óleo essencial de capim-limão foi analisada pela técnica de diluição em tubos, obtendo-se concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida

mínima (CBM) (CLSI, 2015). Utilizaram-se as concentrações 160µL, 80µL, 40µL, 20µL e 10µL, preparadas conforme descrito por Azevedo *et al.*(2016) e suspensão de cada cepa bacteriana em estudo, padronizadas de acordo com a escala de Mac Farland 0,5 (UFC- $1,5 \times 10^8$). A confirmação da ausência de crescimento na CIM foi realizada com adição 100 µL de TTC (Trifeniltetrazolio-2,3,5 Cloreto) aos tubos sem crescimentos visíveis (OLIVEIRA *et al.*, 2016). Tubos em que ausência de crescimento foi confirmada foram repicadas em ágar Mueller Hinton para determinação da CBM.

Os testes foram realizados em triplicatas e os resultados foram analisados por meio da análise de regressão, pelo modelo Probit, utilizando o programa estatístico R.

RESULTADOS

O óleo essencial de capim-limão no teste CIM, frente aos microrganismos em estudo, apresentou 100% de eficácia na concentração de 160µL/mL e 85% na concentração de 80µL/mL (**Gráfico1**). Observou-se aCBM em 30% das cepas que na concentração de 160µL/mL (**Gráfico 2**). Observou-se que para o capim-limão no CIM e CBM, houve confiabilidade de 98% e 99% pela equação do modelo estatístico, respectivamente.



DISCUSSÃO

A atividade antimicrobiana do óleo de capim-limão microencapsulado na concentração inibitória mínima de 160µl/ml em 100% das observações e por não ter sido observado na literatura consultada outros trabalhos utilizando este tipo de óleo microencapsulado e também o efeito sobre cepas oxacilina resistentes, indicam a possibilidade de uso futuro como agente antimicrobiano para tratamento de patologias humanas e animais.

As pesquisas apresentam resultados variados de atividade antimicrobiana do óleo de capim-limão sobre *Staphylococcus sp.* em concentrações variadas e inclusive melhores resultados foram observados frente a Gram positivas quando comparados com bactérias Gram positivas (NAIK *et al.*, 2010; ADUKWU *et al.*, 2012) estando este efeito associado a característica da parede celular das diferentes bactérias, sendo que as Gram positivas permitem melhor difusão dos componentes hidrofóbicos dos óleos essenciais (ADUKWU *et al.*, 2012).

Ao comparar resultados de pesquisas anteriores realizadas com este mesmo óleo, sem microencapsulamento descritos por Azevedo *et al* (2016) a atividade antimicrobiana foi mantida em 160 µl/ml, ainda que os autores tenham utilizado cepas de *Staphylococcus aureus* de outra origem. Estudos avaliando outros óleos essenciais evidenciaram efeitos semelhantes ao óleo sem microencapsulamento (DONSI *et al.*, 2011) ou melhor atividade antimicrobiana dos óleos (KAMIMURA *et al.*, 2014, RAKMAI, 2017) variando entre diferentes óleos essenciais e entre as técnicas utilizadas para microencapsulação.

A atividade deste óleo submetido à tecnologia de microencapsulamento e efeito sobre cepas *Staphylococcus sp.* oxacilina resistente, destaca-se neste estudo como uma possibilidade de uso como antimicrobiano alternativo diante da multirresistência observada em *Staphylococcus sp.* circulantes entre humanos e animais.

CONCLUSÃO

O óleo de *Cymbopogon flexuosus* (Steud) Wats microencapsulado apresentou atividade inibitória e bactericida frente a *Staphylococcus sp.* oxacilina resistente.

Os resultados obtidos são importantes e revelam necessidade de continuidade de estudos analisando a efetividade do óleo in vivo, bem como possível efeito modulador sobre cepas resistentes, podendo ser um produto alternativo com atividade antimicrobiana para uso em animais e humanos.

AGRADECIMENTOS: CNPq, FAPEMIG.

REFERÊNCIAS

1. ADUKWU EC, ALLEN SCH& PHILLIPS CA. The antibiofilm activity of lemongrass (*Cymbopogon flexuosus*) and grapefruit (*Citrus paradisi*) essential oils against five strains of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Applied Microbiology*, 113(2): 2012, 1217- 27.
2. ANVISA, Resistência microbiana- Mecanismo e impacto clínico. 2007. Disponível em < http://www.anvisa.gov.br/servicos/controle/rede_rm/cursos/rm_controle/opas_web/modulo3/gramp_staphylo.htm>. Acesso em 14 de maio de 2016.
3. AZEVEDO IL, ALMEIDA AC, MARTINS ER, NOGUEIRA WCL, FARIA FILHO, DE OLIVEIRA SP, PRATES JPB& SOUZA CN. Eficácia in vitro do óleo essencial de capim-limão (*cymbopogon flexuosus* Steud. Wats.) frente a bactérias entéricas de origem avícola. *Acta Veterinaria Brasileira*, 10(1): 2016, 25-31.
4. AZEVEDO IL, MARTINS ER, ALMEIDA AC, NOGUEIRA WCL, FARIA FILHO, DE SANTOS, VKFR&LARA LJ. Use of *Lippia rotundifolia* and *Cymbopogon flexuosus* essential oils, individually or in combination, in broiler diets. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 46: 2017, 13-19.
5. BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. *Práticas integrativas e complementares: plantas medicinais e fitoterapia na Atenção Básica*/Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. – Brasília : Ministério da Saúde, 2012. 156 p. : il. – (Série A. Normas e Manuais Técnicos) (Cadernos de Atenção Básica ; n. 31)

6. CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute (2015a) Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically. Available at: http://shop.clsi.org/c.1253739/site/Sample_pdf/M100S25_sample.pdf Acesso em: 15 fev 2017.
7. CUNY C, ARNOLD P, HERMES J, ECKMANN T, MEHRAJ J, SCHOENFELDES, ZIEBUH W, ZHAO Q, WANG Y, FEßLER AT & KRAUSE G. Occurrence of cfr-mediated multiresistance in staphylococci from veal calves and pigs, from humans at the corresponding farms, and from veterinarians and their family members. *Veterinary Microbiology*, 200: 2017, 88–94.
8. DONSI F, MARIANNA ANNUNZIATA M, SESSA M & FERRARI G. Nanoencapsulation of essential oils to enhance their antimicrobial activity in foods. *LWT - Food Science and Technology*, 44: 2011, 1908-1914.
9. GANJEWALA D. Cymbopogon essential oils: Chemical compositions and bioactivities. *International Journal of Essential Oil Therapeutics*, 3: 2009, 56-65.
10. KAMIMURA JA, SANTOS EH, HILL LE, & GOMES CL Antimicrobial and antioxidant activities of carvacrol microencapsulated in hydroxypropyl-beta-cyclodextrin. *LWT – Food Science and Technology*, 57: 2014, 701–709.
11. NAIK MI, FOMDA BA, JAYKUMAR E. & BHAT JA Antibacterial activity of lemongrass (*Cymbopogon citratus*) oil against some selected pathogenic bacterias. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 1: 2010, 535-538.
12. OLIVEIRA PA, GUIMARÃES AL, PACHECOAGM, ARAUJOC, OLIVEIRA JUNIOR R, LAVORAEM, SILVAMG, MENDESARL, ROLIMALA, COST MP, FARIAS HCL, PESSOACO, LOPESNP, MARQUESLMM, ALMEIDAJRG. Estudo fitoquímico, atividade antimicrobiana e citotóxica de espécimes de *Leonotis nepetifolia* L. R. (Br) *Química Nova*, 39: 2016, 32-37.
13. RAKMAI J. Encapsulation of yarrow essential oil in hydroxypropyl-beta-cyclodextrin: physiochemical characterization and evaluation of bio-efficacies. *Cyta – Journal of Food*, 2017. <http://dx.doi.org/10.1080/19476337.2017.1286523>.
14. VANDENDRIESSCHE S, VANDERHAEGHEN W, LARSEN J, DE MENDONÇA R, HALLIN M, BUTAYE P, HERMANS K, HAESBROUCK F, DENIS O. High genetic diversity of methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* (MSSA) from humans and animals on livestock farms and presence of SCCmec remnant DNA in MSSA CC3982014, *Journal Antimicrobial Chemotherapy*, 69: 2014, 355–362.