

**FLAVIA DEL GAUDIO GUIMARÃES**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE MICROBIOLÓGICA E CITOTÓXICA DO  
ÓLEO ESSENCIAL DE *Cymbopogon winterianus* JOWITT ex BOR**

**Juiz de Fora  
2013**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA**  
**FACULDADE DE FARMÁCIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**  
**MESTRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE MICROBIOLÓGICA E CITOTÓXICA DO**  
**ÓLEO ESSENCIAL DE *Cymbopogon winterianus* JOWITT ex BOR**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração: Ciências Farmacêuticas, da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

**JUIZ DE FORA**  
**2013**

*“À minha família, em especial aos meus pais Carlos Antunes da Cunha  
Guimarães e Maria da Glória Faria Guimarães por terem-me  
concedido à oportunidade de conhecer as primeiras letras deste texto  
que hoje escrevo e por me conduzirem até aqui”.*

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente agradeço a Deus, todo poderoso, por ter colocado em meu caminho essa oportunidade e me guiado até o fim.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria da Penha Henriques do Amaral pela orientação, oportunidade e apoio, pois sem o seu esforço e a sua dedicação não seria possível o desenvolvimento deste trabalho.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Diretora Míriam Aparecida Oliveira Pinto por disponibilizar o Laboratório de Análise de Alimentos e Águas sempre que precisei.

À farmacêutica Martha Eunice Bessa pelo acompanhamento e orientações nos testes prévios da Concentração Inibitória Mínima.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Helena Carla Castro Rangel que tornou possível a aprendizagem de métodos novos disponibilizando o Laboratório de Antibióticos, Bioquímica, Educação e Modelagem Molecular (LABiEMol – Universidade Federal Fluminense / UFF) e seus parceiros.

Ao Prof. Dr. Bruno Leal Alves Ferreira, co-orientador, por dispor de seu tempo, sempre com boa vontade, para me acompanhar nos procedimentos experimentais, no setor de bacteriologia do LABiEMol. Obrigada pelo comprometimento e a seriedade com que me ajudou.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Viviane Lione pela orientação na técnica de citotoxicidade, realizada no setor de cultura celular do LABiEMol.

Às estagiárias do LABiEMol Lais Cavalcanti e Gabriela Silva que foram essenciais para o desenvolvimento e execução dos experimentos laboratoriais.

À amiga Lílian Amaral por me ajudar sempre que precisei.

À Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora e a equipe do Programa de Pós-Graduação / Mestrado em Ciências Farmacêuticas pela oportunidade de realização deste trabalho.

E a todas as pessoas que, direta ou indiretamente, ajudaram na execução deste trabalho.

*“De tudo ficaram três coisas:  
A certeza de que estamos sempre começando...  
A certeza de que é preciso continuar...  
A certeza de que seremos interrompidos antes de  
terminar...*

*Portanto devemos:  
Fazer da interrupção um caminho novo...  
da queda, um passo de dança...  
do medo, uma escada...  
do sonho, uma ponte...  
da procura... um encontro”  
(Fernando Sabino em “O Encontro Marcado”)*

## RESUMO

A crescente frequência de microrganismos resistentes nas instituições de saúde, têm evidenciado a necessidade pela busca de novas moléculas que possam permitir uma melhoria no tratamento de infecções por organismos patogênicos resistentes a profilaxias convencionais. As plantas aromáticas, bem como os respectivos óleos essenciais, são utilizadas há séculos como flavorizantes, na fabricação de cosméticos e perfumarias, e farmacologicamente com fins medicinais, o que tem estimulado a procura por substâncias biologicamente ativas e eficazes, especialmente contra microrganismos. Os óleos essenciais de plantas do gênero *Cymbopogon* e seus componentes são reconhecidos por apresentarem atividade antimicrobiana, antihelmíntica, antiparasitária, antiinflamatória, anticonvulsivante e antioxidante. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade biológica *in vitro* do óleo essencial da planta medicinal *Cymbopogon winterianus* Jowitt ex Bor, popularmente conhecida como citronela. Foram utilizados os métodos: teste de difusão em discos, concentração inibitória mínima e curva de crescimento bacteriano (método indireto) frente às cepas de referência da *American Type Culture Collection* (ATCC) - *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Staphylococcus simulans* ATCC 27851, *Enterobacter cloacaceae* ATCC 23355, *Proteus mirabilis* ATCC 15290 *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Serratia marcescens* ATCC 14756, *Escherichia coli* ATCC 35211 - e cepa de isolado clínico - *Staphylococcus aureus* 53581, além dos ensaios de citotoxicidade pelo método de redução do corante tretazólio (MTT), utilizando células da linhagem Vero. O óleo de citronela apresentou atividade antibacteriana contra as cepas Gram-positivas testadas enquanto que as cepas Gram-negativas utilizadas neste trabalho mostraram-se resistentes. No estudo da citotoxicidade os resultados indicaram que a viabilidade celular, manteve-se superior a 100%, demonstrando que este óleo não apresentou citotoxicidade sobre as células em estudo, nas concentrações avaliadas.

Palavras-chave: Resistência microbiana. Óleo essencial. *Cymbopogon winterianus*. Atividade biológica.

## ABSTRACT

The increasing frequency of resistant microorganisms in healthcare institutions, has shown the need for searching new molecules that may allow an improvement in the treatment of infections caused by pathogens resistant to conventional prophylaxis. Aromatic plants and their essential oils have been used for centuries as a flavoring in the manufacture of cosmetics and perfume, and pharmacologically for medicinal purposes, which has stimulated the search for biologically active substances and effective, especially on microorganisms. The essential oils plants of the genus *Cymbopogon* and its constituents are known for having antimicrobial activities, anthelmintic, antiparasitic, anti-inflammatory, anticonvulsant and antioxidant. Therefore, the aim of this study was to evaluate *in vitro* the biological activity of the essential oil of *Cymbopogon winterianus* medicinal plant, popularly known as citronella. The methods used were: disk diffusion test, minimum inhibitory concentration and bacterial growth curve (indirect method) against reference strains from the American Type Culture Collection (ATCC) - *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Staphylococcus simulans* ATCC 27851, *Enterobacter cloacaceae* ATCC 23355, *Proteus mirabilis* ATCC 15290 *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Serratia marcescens* ATCC 14756, *Escherichia coli* ATCC 35211 - and strain from clinical isolate - *Staphylococcus aureus* 53581, apart from cytotoxicity assays by the method of tetrazólio dye reduction (MTT), using Vero cell line. The citronella oil presented antibacterial activity against Gram-positive strains tested whereas Gram-negative strains used in this study were resistant. In the study of cytotoxicity results indicated that cell viability remained above 100%, indicating that this oil had no cytotoxicity of the cells under study at the concentrations evaluated.

Keywords: Microbial resistance. Essential oil. *Cymbopogon winterianus*. Biological activity.

## LISTA DE FIGURAS

	P.
Figura 1	Estrutura química básica do isopreno (I), monoterpeno (II) e sesquiterpenos (III)..... 21
Figura 2	Citronela ( <i>Cymbopogon winterianus</i> )..... 26
Figura 3	Estrutura química do citronelal (I), geraniol (II) e citronelol (III) 27
Figura 4	Aparelho Clevenger, do tipo modificado (hidrodestilação)..... 41
Figura 5	Folhas de citronela frescas ..... 41
Figura 6	Método de difusão em discos com as etapas de realização do teste..... 44
Figura 7	Representação do ensaio de antibiograma quantitativo por macrodiluição, indicando crescimento bacteriano a partir do terceiro tubo; a CIM está representada pelo tubo 2. Tubo 10 representa o controle negativo..... 45
Figura 8	Curva de Crescimento de <i>S. aureus</i> ATCC 25923..... 55
Figura 9	Curva de Crescimento de <i>S. aureus</i> 53581(isolado)..... 56
Figura 10	Curva de Crescimento de <i>S. epidermidis</i> ATCC 12228..... 57
Figura 11	Citotoxicidade de 24 horas apresentada como porcentagem de viabilidade celular. As colunas representam a média de células viáveis em relação ao controle negativo (DMEN)..... 59
Figura 12	Citotoxicidade tardia apresentada como porcentagem de viabilidade celular. As colunas representam a média de células viáveis em relação ao controle negativo (DMEN)..... 60



## LISTA DE TABELAS

	P.	
Tabela 1	Principais óleos essenciais de interesse no mercado mundial	19
Tabela 2	Componentes do óleo essencial das folhas de <i>C. winterianus</i> .....	27
Tabela 3	Identificação e quantificação (%) dos constituintes químicos, obtidos de plantas frescas e plantas secas, efetuada em três épocas do ano distintas.....	29
Tabela 4	Valores das médias do halo de inibição do crescimento bacteriano em mm $\pm$ desvio padrão do óleo essencial de citronela ( <i>C. winterianus</i> ) sobre bactérias Gram-negativas.....	49
Tabela 5	Valores das médias do halo de inibição do crescimento bacteriano em mm $\pm$ desvio padrão do óleo essencial de citronela ( <i>C. winterianus</i> ) sobre bactérias Gram-positivas.....	50
Tabela 6	Concentração Inibitória Mínima do óleo essencial de citronela frente às cepas bacterianas que foram sensíveis ao teste de difusão em discos.....	52
Tabela 7	Médias $\pm$ desvio padrão dos valores de absorvância obtidas frente às concentrações de óleo essencial de citronela, sobre a cepa <i>S. aureus</i> ATCC 25923.....	54
Tabela 8	Médias $\pm$ desvio padrão dos valores de absorvância obtidas frente às concentrações de óleo essencial de citronela, sobre a cepa de isolado clínico <i>S. aureus</i> 53581.....	55
Tabela 9	Médias $\pm$ desvio padrão dos valores de absorvância obtidas frente às concentrações de óleo essencial de citronela, sobre a cepa <i>S. epidermidis</i> ATCC 12228.....	57
Tabela 10	Viabilidade celular (%) $\pm$ desvio padrão do teste de 24 horas..	59
Tabela 11	Viabilidade celular (%) $\pm$ desvio padrão do teste tardio.....	60

## LISTA DE SIGLAS

ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ANOVA	Análise de Variância
A-549	Células de carcinoma de pulmão humano
CIP	Ciprofloxacina
CBM	Concentração Bactericida Mínima
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CG-EM	Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massa
DMEN-H	Meio Eagles`s High
ELISA	Enzyme Linked Immune Sorbent Assay
FF	Faculdade de Farmácia
HeLa	Células de carcinoma cervical humano
HT-29	Células de adenocarcinoma do cólon humano
HUAP	Hospital Universitário Antônio Pedro
ICB	Instituto de Ciência Biológicas
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
ISO	<i>International Standard Organization</i>
LABiEMol	Laboratório de Antibióticos, Bioquímica, Educação e Modelagem Molecular
LPS	Lipopolissacarídeos
MRSA	Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
MTT	Sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de Tetrazolium
OEs	Óleos Essenciais
OMS	Organização Mundial da Saúde
SFB	Soro Fetal Bovino
TSA	Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos
UFF	Universidade Federal Fluminense
UFJF	Universidade Federal de Juiz de Fora
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
VAN	Vancomicina
WHO	<i>World Health Organization</i>

## SUMÁRIO

	P.
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>14</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>16</b>
2.1 Produtos Naturais.....	16
2.2 Óleos Essenciais.....	18
2.2.1 Potencial Antimicrobiano.....	22
2.3 <i>Cymbopogon winterianus</i> Jowitt ex Bor.....	24
2.3.1 Composição Química e Principais Atividades.....	26
2.4 Resistência Bacteriana.....	31
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>39</b>
3.1 Objetivo Geral.....	39
3.2 Objetivos Específicos.....	39
<b>4. MATERIAL E MÉTODO.....</b>	<b>40</b>
4.1 Locais de Realização das Análises.....	40
4.2 Produto Natural Testado ( <i>Cymbopogon winterianus</i> ).....	40
4.3 Extração do Óleo Essencial.....	40
4.4 Linhagens Bacterianas e Condições de Crescimento.....	42
4.5 Antibiograma Quantitativo - Teste de Difusão em Discos .....	43
4.5.1 Preparação do Inóculo.....	43
4.5.2 Preparação da Solução Teste.....	43
4.5.3 Antibióticos Clínicos Controle.....	43
4.5.4 Procedimento Completo do Antibiograma Quantitativo (Teste de Difusão em Discos) .....	43
4.6 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	44
4.7 Curva de Crescimento Bacteriano.....	46
4.8 Teste de Citotoxicidade.....	47
4.9 Análise Estatística do Teste de Citotoxicidade.....	48
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>49</b>
5.1 Teste de Difusão em Discos.....	49
5.2 Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	52
5.3 Curva de Crescimento Bacteriano.....	53
5.4 Teste de Citotoxicidade.....	58
<b>6. CONCLUSÃO.....</b>	<b>62</b>
<b>7. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>63</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A resistência microbiana tornou-se o principal problema de saúde pública no mundo, realidade para a qual têm sido propostas variadas iniciativas de controle. Portanto, a crescente frequência de microrganismos resistentes nas instituições de saúde constitui-se um grande desafio mobilizando órgãos nacionais e internacionais de vigilância e controle epidemiológicos (OLIVEIRA, SILVA, 2008; BUSH et al., 2011).

Embora muitas indústrias farmacêuticas tenham produzido novos antibióticos e modificado algumas drogas já existentes, nas últimas três décadas, a resistência a essas moléculas pelos microrganismos vem aumentando (PERESI et al., 2007; MENDONÇA, 2009; ODONKOR, ADDO, 2011). Esse aumento de resistência é maior em bactérias, podendo também ocorrer em vírus, fungos e protozoários (VIKSVEEN, 2003).

Na corrida do desenvolvimento de novos antimicrobianos deve-se enfatizar aqueles de origem vegetal, visto que o Brasil possui a maior biodiversidade do planeta e que variadas plantas já vêm sendo vastamente utilizadas e testadas há centenas de anos, com as mais diversas finalidades (BRANDÃO et al., 2006; FERRONATTO et al., 2007; VEIGA JR, 2008; PELISSARI et al., 2010).

As plantas medicinais têm um importante papel na saúde mundial. A utilização das plantas com atividades terapêuticas é uma das práticas mais antigas empregadas, pelo homem, para cura de suas enfermidades (SILVA et al., 2010). Apesar dos grandes avanços observados na medicina moderna, nas últimas décadas, continuam a representar uma rica fonte de drogas com diferentes princípios de atividade farmacológica, utilizadas na medicina popular, sendo suas ações comprovadas em teste de laboratório (CALIXTO, 2005; VEIGA JR, 2008; SILVA et al., 2010).

Nos últimos dez anos, um aumento notável da utilização de plantas medicinais tem sido observado devido aos seus componentes ativos, os quais possuem características antimicrobianas, através de compostos sintetizados pelo metabolismo secundário da planta (NASCIMENTO et al., 2000; ADEMILUYI et al., 2013).

Dentre os produtos naturais empregados em abordagens terapêuticas, os óleos essenciais (OEs) são descritos como produtos com grande potencial terapêutico e farmacológico, por apresentarem atividade contra um grande número de microrganismos, incluindo espécies resistentes a antibióticos e antifúngicos (EDRIS, 2007; CARMO et al., 2008; SANTURIO et al., 2011; SANTOS, NOVALES, 2012). Com o descobrimento e a elucidação das centenas de componentes dos OEs nas últimas décadas, pode-se entender a complexidade e a enorme diversidade que existe neste grupo de produtos naturais (FRANZ, 2010).

*Cymbopogon winterianus* Jowitt ex Bor, conhecida como citronela, pertencente à família Poaceae, tem elevada importância econômica devido à extração do óleo essencial a partir de suas folhas, o qual é empregado nas indústrias de perfumaria, cosméticos, produtos farmacêuticos e aromatizantes, por apresentar atividade antimicrobiana (SAHOO, DEBATA, 1995; ROCHA et al., 2000; DORMAN, DEANS, 2000; MARCO et al., 2007).

Devido à importância deste princípio ativo, este trabalho apresenta como objetivo a avaliação da atividade microbiológica e citotóxica do óleo essencial de citronela contribuindo para a pesquisa e desenvolvimento de produtos bioativos, visando à aplicação destes como matéria-prima com finalidade farmacêutica.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Produtos Naturais

A utilização das plantas com atividades terapêuticas é uma das práticas mais antigas empregada, pelo homem, para cura de suas enfermidades (SILVA et al., 2010). Essas plantas eram utilizadas pela população como forma alternativa ou complementar aos medicamentos sintéticos. Assim, grande parte das informações advém do conhecimento popular (BIAVATTI et al., 2007; AGRA et al., 2007). O uso de plantas e derivados pelo homem objetivando a promoção e manutenção de sua saúde pode ser comprovado, historicamente, por registros de longa data, como por exemplo, os egípcios, assírios, mesopotâmicos, indianos, chineses e outras civilizações que sempre contavam com a figura de curandeiro ou equivalente. Este era quem indicava a espécie de planta correta para afecções variadas - desde febres, distúrbios psicológicos e gastrointestinais, a infecções bacterianas, acne, gota, e até epilepsia - pelo emprego de formulações simples, como cataplasmas, chás, decoctos, pós, defumadouros, tinturas e outras formulações herbais (BALUNAS, KINGHORN, 2005; HALBERSTEIN, 2005).

Um aumento notável na utilização de plantas medicinais tem sido observado nos últimos dez anos devido aos seus componentes ativos e ao seu uso nos cuidados primários da saúde (ADEMILUYI et al., 2013).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) define planta medicinal como sendo “todo e qualquer vegetal que possui, em um ou mais órgãos, substâncias que podem ser utilizadas com fins terapêuticos ou que sejam precursores de fármacos semissintéticos”. A diferença entre planta medicinal e fitoterápico reside na elaboração da planta para uma formulação específica, o que caracteriza um fitoterápico (WHO, 1998).

Em alguns países industrializados, como França, Itália e Alemanha, estima-se que entre 70 – 90% destas populações recorrem ao conhecimento popular, sob o cunho de “medicina complementar”, “alternativa” ou “não convencional”. Essa mesma taxa pode ser observada em países em desenvolvimento, porém sob uma realidade diferente, uma vez que o acesso aos medicamentos padronizados é

precário, sendo a medicina popular a principal fonte de prevenção, tratamento e manutenção da saúde de grande parte da população nesses países (WHO, 2011).

No Brasil, o uso das plantas medicinais foi disseminado principalmente pela cultura indígena. É um país rico em diversidade cujo território possui cinco principais biomas sendo designados como floresta amazônica, cerrado, mata atlântica, pantanal e caatinga (VEIGA JR, 2008). Os recursos naturais continuam sendo importantes fontes de substâncias e precursores com grande potencial terapêutico, não apenas pelo grande número de espécies vegetais com propriedades medicinais existentes e inexploradas, mas principalmente pela variedade de metabólitos primários e secundários por elas sintetizados (JUSTO et al., 2008).

Dentre os vários medicamentos a base de plantas, a síntese da heroína, e mais tarde, do ácido acetilsalicílico (Aspirina®) foi fundamental para o início da organização da indústria farmacêutica. A partir de então, no final do século XIX, as plantas passaram a ter um valor comercial mais significativo, pois a possibilidade de se identificar, purificar ou até mesmo sintetizar princípios ativos isolados de plantas impulsionaram a expansão das pesquisas farmacêuticas, principalmente após a Segunda Guerra Mundial. Alguns medicamentos fundamentados em derivados vegetais têm importância até hoje, como a Quinina® (antimalárico), Taxol®, Vincristina® e Vimblastina® (quimioterápicos), e a Digoxina® (cardiotônico) (RASKIN et al., 2002; NEWMAN, 2008; LI, VEDERAS, 2009).

As plantas possuem várias vias metabólicas secundárias que dão origem a diversos compostos, incluindo alcaloides, flavanoides, isoflavanoides, taninos, cumarinas, glicosídeos, terpenos, poliacetilenos que, por vezes, são específicos a determinadas famílias, gêneros ou espécies cujas funções até pouco tempo eram desconhecidas. Esses metabólitos estão relacionados ao mecanismo de defesa da planta, em resposta ao ataque de parasitas como fungos, bactérias, vírus, insetos, moluscos ou animais superiores (SILVA et al., 2010).

A busca da população por essas plantas incentivou os pesquisadores e a indústria farmacêutica a investirem mais nas pesquisas de novos fármacos. Com o objetivo de minimizar a carência de informações sobre plantas medicinais, pesquisadores de vários campos de conhecimento se unem formando equipes multidisciplinares e, com o apoio da OMS que realiza diversas reuniões internacionais, investigam e definem quais as estratégias mais adequadas para manter a qualidade, a eficácia e a segurança desses medicamentos, atendendo às

normas das agências reguladoras, como as resoluções da ANVISA (VALDIR et al., 2005; SOARES et al., 2006). As principais ciências envolvidas são a botânica, a química e a farmacologia e, ainda, as que estão relacionadas aos costumes, cultura e utilização das plantas, como a antropologia, a agronomia e a biotecnologia (RATES, 2001; CUNHA et al., 2003). A integração dessas áreas na pesquisa de plantas medicinais conduz a um caminho promissor e eficaz para descobertas de novos medicamentos (FILHO-BARBOSA et al., 2007).

As plantas medicinais apresentam complexas misturas de componentes químicos e possuem diversas ações biológicas e farmacológicas, tornando, assim, a seleção de uma planta para estudo farmacológico um passo muito importante (SOUSA et al., 2008). A escolha pode ser feita de várias maneiras através do uso tradicional dos componentes químicos, da seleção randomizada ou da combinação de mais de um critério (RATES, 2001; CARLINI, 2003; ALBUQUERQUE, HANAZAKI, 2006).

De um modo geral, a natureza é a responsável pela produção da maioria das substâncias orgânicas conhecidas, no entanto, o reino vegetal é “autor” da maior parcela da diversidade química conhecida e registrada na literatura (MONTANARI, BOLZANI, 2001). A descoberta da conexão entre plantas e saúde é responsável pelo início de uma nova geração de terapia, que inclui fármacos derivados de plantas - o uso da própria planta ou de suas partes - dietas suplementares e alimentos funcionais (CORRÊA et al., 2008).

## **2.2 Óleos Essenciais**

As plantas aromáticas, bem como os respectivos óleos essenciais (OEs), são utilizadas há séculos como flavorizantes, na fabricação de cosméticos e perfumarias, e farmacologicamente com fins medicinais, o que tem estimulado a procura por substâncias biologicamente ativas e eficazes, especialmente sobre microrganismos (FIGUEIREDO et al., 2008; FRANZ, 2010).

O termo OE foi definido no século XVI, por Paracelso, médico e alquimista suíço, para quem o componente efetivo de uma droga era a “quinta essência”, a “alma da planta” (SILVA, 1998).

Bagetta et al. (2010) descrevem sobre a crescente produção de óleo essencial, especialmente nas áreas de produtos de perfumaria e indústria



cosmética, mas também há uma grande produção nas indústrias alimentícias e farmacêuticas. São apresentados, na Tabela 1, os principais óleos essenciais de interesse no mercado mundial (BIZZO et al., 2009).

**Tabela 1:** Principais óleos essenciais de interesse no mercado mundial

Óleo essencial	Espécie
Canfora	<i>Cinnamomum camphora</i> (L.) J. Presl.
Cedro (China)	<i>Chamaecyparis funebris</i> (Endl.) Franco
Cedro (EUA)	<i>Juniperus virginiana</i> L. e <i>J. ashei</i> Buchholz
Citronela	<i>Cymbopogon winterianus</i> Jowitt e <i>C. nardus</i> (L.) Rendle
Coentro	<i>Coriandrum sativum</i> L.
Cravo-da-india	<i>Syzygium aromaticum</i> (L.) Merr. e L. M. Perry
Eucalipto (tipo cineol)	<i>Eucalyptus globulus</i> Labill., <i>E. polybractea</i> R.T. Baker e <i>Eucalyptus</i> spp.
Eucalipto (tipo citronela)	<i>Eucalyptus citriodora</i> Hook.
Grapefruit	<i>Citrus paradisi</i> Macfady
Hortela-pimenta	<i>Mentha piperita</i> L.
Laranja (Brasil)	<i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck
Lavandim	<i>Lavandula intermedia</i> Emeric ex Loisel
Lima destilada (Brasil)	<i>Citrus aurantifolia</i> (Christm. & Panz.) Swingle
Limão	<i>Citrus limon</i> (L.) N.L. Burm.
Menta japonesa (Índia)	<i>Mentha arvensis</i> L. f. <i>piperascens</i> Malinv. ex Holmes
Patchouli	<i>Pogostemon cablin</i> (Blanco) Benth.
Sassafras (China)	<i>Cinnamomum micranthum</i> (Hayata) Hayata
Spearmint (nativa)	<i>Mentha spicata</i> L.

Fonte: BIZZO et al., 2009.

Dentre os produtos naturais empregados em abordagens terapêuticas, os OEs, são descritos como produtos com grande potencial terapêutico e farmacológico (EDRIS, 2007).

Os OEs também podem ser chamados de óleos voláteis, azeites etéreos ou azeites voláteis ou essências devido a algumas de suas características físico-químicas, como volatilidade, solubilidade em solventes orgânicos (como o éter), e aroma intenso, muitas vezes agradável (TAVARES, 2009). São sintetizados por plantas aromáticas durante o metabolismo secundário e normalmente extraídos de plantas encontradas em países quentes, como as do mediterrâneo e dos trópicos, onde representam parte importante da farmacopeia tradicional (BAKKALI et al., 2008).

A ISO (*International Standard Organization*) define óleos voláteis como os produtos obtidos de partes de plantas através de destilação por arraste com vapor d'água, bem como os produtos obtidos por compressão dos pericarpos de frutos cítricos (SIMÕES et al., 2002).

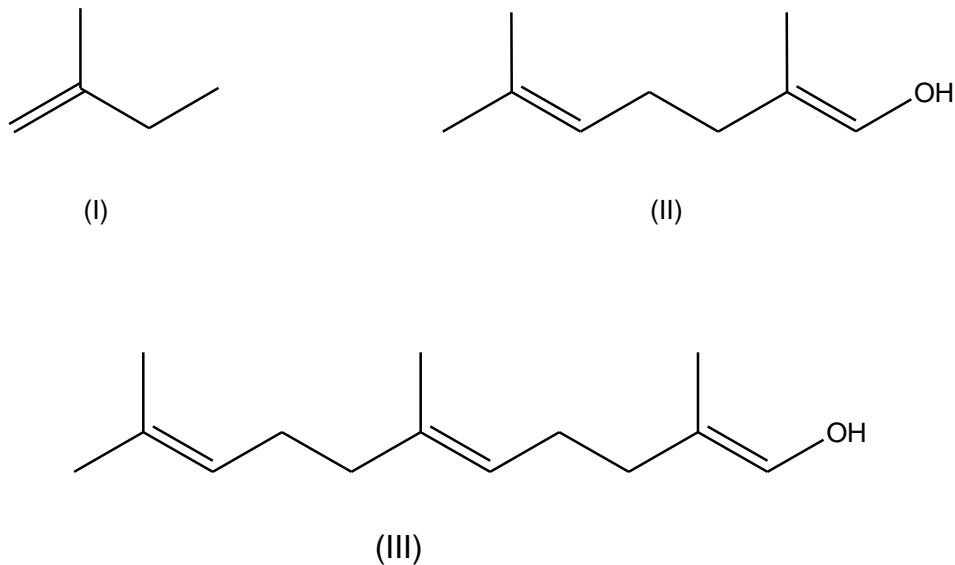
Nos vegetais, os OEs desenvolvem funções relacionadas com sua volatilidade, agem na atração de polinizadores, na proteção contra o ataque de insetos, ácaros e patógenos (exercem efeito tóxicos nesses organismos), evitam a perda de água e também desempenham funções ecológicas, especialmente como inibidores de germinação (SANTOS et al., 2004; CASTAGNINO, ORSI, 2012).

Essas substâncias aromáticas podem estar localizadas em diferentes partes do vegetal. Dependendo da família, a síntese e o acúmulo dos óleos essenciais vêm associados à presença de estruturas histológicas especializadas, localizadas em determinados pontos do tecido vegetal, como pelos glandulares, células parenquimáticas diferenciadas, canais oleíferos e bolsas que podem estar presentes em alguns órgãos das plantas (flores, folhas, cascas dos caules, madeira, raízes, rizomas, frutos ou sementes). Embora todos os órgãos de uma planta possam acumular óleos essenciais, sua composição pode variar segundo sua localização (COSTA et al., 2005).

Fisicamente, se apresentam no estado líquido à temperatura ambiente, com aspecto incolor ou claro. Não se misturam à água e podem ser extraídos de diferentes modos, como hidrodestilação, destilação a vapor, extração por solventes orgânicos ou gorduras ou extração por alta pressão e extração por CO<sub>2</sub> supercrítico. (EDRIS, 2007; OKOH et al., 2010).

Com o descobrimento e a elucidação das centenas de componentes dos OEs nas últimas décadas, pode-se entender a complexidade e a enorme diversidade que existe neste grupo de produtos naturais (FRANZ, 2010). São formados por uma complexa mistura de compostos, principalmente terpenos - termo empregado para designar todas as substâncias cuja origem biossintética deriva de unidades do isopreno (Figura 1 - I) - e derivados oxigenados (álcoois, aldeídos, ésteres, éteres, cetonas, fenóis e óxidos) (SANTURIO et al., 2011; BAJPAI et al., 2012). Os terpenos mais frequentes nos óleos voláteis são os monoterpenos (Figura 1 - II) e os sesquiterpenos (Figura 1 - III) (STEFFENS, 2010).

**Figura 1:** Estrutura química básica do isopreno (I), monoterpreno (II) e sesquiterpenos (III).



Fonte: CASTRO et al., 2007.

A caracterização química dos óleos essenciais pode ser obtida por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS), em que seus constituintes são definidos através da análise das regiões de pico (cada constituinte apresenta uma região de pico característico) (GALINDO et al., 2010).

O componente majoritário nem sempre é o que realiza a atividade biológica em estudo ou de interesse. O efeito pode ser atribuído a um constituinte em menor proporção ou a um sinergismo entre os compostos existentes naquele óleo (BANDONI, CZEPAK, 2008; SIMÕES et al., 2009).

Componentes ativos de OEs podem chegar à corrente sanguínea, ultrapassar a barreira hematoencefálica e atingir o sistema nervoso central através de variadas vias, sendo alguns exemplos a inalação (BAGETTA et al., 2010), a aplicação dérmica (BROOKER et al., 1997), injeções subcutâneas ou por vias intraperitoneais e administração oral (ORAFIDIYA et al., 2004).

As propriedades farmacológicas atribuídas aos OEs são diversas e algumas são preconizadas por apresentarem vantagens importantes quando comparadas a outros medicamentos como, por exemplo, a sua volatilidade, que os torna ideal para uso em nebulizações, banhos de imersão ou simplesmente em inalações (BANDONI, CZEPAK, 2008).

Os OEs apresentam diferentes propriedades biológicas, como a ação larvicida (RAJKUMAR, JEBANESAN, 2010), antimicrobiana (SANTURIO et al., 2011), atividade antioxidante, (WANNES et al., 2010), ação analgésica e anti-inflamatória, (MENDES et al., 2010), fungicida, (CARMO et al., 2008), atividade antitumoral (SILVA, 2008), efeitos sobre os estados emocionais e mentais (BAGETTA et al., 2010) e atividade anticonvulsiva (QUINTANS-JÚNIOR et al., 2010).

Essas propriedades não são detectadas com igual eficiência em todas as plantas, inclusive na mesma espécie. Isso ocorre porque a eficiência dos OEs depende da sua composição química, a qual depende de vários fatores, incluindo as partes utilizadas e metodologia empregada no processo de extração, variações fisiológicas inerentes à planta (características genéticas dos cultivares, fase de desenvolvimento, ciclo de polinização, variações sazonais, condições de estresse da planta), condições ambientais (clima, poluição atmosférica, características do solo), variações geográficas, entre outros (CAROVIC-STANKO et al., 2010; SANTOS, NOVALES, 2012). O óleo obtido de uma planta é característico daquela espécie. Mesmo que óleos diferentes apresentem compostos iguais qualitativamente, diferenças quantitativas farão com que aquele óleo tenha propriedades químicas e biológicas diferentes dos demais (TROMBETTA et al., 2005; EDRIS, 2007).

### **2.2.1 Potencial Antimicrobiano dos Óleos Essenciais**

As propriedades antimicrobianas dos OEs de plantas aromáticas são reconhecidas desde a Antiguidade (SIMÕES, SPITZER, 2000). De acordo com Santos e Novales (2011) os OEs possuem atividade contra uma grande variedade de microrganismos (bactérias, vírus, fungos e protozoários). Segundo Garcia et al. (2011) a atividade antimicrobiana dos OEs tem sido atribuída principalmente aos terpenos e derivados, os quais são os principais compostos isolados dos mesmos.

Vários estudos têm avaliado a atividade antibacteriana destes compostos e relataram diferentes mecanismos de ação (devido à grande variedade na composição química dos OEs), como inibição da síntese de ácidos nucleicos, das funções da membrana citoplasmática e do metabolismo energético (BURT, 2004; DI PASQUA et al., 2010; GREAY, HAMMER, 2011; QIU et al., 2011). Alguns autores consideram a lipofilia de seus constituintes como a propriedade que explicaria a

atividade antimicrobiana, característica que permite a inibição bacteriana através da permeabilidade e despolarização da membrana citoplasmática. Com a permeabilidade da membrana, há aumento do vazamento de prótons das células e modificação do potencial elétrico da membrana, indicações de dano da membrana e conseqüentemente morte celular (COWAN, 1999; GARCIA et al., 2011; RUA et al., 2011).

Existem algumas explicações possíveis para as diferenças observadas na atividade antibacteriana dos óleos: as características estruturais das bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, a composição química e concentrações testadas de cada óleo, e variações na composição química dos OEs de acordo com as condições de crescimento da planta, a época de coleta e características do processo de extração (TORTORA et al., 2005; SANTOS, NOVALES, 2011).

Normalmente, as bactérias Gram-positivas apresentam uma maior sensibilidade quando expostas aos óleos essenciais *in vitro* que as bactérias Gram-negativas. As Gram-negativas possuem parede bacteriana diferenciada, apresentando uma membrana externa composta por lipopolissacarídeos (LPS), conferindo maior resistência por evitar a difusão e acúmulo de OE na célula bacteriana (TORTORA et al., 2005).

A atividade antimicrobiana dos OEs também pode estar relacionada com o comprometimento do material genético das bactérias / fungos, com a coagulação do citoplasma (MARTOS et al., 2011) e com a inibição de uma ou mais vias bioquímicas (XING et al., 2012). Segundo Zuzarte et al. (2012) a atividade antimicrobiana dos OEs em leveduras pode ser devida à perturbação de vários complexos enzimáticos envolvidos na produção de energia e na síntese de componentes estruturais, como a completa inibição da formação do tubo germinativo de levedura.

Várias estruturas químicas presentes no metabolismo secundário das plantas exercem alguma ação antimicrobiana. A maioria dessas moléculas possuem atividade fraca e espectro de ação limitado quando utilizadas isoladamente. Porém, ao serem combinadas entre si ou com antibióticos (efeito sinérgico), podem atuar como adjuvantes, modificando a resistência bacteriana frente determinadas drogas, diminuindo a dose necessária de antibióticos para um resultado eficaz (SIMÕES et al., 2009).

O potencial uso de OE em doenças infecciosas necessita de avaliação *in vivo* e de novas pesquisas, excluindo possíveis efeitos colaterais para a fisiologia e microbiota normal de indivíduos infectados (MARTINS et al., 2010).

### 2.3 *Cymbopogon winterianus* Jowitt ex Bor

As plantas da família Poaceae, também denominada Gramineae, são cultivadas em larga escala, notadamente nas regiões subtropicais e tropicais, com distribuição irrestrita em regiões montanhosas, planícies e zonas áridas (MARCO et al., 2007). Essa família contém cerca de 668 gêneros e aproximadamente 9.500 espécies distribuídas universalmente e com grande importância econômica. Está representada por plantas herbáceas dotadas de raízes fibrosas e rara ocorrência de arbustos ou árvores (EVANS, 1996).

O gênero *Cymbopogon* constitui-se em um representante de grande importância da família Poaceae, sendo constituído por cerca de 120 espécies, dentre as quais, aproximadamente 56 são aromáticas. Justifica-se boa parte do interesse despertado por esse grupo amparado por seu aproveitamento econômico na produção de óleo essencial (LORENZI, MATOS, 2008).

Os óleos essenciais do gênero *Cymbopogon* e seus componentes são reconhecidos por apresentarem atividades antimicrobiana (PATTNAIK et al., 1995; BILLERBECK et al., 2001), antihelmíntica (NIRMAL et al., 2007), antiparasitária (GEORGE et al., 2010), antiinflamatória (FRANCISCO et al., 2011), anticonvulsivante (SILVA et al., 2010) e antioxidante (KHUNKITTI, 2010).

Citronela é o nome comum de algumas espécies do gênero *Cymbopogon*, popularmente conhecida por sua característica de repelência a insetos (ROCHA et al., 2000). Duas espécies são mais comumente referidas como citronela: *Cymbopogon nardus* var. *lenabatu* (L.) Rendle, conhecida também como “lenabatu” ou citronela do Ceilão, e *Cymbopogon winterianus* Jowitt ex Bor, também denominada “maha pengiri” ou citronela de Java (SAHOO, DEBATA, 1995). Acredita-se que ambas originaram-se no Ceilão, sendo a primeira cultivada principalmente nessa ilha, enquanto que a segunda é mais encontrada em Java, Haiti, Honduras, Taiwan, Guatemala e República Popular da China (CASTRO et al., 2007).

Até o início do século XIX a citronela do Ceilão era a mais utilizada na produção de óleo essencial, mas gradativamente a citronela de Java dominou o cenário devido a sua maior concentração de óleo (CASTRO et al., 2010).

*Cymbopogon winterianus*, também conhecida como capim-citronela, é considerada uma planta muito resistente, perene, podendo chegar até um metro de altura, a qual cresce em solos de características muito diferentes, mas com preferência pelos solos bem drenados e ricos em nutrientes (ROCHA et al., 2000; TANU, ADHOLEYA, 2004). É facilmente propagada através de perfilhos, sendo retirados em grupos de três, uma vez por ano e replantados para formação de novos plantios. Permite até quatro cortes por ano nos plantios com finalidades industriais de extração de óleo essencial das folhas (MARCO et al., 2006). Suas folhas são longas, com bordas cortantes e de coloração verde clara (Figura 2), idênticas às da espécie *Cymbopogon citratus* (capim-limão). Diferem-se pelo aroma: o capim-limão é suave, com perfume de limão; ao contrário da citronela que é bastante forte (DORMAN, DEANS, 2000). Normalmente as plantas medicinais apresentam resistência ao ataque de pragas, no entanto, qualquer desequilíbrio que possa ocorrer a resistência fica prejudicada (MARTINS et al., 2000).

**Figura 2:** Citronela (*Cymbopogon winterianus*)



Fonte: AUTORA, 2012.

NOTA: Origem - Horto de Plantas Medicinais da Faculdade de Farmácia (FF) da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF).

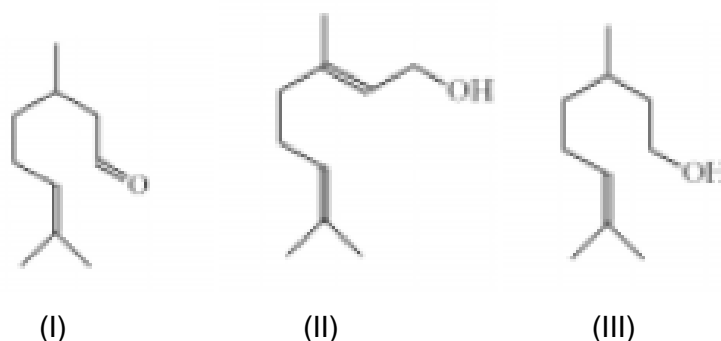
O capim-citronela tem elevada importância econômica devido à produção de óleo essencial em suas folhas, o qual é empregado nas indústrias de perfumaria, cosméticos, produtos farmacêuticos e aromatizantes (ROCHA et al., 2000). Seu cultivo no Brasil tem um forte espaço no mercado de produtos naturais, o que é justificado pela procura do óleo essencial tanto pelo mercado interno como para exportação (AZEREDO et al., 2007).

### **2.3.1 Composição Química e Principais Atividades**

O óleo essencial da citronela contém mais de 80 substâncias, das quais citronelal (I), geraniol (II) e citrionelol (III) (Figura 3) tem particular importância (MARCO et al., 2007). Quintans-Júnior et al. (2008) analisaram a composição química do óleo essencial de *C. winterianus* e também encontraram como constituintes principais o geraniol (40 %), citronelal (27,44 %) e citrionelol (10,45 %).



**Figura 3:** Estrutura química do citronelal (I), geraniol (II) e citronelol (III).



Fonte: CASTRO et al., 2007.

Os fitoconstituintes e seus respectivos pesos moleculares e percentuais na composição do óleo essencial foram analisados por Pereira (2009) e estão expostos na Tabela 2. Como mostra esta tabela, a análise por cromatografia a gás acoplada a um espectrômetro de massas (CG-EM) resultou na identificação de 18 componentes. Entre os fitoconstituintes, o citronelal se apresentou como o componente majoritário do óleo essencial das folhas *C. winterianus* com 23,6 % do total de constituintes presentes, seguido pelo geraniol (18,8 %) e citronelol (11,7 %), em ordem decrescente de percentual.

**Tabela 2:** Componentes do óleo essencial das folhas de *C. winterianus*.

Picos	Composto	Percentual (%)	Peso molecular
1	2-metil-2-hepten-6-ona	0,13	126
2	$\beta$ -mirceno	0,07	136
3	Limoneno	3,039	136
4	Linanol	1,34	136
5	Citronelal	23,59	154
6	Citronelol	11,74	156
7	Geraniol	18,81	139
8	Acetato de citronelil	5,29	138
9	$\beta$ -elemeno	6,40	189
10	Eugenol	10,34	164
11	Germacreno	2,63	204
12	$\Delta$ -cadineno	2,27	204
13	Elemol	6,73	204
14	Endo-1-bourbonanol	1,01	222
15	Farnesol	0,60	204
16	$\gamma$ -eudesmol	1,0	222
17	Trreyol	1,65	204
18	Trans-farnesol	3,01	222

Fonte: PEREIRA, 2009.

No entanto, Silva (2011) avaliou a composição química do óleo essencial de citronela extraído de folhas frescas e de folhas secas através da CG-EM, em três períodos distintos: janeiro e agosto de 2010; janeiro e abril de 2011. Utilizou-se estufa de dessecação com temperatura controlada entre 32 °C e 35 °C mediante a utilização de termômetro de mercúrio calibrado na escala de 0 °C - 100 °C, por um período de sete dias, para a secagem das folhas. Um total de vinte e seis substâncias foram detectadas nas amostras de óleo essencial obtidas das folhas frescas e dezoito substâncias foram detectadas nas amostras obtidas das folhas secas (Tabela 3).

**Tabela 3:** Identificação e quantificação (%) dos constituintes químicos, obtidos de plantas frescas e plantas secas, efetuada em três épocas do ano distintas.

Constituintes Químicos	Planta Fresca / Época do Ano %			Planta Seca / época do ano %		
	Ago/10	Jan/11	Abril/11	Ago/10	Jan/10	Abril/11
dl-limoneno	1,43	0,75	0.81	2.41	2,31	---
alfa- terpinolene	---	---	---	---	---	0.63
l-linalool	---	0,73	0.60	0,58	---	---
citronelal	42,77	34,67	39.03	45.97	42,47	38.79
(neo-iso) isopulegol	0,31	1,21	---	---	---	---
citronelol	16,73	9,69	10.88	13.90	17,39	10.24
neral	0,46	0,58	0.61	---	---	---
geraniol	18,15	19,67	19.03	20.43	20,91	18.01
geranial	0,48	0,76	0.73	0.65	0,49	0.75
cis-2,6-dimetil-2,6-octadieno	---	---	2.31	---	---	4.16
citronellyl acetate	0,49	3,47	---	---	---	---
eugenol	1,56	---	1.35	1.67	1,95	1.53
geranyl acetato	0,17	4,37	2.38	---	---	4.72
beta-elemeno	0,53	---	1.26	0.56	0,61	0.93
aromadendrene	--	0,71	---	---	---	---
D -Germacreno	1,29	1,33	2.41	1.31	1,32	1.96
alfa-muroleno	0,4	---	---	---	---	---
gamma-cadinene	0,15	---	---	---	---	---
delta-cadineno	1,75	0,4	2.83	1.18	1,22	2.24
elemol	5,2	4,51	6.87	4.76	4,61	7.15
germacrene D-4-ol	--	0,76	1.31	---	---	---
gamma-eudesmol	0,51	1,13	0.66	---	0,31	---
tau-muurolol	1,94	2,1	---	---	---	---
beta-eudesmol	--	7,37	---	---	---	---
alfa-cadinol	4,12	---	2.30	1.33	1,39	2.07
14-hidroxi-9-epi(E) cariofileno	---	---	4.62	2.34	2,71	4.33
farnesol	0,18	---	---	---	---	---
1,6 germacradien-5-ol	---	---	---	2.90	2,32	2.49

Fonte: SILVA, 2011.

Silva (2011) observou que o processo de secagem levou a uma redução no número de substâncias detectadas por CG-EM nas amostras extraídas das folhas secas. Isso poderia ser explicado pela presença de produtos voláteis sensíveis à temperatura ou à degradação enzimática. As substâncias identificadas como (neo-iso) isopulegol, neral, citronellyl acetate, aromadendrene, alfa-muroleno, gamma-cadinene, germacrene D-4-ol, tau-murolol, beta-eudesmol e farnesol foram detectadas somente nas amostras de óleo extraídas das folhas frescas. Nas diferentes amostras, em todos os períodos, os principais constituintes foram citronelal, citronelol e geraniol. O monoterpene citronelal foi a substância predominante obtendo um maior percentual em todas as amostras obtidas em agosto de 2010. Esses dados estão de acordo com os estudos de Blank et al. (2007), nos quais estudando os efeitos dos diferentes horários e épocas de colheita para as folhas de citronela, observaram um aumento do conteúdo de citronelal na época seca.

Conforme Marco et al. (2007) os componentes do óleo essencial de citronela foram afetados pela época de coleta e espaçamento de plantio entre as plantas, sendo que os constituintes citronelol e citronelal foram significativamente mais elevados em plantas cultivadas com espaçamento intermediário e colhidas após seis meses do plantio e com 30 cm de altura. Por outro lado, o teor de geraniol foi superior em plantas colhidas quatro meses após o plantio, porém não houve influência do espaçamento e de altura de corte sobre o seu teor.

Segundo Reis et al. (2006), para plantas em estado fresco a temperatura adequada do ar de secagem influencia na qualidade e rendimento durante a extração do óleo essencial, constatando também que a planta em estado fresco apresenta menor perda dos compostos voláteis em comparação as que foram secas e/ou congeladas.

Grandes diferenças de composição em óleos essenciais de uma mesma espécie não são incomuns e ocorrem devido a vários fatores, incluindo as partes utilizadas e metodologia empregada no processo de extração, variações fisiológicas inerentes à planta, condições ambientais, variações geográficas, características genéticas dos cultivares, dentre outros (CAROVIC-STANKO et al., 2010; SANTOS, NOVALES, 2012).

De acordo com os estudos de Shasany et al. (2000), as principais propriedades da citronela são atribuídas às substâncias voláteis em suas folhas,

como citronelal, eugenol, geraniol, elemol e limoneno, entre outras. Segundo Pandey e Rai (2003), *C. winterianus* é utilizada como acaricida, antimicótico e repelente contra uma variedade de insectos.

Tawatsin et al. (2001) observou que o óleo de citronela associado a 5 % de vanilina em uma pesquisa laboratorial repeliu três espécies de mosquitos: o *Aedes aegypti*, o *Culex quin-quefasciatus* e o *Anopheles*, por mais de 8 horas. Coleiras com citronela também são eficazes para afastar pulgas, carrapatos e mosquitos de cachorros.

Alguns compostos presentes no óleo essencial de citronela foram anteriormente referidos como tendo atividade antibacteriana, incluindo o geraniol contra *Escherichia coli* (DUARTE et al., 2007), *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica* e *Salmonella typhimurium* (SI et al., 2006). Arango et al. (2009) mostraram que citronelal e geraniol foram ativos contra *Candida parapsilosis*, *Candida krusei*, *Aspergillus flavus* e *Aspergillus fumigatus*.

A citronela quando utilizada pura mostrou-se eficiente contra todos os isolados da bactéria *Erwinia carotovora* testados, apresentando teste de difusão com halos de inibição variando entre 25 e 35 mm, suplantando o tratamento controle com a Tetraciclina, cujos halos foram entre 18 e 25 mm (COSTA et al., 2008).

Simic et al. (2008) investigaram a atividade antimicrobiana do óleo de *C. winterianus*. Foi evidenciado grande potencial inibitório frente a isolados fúngicos de *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Penicillium*, *C. albicans* e *Trichoderma viride*, sendo este último um fungo bem resistente.

Os resultados de Sinha et al. (2011) sugerem que a utilização do óleo essencial de citronela pode proporcionar um efeito citoprotetor, devido ao seu significativo potencial de inibição da peroxidação lipídica. Em conclusão, pode-se dizer que o óleo essencial de citronela possui propriedades antígenotóxica e antioxidantes.

## **2.4 Resistência Bacteriana**

A resistência microbiana tornou-se o principal problema de saúde pública no mundo, realidade para a qual têm sido propostas variadas iniciativas de controle. Portanto, a crescente frequência de microrganismos resistentes nas instituições de

saúde constitui-se em um grande desafio mobilizando órgãos nacionais e internacionais de vigilância e controle epidemiológicos (OLIVEIRA, SILVA, 2008).

Embora muitas indústrias farmacêuticas tenham produzido novos antibióticos e modificado algumas drogas já existentes, nas últimas três décadas, a resistência a essas moléculas pelos microrganismos vem aumentando (PERESI et al., 2007; MENDONÇA et al., 2009). Esse aumento de resistência é maior em bactérias, podendo também ocorrer em vírus, fungos e protozoários (VIKSVEEN, 2003).

O impacto econômico da resistência bacteriana afeta diferentemente os atores do processo de uso/fornecimento de antimicrobianos (MCGOWAN, 2001):

- Prescritor: tem o custo da ineficácia da terapia convencional, com eventual perda de pacientes.
- Paciente: tem o custo da doença não solucionada e de eventual morte; onera-se com a exigência de medicamento alternativo, usualmente mais caro.
- Sistema Público de Saúde: gasta excessivamente, desequilibrando recursos geralmente escassos.
- Visão social: há redução de fonte de saúde (infecções mais graves, menos fármacos eficazes) para a população.
- Indústria farmacêutica: estímulo para o desenvolvimento de novos produtos. É o único segmento que lucra.

Na corrida do desenvolvimento de novos antimicrobianos devemos enfatizar aqueles de origem vegetal, visto que o Brasil possui a maior biodiversidade do planeta e que variadas plantas já vêm sendo vastamente utilizadas e testadas há centenas de anos com as mais diversas finalidades, por populações do mundo inteiro (BRANDÃO et al., 2006, FERRONATTO et al., 2007; PELISSARI et al., 2010).

Muitas espécies vegetais têm sido usadas pelas características antimicrobianas, através de compostos sintetizados pelo metabolismo secundário da planta. Esses produtos são reconhecidos por suas substâncias ativas, como é o caso dos compostos fenólicos, que fazem parte dos óleos essenciais (NASCIMENTO et al., 2000).

Segundo Tavares (2000), dentre os microrganismos que sofreram grandes alterações quanto a susceptibilidade aos agentes antimicrobianos com o passar dos anos, podem ser destacados os estafilococos, enterobactérias, *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii*. Já foram encontrados casos de patógenos comuns resistentes a quase todos os tipos de antibacterianos existentes no

mercado, gerando aumento na taxa de morbidade, mortalidade e custos nos serviços de saúde (VIKSVEEN, 2003). De acordo com Hamdan e Hahn (2006), a elevada utilização de fármacos antifúngicos permitiu, de forma conjunta ao tratamento de pacientes imunocomprometidos, a resistência de linhagens de fungos patogênicos.

O aumento das cepas de bactérias resistentes e multirresistentes tem sido rápido e preocupante (SRINIVASAN et al., 2002; ROUVEIX, 2007; WHO, 2011). O aparecimento dessas cepas ocorreu em 1944, nos Estados Unidos, quando foi registrado o primeiro caso de resistência à penicilina em *Staphylococcus* sp. em ambiente hospitalar (ERSON, 2005; ROLAIN, RAULT, 2005).

O grande responsável pela disseminação dos genes de resistência e, por conseguinte de microrganismos resistentes, é sem dúvida o próprio homem; seja pela atitude inconsequente ou pela falta de informação, o uso irracional de antimicrobianos tem aumentado, a despeito de todas as publicações, campanhas e informações acerca do fato (NIEDERMAN, 2005).

A administração de antibióticos tem a finalidade de eliminar ou impedir o crescimento de um agente infeccioso sem danos ao hospedeiro (NICOLINI et al., 2008). Essa ação pode ocorrer através de variados mecanismos:

a) interferência na síntese da parede celular do microrganismo, comprometendo os peptidoglicanos estruturais, por exemplo, penicilinas, cefalosporinas, a vancomicina e a bacitracina (PEREZ-TRALLERO, IGLESIAS, 2003; BOMONO, SZABO, 2006; FLUHR, DEGITZ, 2010; CASSONE, OTVOS, 2010);

b) ação sobre a membrana celular, causando uma desorganização funcional: estreptomicina e outros aminoglicosídeos (NIKAIDO, 2001; CASSONE, OTVOS, 2010);

c) comprometimento da síntese de proteínas bacterianas: as tetraciclinas, a eritromicina, entre outros (NICOLINI et al., 2008);

d) inibição da síntese de ácidos nucléicos: o metronidazol, as quinolonas, a rifampicina, as sulfonamidas e trimetoprima (GRAHAME-SMITH, ARONSON, 2004).

Uma infecção pode ser tratada por diversos antibacterianos, visto que existem diferentes mecanismos de patogenicidade bacteriana, devendo ser escolhido aquele ao qual a bactéria apresenta sensibilidade (WHO, 2012).

As bactérias têm sido classificadas como resistentes ou sensíveis de acordo com dados de Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM). São ditas resistentes quando são inibidas *in vitro* só em concentrações superiores àquelas atingidas *in vivo* (TORTORA et al., 2005; HOIBY et al., 2010). Essa relação concentração/inibição de crescimento da droga não deve ser encarada como completamente verdadeira, pois o sucesso terapêutico não depende exclusivamente dessa relação, mas, sim, passa por fatores que incluem a capacidade da droga em atingir o foco infeccioso (JACOBY, 2005). Por exemplo, o caso da eritromicina, que é extremamente ativa contra o meningococo, mas resulta em insucesso terapêutico, pelo fato deste macrolídeo não atravessar, adequadamente, a barreira hematoencefálica (fatores farmacocinéticos) (ROLAIN, RAULT, 2005; RAVAT et al., 2010). Há ainda o comprometimento imunológico do paciente, alvo da terapia, e o quanto essa imunidade pode contribuir para auxiliar a terapêutica quimioterápica. Portanto, deve-se encarar a terapêutica de uma maneira mais abrangente, menos simplista, considerando-se: droga, microrganismo, farmacocinética e imunidade do paciente (TOWNER, 1997).

A fim de sobreviverem à ação letal dos antibacterianos, as bactérias adotam mecanismos, que incluem a resistência, a tolerância e a persistência (FREITAS, 1989; HOIBY et al., 2010).

- Na resistência, a bactéria continua proliferando e mantendo a mesma velocidade de crescimento, mesmo ao ser tratada com o antibacteriano (Freitas, 1989).

- Na tolerância, o crescimento é inibido, mas o número de bactérias viáveis não sofre alteração por longo período. A bactéria desenvolve defesa apenas contra o efeito bactericida do antibacteriano, no qual o sucesso terapêutico somente será alcançado quando a concentração do antibacteriano alcançar o valor da concentração bactericida mínima (CBM), definida como a menor concentração do antibacteriano capaz de matar 99,9 % das bactérias presentes (Freitas, 1989).

- Na persistência, uma pequena fração da população bacteriana submetida ao tratamento não sofre o efeito bactericida do antibacteriano, independentemente de seu mecanismo de ação (JACOBY, 2005; ERSON, 2005; ROLAIN, RAULT, 2005; LECHNER et al. 2012).

A persistência e a tolerância são preocupantes em pacientes imunossuprimidos, nos quais o sucesso da antibioticoterapia depende,



essencialmente, do efeito bactericida da droga. Assim cessado o efeito inibitório do antibiótico ao qual a cepa é persistente ou tolerante, a infecção recrudesce, face à inexistência das defesas do organismo (JACOBY, 2005; RAVAT et al., 2010). No caso da resistência, o fracasso terapêutico é total, restando, como única opção de tratamento, a substituição do antibiótico por outro ao qual a bactéria seja sensível (MIN et al., 2007).

O maior determinante de resistência intrínseca é a presença ou ausência do alvo para a ação da droga (MURRAY, MOELLERING, 1978). Assim, antibióticos poliênicos, como a anfotericina B, atuam contra fungos devido à sua capacidade de ligação a esteróis componentes de sua membrana. Alteram sua permeabilidade, levando-os à morte. Como bactérias não possuem esteróis em sua membrana, sendo essa uma característica natural, são portanto insensíveis a essas drogas. Outro clássico exemplo é a relação entre inibidores da síntese da parede celular, tal como as penicilinas e micoplasmas. Esses microrganismos não apresentam essa estrutura celular, logo penicilinas não encontram alvo para sua ação nesses microrganismos (TOWNER, 1997).

Se, por um lado, a resistência natural não apresenta risco relevante à terapêutica, por ser previsível e constante, bastando-se conhecer o agente etiológico da infecção e os mecanismos de ação dos fármacos disponíveis clinicamente; a resistência adquirida, ao contrário, é responsável por problemas médicos importantes, tendo em vista a grande participação de microrganismos com sensibilidade modificada aos antibacterianos na etiologia das infecções (FREITAS, 1989; ROLAIN, RAULT, 2005).

A resistência bacteriana adquirida a um ou mais antibacterianos consiste em uma nova característica, que é exibida por alguma célula da população de uma determinada espécie de bactéria, característica essa ausente nas células genitoras. Esses exemplares (modificados) da população bacteriana não respondem mais à ação de antibacterianos apesar de ativos contra o restante das bactérias presentes (RAVAT et al., 2010). Essa nova propriedade é resultado de alterações estruturais e/ou bioquímicas da célula bacteriana, determinada por alterações genéticas cromossômicas ou extracromossômicas (plasmídios) (GOLD, MOELLERING, 1996).

Para uma melhor compreensão do fenômeno global de resistência bacteriana é preciso entender como microrganismos adquirem resistência, como passam a expressar essa nova característica, de onde vem essa informação. A aquisição de

resistência pode aparecer originária de uma mutação ou ainda transferível (MIN et al., 2007).

A mutação é um fenômeno decorrente do grande número de divisões da célula bacteriana em um tempo reduzido (ERSON, 2005; ROLAIN, RAULT, 2005). Essa alta velocidade de divisão pode levar a um erro na replicação do DNA, resultando na modificação das características genéticas da bactéria, que pode adquirir resistência aos antibacterianos. Essa mutação ocorre na ausência ou presença de antibióticos. O papel da droga é selecionar os mutantes, favorecendo seu crescimento devido à atuação nas células sensíveis. Esse problema tem se mostrado mais alarmante com drogas destinadas a tratamentos prolongados, como as utilizadas contra a tuberculose e hanseníase (TAVARES, 1996; FLUIT, SCHMITZ, 2004).

A resistência transferível ocorre quando um dado microrganismo recebe material genético de outro microrganismo, passando a expressar a característica contida no gene recentemente adquirido. Esse material genético que contém a informação que expressa a resistência pode ser transferido de algumas formas: transformação, transdução, conjugação e ainda transposição (MIN et al., 2007).

A transformação consiste na captação, por uma bactéria receptora, do DNA proveniente do plasmídeo ou cromossoma liberado pela bactéria doadora. Em condições naturais, a transformação acontece quando a bactéria doadora sofre uma lise e o seu DNA é captado pela bactéria receptora (JACOBY, 2005; ERSON, 2005; ROLAIN, RAULT, 2005). Parece de pouca importância clínica na transferência da resistência, pois só ocorre em condições extremamente favoráveis e em que a bactéria receptora apresente um estado de competência (ROUVEX, 2007). A transformação habitualmente só acontece entre bactérias da mesma espécie e tem sido constatada entre hemófilos, neissérias, estafilococos e estreptococos (TORTORA et al., 2005).

A transdução envolve a incorporação acidental de DNA bacteriano cromossômico ou plasmidial por um bacteriófago durante seu processo de infecção celular. Ocorre geralmente entre bactérias de uma mesma espécie e exerce papel importante na transferência de plasmídeos R (resistência) entre *S. aureus* e *Streptococcus pyogenes* (LACEY, 1975; HYDER, STREITFELD, 1978; JACOBY, 2005).

A conjugação é um processo que requer contato físico, bactéria-bactéria, em que uma das células, a doadora, transfere através da organela denominada fímbria sexual ou pili sexual o material genético a outra, chamada receptora (SRINIVASAN et al., 2002). O pili possui um plasmídeo conjugativo, responsável pela resistência conferida à célula receptora. O plasmídeo é replicado na bactéria doadora (F+) e a sua cópia, que é filamento simples de DNA, é passada para a bactéria receptora (F-), assim denominada pela ausência do plasmídeo, formando uma célula F+ (MIN et al., 2007). Ao receber o material genético sob a forma de plasmídios que pode conter genes determinantes de resistência (plasmídeos R), a bactéria receptora a partir desse momento pode expressar uma nova característica, tornando-se resistente. Pode ainda conjugar com outra bactéria, atuando agora como doadora, pois junto com genes de resistência, ela recebe genes conjugativos (plasmídeos F), permitindo então repetir o processo agora em progressão geométrica. (NEU, 1992; CLANCY et al., 2010).

Segundo Tavares, 1996,

...a resistência extracromossômica pela transferência de fatores R constitui o mais frequente processo de resistência bacteriana aos antimicrobianos em hospitais, favorecido pela pressão seletiva do uso destas drogas neste ambiente.

No fenômeno da transposição há a dependência da presença na bactéria de segmentos curtos de DNA denominados transposons. Transposons podem conter genes de resistência para um ou mais antibióticos (TAVARES, 1996; HAWKEY, 1998). Por não terem capacidade de autorreplicação, unem-se a replicon funcional (DNA que se autorreplica), como os plasmídeos, os bacteriófagos ou o cromossomo da célula (SEPUTIENE et al., 2010). Os transposons incorporados em plasmídeos ou no cromossomo bacteriano podem se manterem estáveis e serem duplicados juntamente com o DNA receptor (BOMONO, SZABO, 2006; MIN et al., 2007; WARDAL et al., 2010).

As bactérias podem desenvolver resistência aos antibacterianos através de alguns mecanismos bioquímicos já bem difundidos na literatura (JACOBY, 2005; HOOPER, 2005; BOMONO, SZABO, 2006; MIN et al., 2007; CLANCY et al., 2010). Esses mecanismos incluem (ROUVEIX, 2007):

- a) modificação química do antibacteriano, através de enzimas específicas;
- b) alteração do sítio de ligação do antibacteriano;
- c) substituição do sítio de ligação;

- d) diminuição da permeabilidade ao antibacteriano;
- e) aumento da síntese de substrato com o qual o fármaco compete;
- f) efluxo do antibacteriano, por intermédio de transporte ativo;
- g) síntese de proteínas protetoras dos ribossomos.

Faz-se imperativo salientar que antibióticos não são agentes mutagênicos, portanto não causam mutação em microrganismos, não fazendo aparecer qualquer nova característica na bactéria. Antibióticos exercem a chamada "pressão seletiva", ou seja, em contato com microrganismos exercerão sua atividade, levando à morte as cepas sensíveis, sobrevivendo então as resistentes (MAJIDUDDIN et al., 2002). Com o uso frequente, essa seleção leva ao predomínio das cepas que de alguma forma sobreviveram, multiplicaram-se e agora são maioria. Portanto, fica claro porque em ambientes hospitalares ou comunidades sem qualquer controle no uso dessas drogas o aparecimento de cepas multirresistentes é mais frequente e também mais complicado. O uso indiscriminado, irresponsável e ignorante de antibióticos, terapêutica ou profilaticamente, humano ou veterinário, passando ainda pelo uso no crescimento animal e propósitos agrícolas, tem favorecido a essa pressão seletiva, mostrando como resultado a seleção e predominância de espécies cada vez mais resistentes (MURRAY, MOELLERING, 1978; MOELLERING, 1990).

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

Avaliar a atividade microbiológica e citotóxica do óleo essencial extraído das folhas frescas (recentemente colhidas) de *Cymbopogon winterianus*, mediante Testes de Difusão em Discos, Concentração Inibitória Mínima (CIM) e de Curva de Crescimento Bacteriano com cepas de referência da *American Type Culture Collection* (ATCC) e cepa de isolado clínico, e Ensaio de Citotoxicidade.

#### 3.2 Objetivos Específicos

- Extrair o óleo essencial das folhas frescas de *C. winterianus* (citronela).
- Investigar o potencial antimicrobiano do óleo de citronela capaz de inibir *in vitro* o desenvolvimento dos microrganismos ATCC's e isolado clínico testados nas condições de estudo, mediante testes microbiológicos incluindo:
  - Antibiograma qualitativo (Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos - TSA / Teste de Difusão em Discos).
  - Antibiograma quantitativo para a determinação da CIM.
  - Estabelecimento dos efeitos inibitórios e/ou bacteriolítico, com o uso da espectrofotometria de absorção em 560 nm (curva de crescimento bacteriano).
- Definir o perfil de citotoxicidade do óleo de Citronela em células da linhagem Vero (rim de macaco verde Africano).
- Contribuir com o estudo da planta medicinal *C. winterianus*, para o desenvolvimento de produtos de interesse farmacêuticos.

## **4. MATERIAL E MÉTODO**

### **4.1 Locais de Realização das Análises**

A preparação da *Cymbopogon winterianus* e a extração do seu óleo essencial foram realizadas no Laboratório de Farmacotécnica da Faculdade de Farmácia (FF) da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), no período de julho a outubro de 2012.

A determinação da CIM preliminar do óleo de citronela frente às cepas ATCC's foi realizada no Laboratório de Análise de Alimentos e Águas da FF – UFJF, no período de agosto a outubro de 2012. A determinação da CIM com a cepa de isolado clínico, a avaliação da curva de crescimento bacteriano e o teste de citotoxicidade foram realizadas no setor de bacteriologia e de cultura de células, respectivamente, do Laboratório de Antibióticos, Bioquímica, Educação e Modelagem Molecular (LABiEMol) - Universidade Federal Fluminense (UFF), no período de novembro-março de 2013.

### **4.2 Produto Natural Testado (*Cymbopogon winterianus*)**

As folhas frescas de citronela foram coletadas no período de julho a outubro de 2012, no Horto de Plantas Medicinais da FF – UFJF, pela manhã. A planta foi identificada pela botânica Dr<sup>a</sup>. Rosangela Siqueira, sendo uma exsicata da espécie depositada no Herbário Leopoldo Krieger do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da UFJF sob a identificação CESJ 55790. A citronela é replantada a cada seis meses, no horto, para a manutenção do cultivo.

### **4.3 Extração do Óleo Essencial**

O óleo essencial de *C. winterianus* foi extraído pelo método da hidrodestilação utilizando o aparelho Clevenger, do tipo modificado (Figura 4).

**Figura 4:** Aparelho Clevenger, do tipo modificado (hidrodestilação).



Fonte: AUTORA, 2012.

Para cada processo de extração foram pesados 150 g de folhas frescas de citronela cortadas com tesoura, em pedaços de aproximadamente 5 cm de comprimento (Figura 5) e transferidas para balão de fundo redondo de 2 L, adicionando-se 1000 mL de água destilada. Após o término da extração (duas horas aproximadamente), obteve-se rendimento médio de 1,4 mL de óleo essencial. O óleo extraído foi acondicionado em tubos de vidro âmbar de 2 mL e mantido em freezer. Um total de 15 extrações foram realizadas, obtendo-se volume final de 21 mL de óleo essencial.

**Figura 5:** Folhas de citronela recentemente colhidas.



Fonte: AUTORA, 2012.

#### 4.4 Linhagens Bacterianas e Condições de Crescimento

As cepas ATCC`s foram fornecidas pela Fundação Oswaldo Cruz – (FIOCRUZ) e Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde – INCQS e a cepa de isolado clínico foi gentilmente cedida pelo Hospital Universitário Antônio Pedro (HUAP), Niterói – Rio de Janeiro.

Os testes microbiológicos foram realizados contra cepas Gram-positivas e Gram-negativas, incluindo:

- **GRAM-POSITIVAS**

*Enterococcus faecalis* ATCC 29212

*Staphylococcus aureus* ATCC 25923

*Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228

*Staphylococcus simulans* ATCC 27851

*Staphylococcus aureus* 53581 (**isolado clínico / fossa nasal**)

- **GRAM-NEGATIVAS**

*Enterobacter cloacaceae* ATCC 23355

*Proteus mirabilis* ATCC 15290

*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

*Serratia marcescens* ATCC 14756

*Escherichia coli* ATCC 35211

As bactérias foram cultivadas em meio Muller-Hinton sólido preparado conforme instruções do fornecedor (Himedia®) e recomendações do *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2007)*.



## **4.5 Antibiograma Qualitativo - Teste de Difusão em Discos**

### **4.5.1 Preparação do Inóculo**

As Unidades Formadoras de Colônias (UFC) das cepas ATCC's e do isolado clínico (citadas no item 4.4) foram retiradas da placa de Petri com alça de platina e transferidas para tubo de ensaio contendo 1,5 mL de meio Muller-Hinton. Os tubos foram devidamente identificados com os nomes das cepas e incubados a 37 °C durante cinco horas, conforme padronização do *CLSI*.

### **4.5.2 Preparação da Solução Teste**

Diluiu-se 100 µL de óleo essencial em 50 µL de água destilada e foi adicionado 10 µL de Tween 80 (tensoativo/agente emulsificador), obtendo-se concentração final de 1,5 µL/mL.

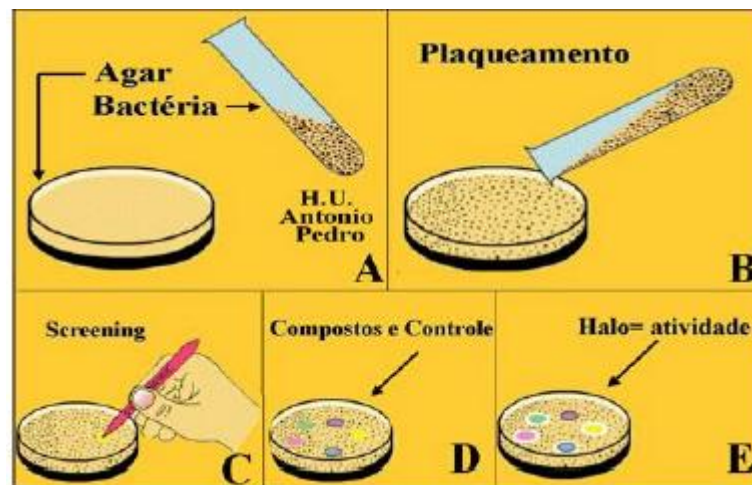
### **4.5.3 Antibióticos Clínicos Controle**

Os controles positivos utilizados foram os discos de papel (Whatman nº 1 com 5 mm de diâmetro) de Ciprofloxacina (CIP- 5 µg/disco) para as bactérias Gram-negativas e de Vancomicina (VAN- 30 µg/disco) para as bactérias Gram-positivas, conforme especificações do *CLSI*. Como controle negativo, foi utilizado água destilada com 10 µL de Tween 80.

### **4.5.4 Procedimento Completo do Antibiograma Quantitativo (Teste de Difusão em Discos)**

As culturas bacterianas após 5 horas de incubação à 37 °C foram diluídas a 1:100 em solução salina 0,85 %. Semeou-se sobre a superfície do meio Muller-Hinton sólido (20 mL/placa) uma alíquota de 0,3 mL de cada cultura incubando a 37 °C por 30 minutos. Após este período os discos de controle positivo, controle negativo e de solução teste foram distribuídos nas placas contendo os inóculos (Figura 6) as quais foram incubadas a 37 °C por 24 horas. Os testes foram realizados em triplicata (CIMANGA et al., 2002; *CLSI*, 2007).

**Figura 6:** Método de difusão em discos com as etapas de realização do teste.



Fonte: FERREIRA, 2010.

A presença de atividade antibacteriana (presença do halo de inibição ao redor do disco) do óleo essencial de citronela, para cada cepa bacteriana estudada, foi expressa pela média do diâmetro da zona de inibição (mm) produzida no final do período de incubação.

#### 4.6 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Para este teste foram utilizadas as cepas bacterianas que apresentaram sensibilidade ao teste de difusão em discos, descritos no item anterior (4.5).

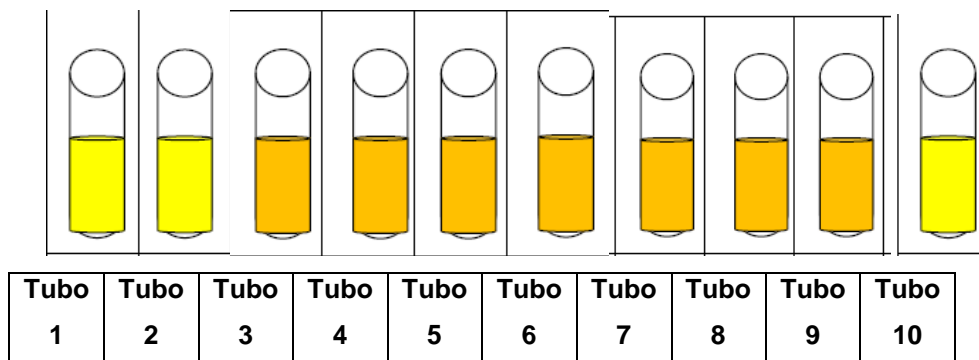
A avaliação da CIM foi realizada através do método da macrodiluição conforme Oliveira et al. (2001), com modificações, utilizando três séries de 10 tubos para cada cepa bacteriana em triplicata (FREITAS, 1989). Tubos contendo meio Muller-Hinton líquido foram preparados e autoclavados por 20 minutos a 120 °C/1 atm. Após autoclavação foram incubados a 37 °C por 24 horas para certificação de que não houve contaminação.

Foram realizados testes preliminares para avaliar a concentração do óleo que apresentasse uma resposta de atividade antimicrobiana frente às cepas que foram sensíveis ao teste de difusão em discos. A diluição do óleo foi realizada adicionando-se uma alíquota de 0,4 mL de óleo (para as cepas *S. aureus* ATCC e *S. aureus* - isolado clínico) e uma gota de Tween 80 em 5 mL de água destilada estéril, obtendo-se uma concentração de 8 µL/0,1 mL. Para a cepa *S. epidermidis* foi

adicionado uma alíquota de 320  $\mu\text{L}$  de óleo e uma gota de Tween 80 em 0,5 mL de água destilada estéril, obtendo-se uma concentração de 64  $\mu\text{L}/0,1\text{ mL}$ .

O primeiro tubo de cada série continha 0,9 mL de meio Muller-Hinton e os demais tubos continham 0,5 mL. No primeiro tubo foi adicionado 0,1 mL da diluição do óleo essencial de citronela. Após a adição de 0,1 mL da diluição do óleo no primeiro tubo de cada série, foi realizada uma diluição seriada à metade a partir deste tubo, obtendo-se concentrações decrescentes de 4  $\mu\text{L}/\text{mL}$  até  $1,5625 \times 10^{-2}$   $\mu\text{L}/\text{mL}$  (para as cepas *S.aureus* ATCC e *S. aureus* isolado clínico) e 32  $\mu\text{L}/\text{mL}$  até  $1,25 \times 10^{-1}$   $\mu\text{L}/\text{mL}$  (para a cepa *S. epidermidis*). Em seguida, 0,5 mL de inóculo, gerado a partir de uma cultura de 5 horas de crescimento e diluída a  $1:10^4$  no meio ( $1,0 \times 10^5$  ufc/mL), foi adicionado em cada tubo, exceto no último tubo de cada série, o qual foi utilizado como controle negativo. Como controle positivo foi utilizado um tubo contendo 0,5 mL do meio de cultura e 0,5 mL do inóculo. Após 24 horas de incubação a 37 °C, a CIM foi definida como a menor concentração da droga que inibe o crescimento visível da cultura (Figura 8) (VIGIL et al., 2005; VALGAS et al., 2007).

**Figura 7:** Representação do ensaio de antibiograma quantitativo por macrodiluição, indicando crescimento bacteriano a partir do terceiro tubo; a CIM está representada pelo tubo 2. Tubo 10 representa o controle negativo.



Fonte: adaptado de FERREIRA, 2010.

#### 4.7 Curva de Crescimento Bacteriano

Para este teste foram empregadas as culturas bacterianas de *S. aureus* ATCC 25923, *S. aureus* 53581 e *S. epidermidis* ATCC 12228 e após período de 17 horas de incubação a 37 °C, conforme metodologia adaptada de Périchon e Courvalin (2012), foram diluídas  $10^4$  em meio Muller-Hinton. Uma alíquota de 1,0 mL de cada inóculo foi transferida para tubos de ensaios contendo 3,9 mL de meio Muller-Hinton e incubados a 37 °C, até obter-se uma leitura de absorvância de 0,10 ( $5,0 \times 10^7$  UFC/mL), que caracteriza a fase exponencial de crescimento bacteriano. Em cada tubo contendo  $5,0 \times 10^7$  UFC/mL foram adicionados 0,1 mL de solução de óleo teste nas concentrações 2,0; 4,0; 8,0 e 16  $\mu$ L/mL.

Os controles negativos foram representados por um tubo contendo somente meio de cultura (5 mL) e outros quatro tubos com o meio de cultura (4,9 mL) e 0,1 mL de solução de óleo teste nas concentrações mencionadas.

No controle de referência de inibição de crescimento foi utilizado um tubo contendo 3,9 mL de meio de cultura, 1,0 mL de inóculo e 0,1 mL de uma solução de vancomicina na concentração de 5 mg/mL.

No tubo controle positivo foram colocados 4,0 mL de meio de cultura e 1,0 mL do inóculo.

Foram colocados 200  $\mu$ L da suspensão de cada tubo (tubos testes e tubos controles) nos poços da microplaca de 96 poços.

As leituras foram realizadas de hora em hora, por um período de seis horas. A quantificação celular foi estabelecida pelo método indireto, ou seja, não foram contadas as Unidades Formadoras de Colônias (UFC), mas sim efetuada a avaliação da turbidimetria, mediante observação da densidade óptica (absorvância) com comprimento de onda de 560 nm (Tortora et al., 2005; Périchon, Courvalin 2012).

#### 4.8 Teste de Citotoxicidade

Para a determinação da viabilidade celular foi utilizado o ensaio do MTT (sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de Tetrazolium), o qual se baseia na conversão do sal tetrazólio (MTT amarelo em um derivado de *formazan* púrpura na mitocôndria das células viáveis) (MOSMANN, 1983; CABRAL, et al., 2013). As células da linhagem Vero (rim de macaco verde Africano, ATCC CCL-81) foram cultivadas em meio Eagle's High – meio essencial mínimo (DMEM-High) suplementado com 5 % de soro fetal bovino (DMEM-H/SFB - GIBCO®) e antibióticos (penicilina 100 UI/mL e estreptomicina 100 µg/mL).

Uma suspensão de  $4,0 \times 10^4$  células por poço foi distribuída em microplaca de 96 poços e mantida a 37 °C, em atmosfera de 5 % de CO<sub>2</sub> (foram utilizadas duas microplacas de 96 poços, uma para leitura de 24 horas e outra para leitura tardia). Quando o tapete celular apresentou mais de 80 % de confluência, o meio foi trocado e as células foram tratadas com o óleo de citronela nas concentrações 0,1; 0,5 e 2,0 %, dissolvidos em 1 % de DMEM-H.

As placas foram incubadas a 37 °C em uma atmosfera úmida a 5 % de CO<sub>2</sub> e, após 24 horas, foram adicionados 40 µL de uma solução a 2 mg/mL de MTT em cada poço (Sigma Chemical Co. ®, Saint Louis, MO, EUA) da placa de 24 horas, incubando por mais 3 horas. Em seguida, a solução de MTT foi retirada e foram adicionados 100 µL de álcool isopropílico em cada poço para interromper a reação e solubilizar os cristais de *formazan* formados nas mitocôndrias viáveis.

Para a leitura tardia, a microplaca permaneceu incubada mais 24 horas, totalizando 48 horas sem exposição ao óleo essencial. O óleo essencial foi retirado e foram adicionados 100 µL de meio DMEM-H 5 % em cada poço. Após 24 horas, foram adicionados 40 µL de uma solução a 2 mg/mL de MTT em cada poço e a microplaca foi incubada por mais 3 horas. Após 3 horas, a solução de MTT foi retirada e foram adicionados 100 µL de álcool isopropílico em cada poço para interromper a reação e solubilizar os cristais de *formazan* formados nas mitocôndrias viáveis. A quantidade de *formazan* formado é diretamente proporcional ao número de células viáveis, que foi determinada a 570 nm em um leitor de ELISA.

Utilizou-se seis poços por concentração (n=6) em cada microplaca e os resultados foram expressos como o percentual de células viáveis em relação ao controle, células expostas somente ao DMEN-H 5 % (células não tratadas).

#### **4.9 Análise Estatística do Teste de Citotoxicidade**

Os resultados foram expressos como porcentagem de viabilidade. As diferenças entre as médias foram determinadas pela análise da variância (ANOVA) com comparação de médias utilizando o software Graph Pad Prism 5 com intervalo de confiança de 0,05.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Teste de Difusão em Discos

No Teste de Difusão em Discos, os resultados expressos na Tabela 4 e 5, indicaram que o óleo essencial de *C. winterianus* não apresentou atividade para todas as bactérias testadas. As linhagens ATCC's Gram-negativas, *Enterobacter cloacaceae* ATCC 23355, *Proteus mirabilis* ATCC 15290, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Serratia marcescens* ATCC 14756 e *Escherichia coli* ATCC 23355 mostraram-se resistentes ao óleo (não houve formação de halo de inibição relevante). Conforme apresentado na Tabela 5, a medida do halo de inibição de 8,0 mm para *E. coli* sugere baixa sensibilidade frente ao óleo de citronela, ou seja, não foi considerado, neste estudo, que o mesmo tenha atividade antibacteriana contra essa cepa.

**Tabela 4** : Valores das médias do halo de inibição em mm do crescimento bacteriano  $\pm$  desvio padrão do óleo essencial de citronela (*Cymbopogon winterianus*) sobre bactérias Gram-negativas.

Bactérias Gram-negativas	Halo de inibição médio (mm) $\pm$ desvio padrão		
	Óleo Essencial	CIP (C +)	Água destilada (C -)
<i>Enterobacter cloacaceae</i> ATCC 23355	-	22,0 $\pm$ 0,57	-
<i>Escherichia coli</i> ATCC 35211	8,0 $\pm$ 0,76	24,0 $\pm$ 0,57	-
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 15290	-	22,0 $\pm$ 1,52	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	-	25,0 $\pm$ 1,52	-
<i>Serratia marcescens</i> ATCC 14756	-	22,0 $\pm$ 0,28	-

CIP: ciprofloxacina; C +: controle positivo; C -: controle negativo; (-): não houve formação de halo de inibição.

Dentre as cepas Gram-positivas, observou-se atividade contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 e *Staphylococcus aureus* 53581 (isolado clínico). Os antibióticos utilizados como referência para o controle positivo de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas

inibiram o crescimento dos microrganismos e o controle negativo permitiu o crescimento dos mesmos, conforme esperado.

**Tabela 5:** Valores das médias do halo de inibição em mm do crescimento bacteriano  $\pm$  desvio padrão do óleo essencial de citronela (*Cymbopogon winterianus*) sobre bactérias Gram-positivas.

Bactérias Gram-positivas	Halo de inibição médio (mm) $\pm$ desvio padrão		
	Óleo Essencial	VAN (C +)	Água destilada (C -)
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	13,0 $\pm$ 0,57	15,0 $\pm$ 0,58	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	11,0 $\pm$ 0,5	15,0 $\pm$ 0,0	-
<i>Staphylococcus aureus</i> 53581	15,0 $\pm$ 1,52	16,0 $\pm$ 1,52	-
<i>Staphylococcus simulans</i> ATCC 27851	-	15,0 $\pm$ 1,15	-
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	-	17,0 $\pm$ 1,52	-

VAN: vancomicina; C +: controle positivo; C -: controle negativo; (-): não houve formação de halo de inibição.

Os resultados obtidos no presente trabalho foram semelhantes aos observados por Pelissari et al. (2010), em que demonstraram atividade antibacteriana *in vitro* (TSA) do óleo essencial de *Melampodium divaricatum* contra cepas Gram-positivas, dentre elas a cepa *S. aureus*, apresentando halo de inibição de 18 mm, porém sem inibição do crescimento das cepas Gram-negativas testadas (*P. aeruginosa*, *E. coli*, *S. marcescens* e *P. mirabilis*).

Carvalho Jr et al. (2004) e Kavooosi e Rowshan (2013) em seus estudos com óleos essenciais de *Cordia verbenácea* e de *Ferula assafoetida* respectivamente, mostraram que a atividade antimicrobiana dos mesmos é mais eficaz nas bactérias Gram-positivas. Outros estudos corroboram com esses autores sobre o fato de os óleos geralmente serem mais ativos contra bactérias Gram-positivas do que contra as Gram-negativas, confirmando o que foi encontrado no presente estudo (MEURE et al., 2008; GOÑI et al., 2009; ÇETIN et al., 2011).



Silvestri et al. (2010) estudaram a atividade inibitória do óleo essencial do cravo-da-índia (*Eugenia caryophyllata* Thunb.) sobre cepas Gram-negativas e Gram-positivas em três concentrações diferentes: 5 µL do óleo/disco, 10 µL do óleo/disco e 15 µL do óleo/disco. Observaram que o óleo tem maior atividade inibitória sobre as cepas Gram-positivas, as quais apresentaram os maiores halos de inibição frente ao mesmo, apesar de o óleo de cravo-da-índia ter apresentado atividade inibitória, mesmo que pequena, contra cepas Gram-negativas.

Mansour et al. (2013) avaliaram a atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Ajuga pseudoiva* contra diversas cepas Gram-positivas e Gram-negativas. A cepa mais sensível ao óleo foi *S. Aureus* com halo de inibição de 32 mm e a mais resistente foi a cepa *P. Aeruginosa* apresentando halo de inibição de 6 mm. A maior atividade do óleo frente as cepas Gram-negativas foi observada contra a *E. coli* com halo de inibição de 21 mm, ao contrário do que ocorreu no presente estudo com o óleo de citronela.

A diferença desses resultados pode estar diretamente relacionados com a estrutura da parede celular das cepas Gram-negativas e das cepas Gram-positivas, tendo em vista que esta é a principal característica que diferencia os dois grupos bacterianos, em que a presença da membrana externa das cepas Gram-negativas atua como barreira para certos tipos de antibióticos, enzimas digestivas, detergentes e metais pesados (Tortora et al., 2005), e pode ser que esteja impedindo a ação de variados óleos essenciais, justificando assim os resultados observados neste estudo com o óleo essencial de *C. winterianus*.

Sabe-se que as bactérias Gram-negativas possuem parede bacteriana diferenciada, apresentando uma membrana externa composta por lipopolissacarídeos (LPS). Uma característica atípica da membrana externa de Gram-negativas é a distribuição assimétrica dos lipídeos sobre as faces externa e interna. A face externa contém todos os lipopolissacarídeos (LPS), enquanto a face interna contém a maioria dos fosfolipídeos. Os LPS contêm mais carga por unidade de área que os fosfolipídeos e a maioria desta carga é aniônica em pH neutro, devido à exposição de grupos carboxil e fosforil que podem ser ionizados. A face externa é altamente carregada e altamente interativa com cátions. Evidências sugerem que a presença de LPS na superfície celular de Gram-negativas tende a tornar a célula bacteriana mais hidrofílica e a perda de LPS da superfície celular torna a superfície mais hidrofóbica, explicando, assim, a maior atividade

antibacteriana do óleo essencial de citronela, neste estudo, frente a bactérias Gram-positivas (CAMESANO, ABU-LAIL, 2002; JEFFERSON, 2004; TORTORA et al., 2005).

## 5.2 Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Os valores da CIM do óleo essencial de citronela frente às cepas bacterianas que apresentaram sensibilidade ao teste de difusão em discos (formação de halo de inibição no crescimento bacteriano) estão na Tabela 6. O óleo de citronela apresentou melhor atividade antibacteriana frente às cepas *S. aureus* ATCC 25923 e *S. aureus* 53581 (isolado).

**Tabela 6:** Concentração Inibitória Mínima do óleo essencial de citronela frente às cepas bacterianas que foram sensíveis ao teste de difusão em discos.

Cepas bacterianas	CIM ( $\mu\text{L/mL}$ )
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	1,0
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	4,0
<i>Staphylococcus aureus</i> 53581	1,0

Corroborando com os resultados desta pesquisa, Oussalah et al. (2007) avaliaram o potencial *in vitro* da atividade antimicrobiana de 28 óleos essenciais extraídos de diferentes espécies de plantas contra quatro cepas bacterianas e verificaram que a cepa *S. aureus* foi a bactéria mais sensível aos óleos essenciais testados. Esses resultados estão também de acordo com os obtidos por Lambert et al. (2001), que observaram uma elevada sensibilidade do *S. aureus* ao óleo essencial de orégano.

Rashid et al. (2013) determinaram a CIM do óleo essencial da *Artemisia indica* através do método de microdiluição, frente a oito cepas bacterianas e observaram que a cepa mais susceptível foi *S. Aureus* (CIM = 16  $\mu\text{g/mL}$ ). Já a cepa *S. epidermidis* apresentou valor da CIM mais elevado (CIM = 64  $\mu\text{g/mL}$ ).

De acordo com os resultados apresentados por Angélico (2011), o óleo essencial de *Croton heliotropiifolius* mostrou atividade inibitória somente para a linhagem multiresistente *S. aureus* (MRSA - *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*) dentre as seis cepas bacterianas testadas, com valor da CIM de 512 µg/mL. Já o óleo essencial de *Croton blanchetianus* mostrou atividade inibitória frente às linhagens *E. coli* (CIM = 512 µg/mL), *Bacillus cereus* (CIM = 256 µg/mL) e para *S. aureus* representando o resultado mais significativo com uma menor CIM de 64 µg/mL. Contraditoriamente, Parreira et al. (2010) não observaram inibição no crescimento de cepas de *S. aureus* pelo óleo essencial de *Baccharis dracunculifolia*.

Segundo Unlu et al. (2010) os valores da CIM do óleo essencial de canela (*Cinnamomum zeylanicum*) contra a cepa *S. aureus* foi de 1,12 mg/mL. Já nos estudos de Santos et al. (2010), os valores da CIM frente a esta cepa, do óleo essencial de *Pterodon emarginatus*, foi superior (50 mg/mL).

Os mecanismos de ação dos óleos essenciais, apesar de estarem pouco caracterizados, parecem associados ao caráter lipofílico das substâncias, característica que permite a inibição bacteriana através da permeabilidade e despolarização da membrana citoplasmática. (DUARTE, 2006; RUA et al., 2011). Não existe um consenso a respeito dos níveis de inibição aceitáveis para substâncias de plantas quando comparadas aos antibióticos padrões (DUARTE, 2006; MENDES et al., 2011).

O aumento crescente da frequência de linhagens bacterianas resistentes aos antibióticos disponíveis clinicamente torna relevante o desenvolvimento de novas drogas com atividade antibacteriana (SADER et al., 1993; MCGOWAN, 2001). Assim, muitos pesquisadores têm se dedicado à investigação de produtos naturais como fonte de novas moléculas bioativas (BRANDÃO et al., 2006; FERRONATTO et al., 2007).

A atividade antimicrobiana do óleo essencial de citronela, comprovada neste estudo, pode explicar parcialmente o uso popular da espécie no tratamento de infecções e como cicatrizante.

### 5.3 Curva de Crescimento Bacteriano

As Curvas de Crescimento Bacteriano das cepas *S. aureus* ATCC 25923, *S. aureus* 53581 (isolado clínico) e *S. epidermidis* ATCC 12228 estão representadas

nas Figuras 8, 9 e 10, respectivamente. O antibiótico utilizado como referência para o controle negativo inibiu o crescimento dos microrganismos e o controle positivo permitiu o crescimento dos mesmos, conforme esperado.

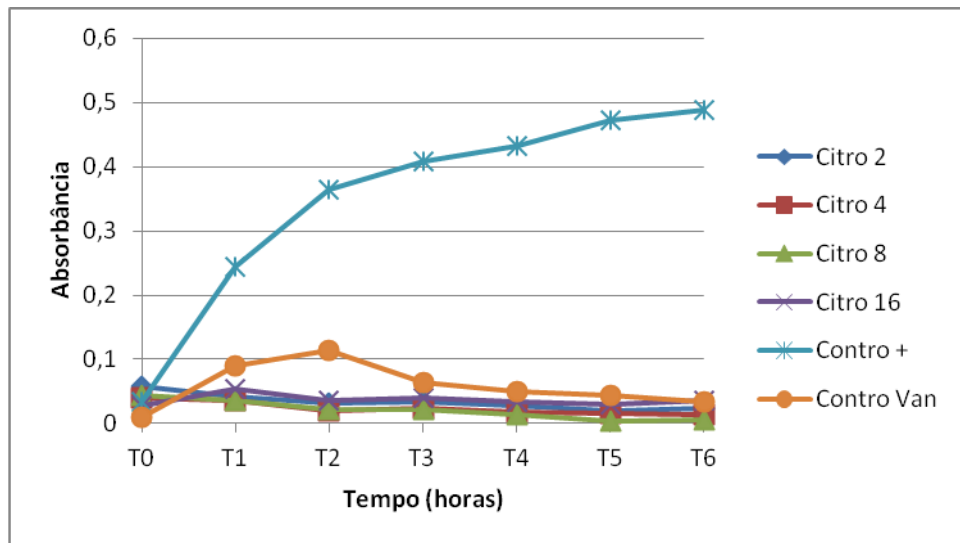
Nos testes para a determinação da curva de crescimento bacteriano, a qual teve o objetivo de verificar o efeito inibidor do óleo essencial de citronela sobre o crescimento bacteriano, observou-se que o óleo de citronela tem uma atividade de inibição bacteriana inicial considerável em todas as concentrações frente às cepas testadas.

**Tabela 7:** Médias  $\pm$  desvio padrão dos valores de absorvância obtidas frente às concentrações de óleo essencial de citronela, sobre a cepa *S. aureus* ATCC 25923.

Tempo	Absorvância $\pm$ Desvio Padrão					
	Citro 2 $\mu$ /mL	Citro 4 $\mu$ /mL	Citro 8 $\mu$ /mL	Citro 16 $\mu$ /mL	Contr +	Contr Van
<b>T0</b>	0,058 $\pm$ 0,0060	0,0396 $\pm$ 0,0050	0,043 $\pm$ 0,0080	0,028 $\pm$ 0,0160	0,034 $\pm$ 0,0200	0,01 $\pm$ 0,0260
<b>T1</b>	0,042 $\pm$ 0,0050	0,035 $\pm$ 0,0070	0,035 $\pm$ 0,0070	0,054 $\pm$ 0,0130	0,245 $\pm$ 0,0270	0,089 $\pm$ 0,0280
<b>T2</b>	0,031 $\pm$ 0,0020	0,025 $\pm$ 0,0030	0,021 $\pm$ 0,0010	0,035 $\pm$ 0,0090	0,365 $\pm$ 0,0280	0,114 $\pm$ 0,0220
<b>T3</b>	0,030 $\pm$ 0,0050	0,024 $\pm$ 0,0070	0,022 $\pm$ 0,0040	0,035 $\pm$ 0,0090	0,408 $\pm$ 0,0290	0,063 $\pm$ 0,0270
<b>T4</b>	0,028 $\pm$ 0,0060	0,018 $\pm$ 0,0060	0,0146 $\pm$ 0,0060	0,034 $\pm$ 0,0100	0,432 $\pm$ 0,0210	0,05 $\pm$ 0,0290
<b>T5</b>	0,019 $\pm$ 0,0020	0,016 $\pm$ 0,0040	0,003 $\pm$ 0,0005	0,03 $\pm$ 0,0090	0,472 $\pm$ 0,0220	0,044 $\pm$ 0,0290
<b>T6</b>	0,023 $\pm$ 0,0040	0,013 $\pm$ 0,0080	0,006 $\pm$ 0,0005	0,036 $\pm$ 0,0040	0,488 $\pm$ 0,0200	0,033 $\pm$ 0,0290

Citro: óleo essencial de citronela; Contr +: controle positivo; Contr Van: controle vancomicina (-).

Observando-se a Figura 8, verifica-se que a atividade de inibição bacteriana do óleo essencial de citronela frente à cepa *S. aureus* ATCC 25923, nas concentrações de 2, 4 e 8  $\mu$ L/mL, ocorreu na primeira hora (T1). Na concentração de 16  $\mu$ L/mL, esta atividade foi identificada na segunda hora (T2). Já a ação inibitória mais efetiva da vancomicina ocorreu a partir do T3.

**Figura 8:** Curva de Crescimento de *S. aureus* ATCC 25923.

Na curva de crescimento da cepa *S. aureus* 5358 (isolado), representada pela Figura 9, assim como ocorreu na curva de crescimento anterior, a atividade de inibição bacteriana do óleo de citronela nas concentrações de 2, 4 e 8  $\mu\text{L}/\text{mL}$  foi observada na primeira hora (T1) de realização do teste. Já para a concentração de 16  $\mu\text{L}/\text{mL}$ , esta atividade foi observada na segunda hora (T2). Observou-se que a vancomicina apresentou sua atividade inibitória mais efetiva a partir do T4 (Figura 9).

**Tabela 8:** Médias  $\pm$  desvio padrão dos valores de absorbância obtidas frente às concentrações de óleo essencial de citronela, sobre a cepa de isolado clínico *S. aureus* 53581.

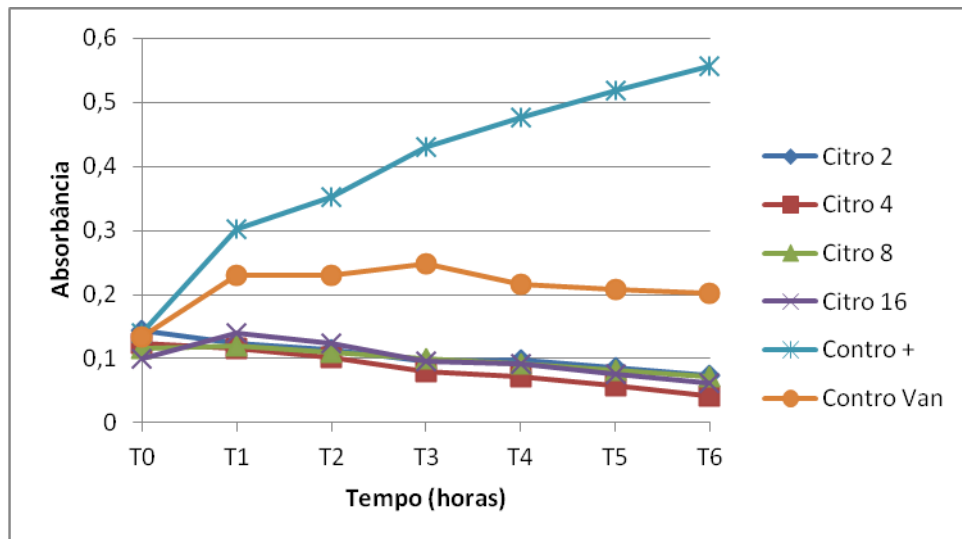
Tempo	Absorbância $\pm$ Desvio Padrão					
	Citro 2	Citro 4	Citro 8	Citro 16	Contr +	Contr Van
T0	0,144 $\pm$ 0,0005	0,123 $\pm$ 0,0010	0,115 $\pm$ 0,0120	0,1 $\pm$ 0,0070	0,139 $\pm$ 0,0020	0,133 $\pm$ 0,0120
T1	0,123 $\pm$ 0,0080	0,115 $\pm$ 0,0100	0,114 $\pm$ 0,0170	0,139 $\pm$ 0,0060	0,302 $\pm$ 0,0180	0,23 $\pm$ 0,0140
T2	0,113 $\pm$ 0,0070	0,102 $\pm$ 0,0140	0,11 $\pm$ 0,0180	0,123 $\pm$ 0,0050	0,353 $\pm$ 0,0080	0,231 $\pm$ 0,0120
T3	0,095 $\pm$ 0,0030	0,08 $\pm$ 0,0120	0,1 $\pm$ 0,0080	0,095 $\pm$ 0,0090	0,43 $\pm$ 0,0120	0,249 $\pm$ 0,0150
T4	0,095 $\pm$ 0,0060	0,072 $\pm$ 0,0140	0,091 $\pm$ 0,0120	0,091 $\pm$ 0,0090	0,477 $\pm$ 0,0240	0,217 $\pm$ 0,0130
T5	0,086 $\pm$ 0,0070	0,057 $\pm$ 0,0150	0,081 $\pm$ 0,0110	0,075 $\pm$ 0,0100	0,519 $\pm$ 0,0340	0,209 $\pm$ 0,0080
T6	0,074 $\pm$ 0,0050	0,042 $\pm$ 0,0130	0,071 $\pm$ 0,0110	0,061 $\pm$ 0,0100	0,556 $\pm$ 0,0420	0,202 $\pm$ 0,0080

Citro: óleo essencial de citronela; Contr +: controle positivo; contr Van: controle vancomicina (-).

A atividade de inibição do óleo de citronela, frente à cepa de isolado clínico, em todos os períodos de tempo analisados, foi bem significativa, principalmente

quando comparada com a atividade de inibição da vancomicina (Figura 9). Os valores obtidos das absorvâncias para o óleo de citronela foram inferiores àqueles obtidos para a vancomicina (Tabela 8).

**Figura 9:** Curva de Crescimento de *S. aureus* 53581 (isolado).



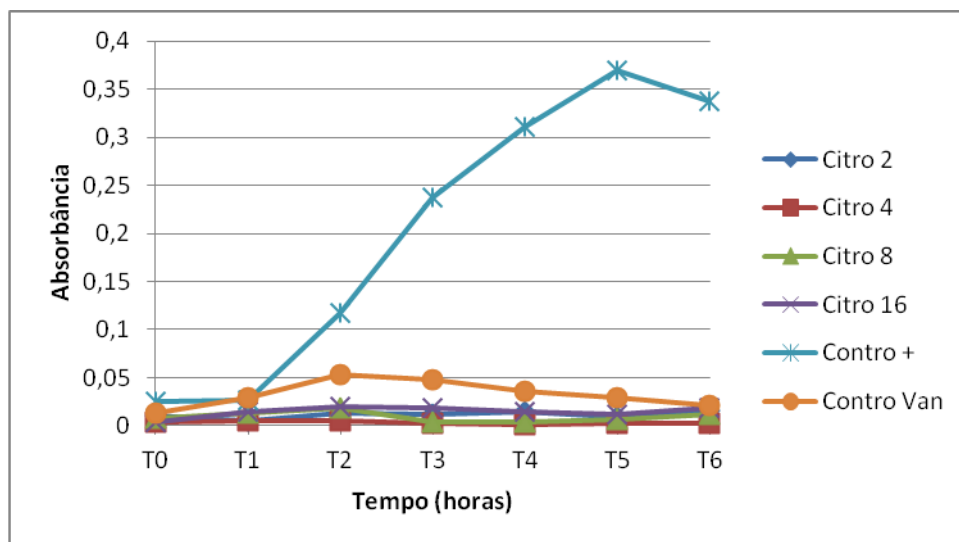
Na curva de crescimento de *S. epidermidis* ATCC 12228, representada na Figura 10, o óleo de citronela apresentou atividade de inibição bacteriana em todas as concentrações testadas, tendo a sua melhor atividade a partir do T3. A vancomicina iniciou sua melhor atividade inibitória também a partir do T3, porém com valor de absorvância acima do encontrado para o óleo (Tabela 9).

**Tabela 9:** Médias  $\pm$  desvio padrão dos valores de absorvância obtidas frente às concentrações de óleo essencial de citronela, sobre a cepa de isolado clínico *S. epidermidis* ATCC 12228.

Tempo	Absorvância $\pm$ Desvio Padrão					
	Citro 2	Citro 4	Citro 8	Citro 16	Contr +	Contr Van
T0	0,011 $\pm$ 0,0040	0,004 $\pm$ 0,0020	0,008 $\pm$ 0,0050	0,004 $\pm$ 0,0030	0,025 $\pm$ 0,0080	0,013 $\pm$ 0,0070
T1	0,015 $\pm$ 0,0020	0,005 $\pm$ 0,0030	0,013 $\pm$ 0,0040	0,014 $\pm$ 0,0060	0,026 $\pm$ 0,0050	0,029 $\pm$ 0,0030
T2	0,017 $\pm$ 0,0010	0,006 $\pm$ 0,0010	0,018 $\pm$ 0,0080	0,020 $\pm$ 0,0050	0,117 $\pm$ 0,0070	0,053 $\pm$ 0,0050
T3	0,012 $\pm$ 0,0030	0,002 $\pm$ 0,0010	0,004 $\pm$ 0,0010	0,019 $\pm$ 0,0050	0,238 $\pm$ 0,0070	0,048 $\pm$ 0,0060
T4	0,013 $\pm$ 0,0050	0,002 $\pm$ 0,0001	0,004 $\pm$ 0,00050	0,015 $\pm$ 0,0080	0,311 $\pm$ 0,0070	0,036 $\pm$ 0,0060
T5	0,009 $\pm$ 0,00050	0,001 $\pm$ 0,0004	0,004 $\pm$ 0,0040	0,012 $\pm$ 0,0050	0,369 $\pm$ 0,0104	0,029 $\pm$ 0,00050
T6	0,016 $\pm$ 0,0030	0,003 $\pm$ 0,0010	0,012 $\pm$ 0,0070	0,018 $\pm$ 0,0060	0,337 $\pm$ 0,0200	0,021 $\pm$ 0,0090

Citro: óleo essencial de citronela; Contr +: controle positivo; contr Van: controle vancomicina (-).

**Figura 10:** Curva de Crescimento de *S. epidermidis* ATCC 12228.



Foi realizada uma leitura após 24 horas de incubação na qual verificou-se crescimento bacteriano em todas as concentrações do óleo de citronela testadas, o mesmo não foi verificado com o controle vancomicina o que pode indicar que, devido à temperatura de incubação, alguns componentes do óleo reduziram a atividade, isto se deve, muito provavelmente, a volatilidade de vários componentes do óleo de citronela como descrito por Silva (2011).

Em todas as curvas de crescimento bacteriano apresentadas neste estudo, o óleo essencial de citronela apresentou atividade de inibição inicial considerável, ao

contrário do que ocorreu com a vancomicina, a qual apresenta melhor atividade a partir de T3 ou T4 (Figuras 8, 10 e Figura 9, respectivamente). Esta diferença pode estar relacionada com o mecanismo de ação que o óleo essencial de citronela e a vancomicina possuem.

A vancomicina é um antibacteriano glicopeptídeo que afeta o metabolismo de construção da parede celular das bactérias (JONES, 2006; BRUNTON et al., 2012). Para tanto, ela liga-se na porção terminal do dipeptídeo D-Ala-D-Ala de um pentapeptídeo encontrado em precursores de peptidoglicano (principal componente da parede celular bacteriana), interferindo na etapa de transpeptidação, a qual é responsável pela formação do peptidoglicano maduro a partir do peptidoglicano imaturo (BRUNTON et al., 2012). Essa estrutura molecular é responsável pela rigidez e forma da parede celular das bactérias, além de protegê-las da ação de autolisinas produzidas quando ocorre danos na síntese da parede celular das bactérias. (TRABULSI et al., 1999).

No entanto, o mecanismo de ação dos óleos essenciais não está totalmente elucidado. Vários estudos têm avaliado a atividade antibacteriana destes compostos e, devido à grande variedade na composição química dos mesmos, relataram diferentes mecanismos de ação, como inibição da síntese de ácidos nucleicos, das funções da membrana citoplasmática e do metabolismo energético (HAMMER et al., 1999; BURT, 2004; DI PASQUA et al., 2010; QIU et al., 2011). Alguns autores consideram a lipofilia de seus constituintes como a propriedade que explicaria a atividade antimicrobiana, característica que permite a inibição bacteriana através da permeabilidade e despolarização da membrana citoplasmática, levando à morte celular (COWAN, 1999; GARCIA et al., 2011; RUA et al., 2011).

#### **5.4 Teste de Citotoxicidade**

O teste de redução do MTT avalia a capacidade da enzima succinato desidrogenase (enzima mitocondrial presente somente nas células metabolicamente ativas) de reduzir o sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium (MTT) a cristais de formazana na mitocôndria da célula, sugerindo que organelas citoplasmáticas mantêm sua atividade fisiológica quando expostas a certos óleos essenciais, como por exemplo o de citronela (MOSMANN, 1983; VALADARES et al., 2007).



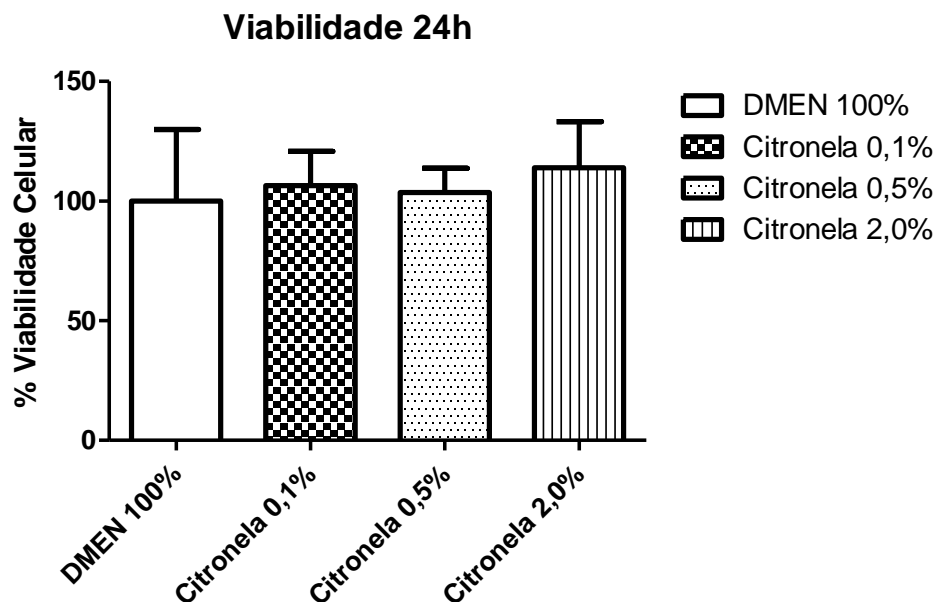
A citotoxicidade do óleo essencial de citronela sobre as células Vero está apresentada nas Tabelas 10 e 11 e nas Figuras 11 e 12.

**Tabela 10:** Viabilidade celular (%)  $\pm$  desvio padrão do teste de 24 horas.

Viabilidade (%) $\pm$ desvio padrão			
DMEN 100%	Citronela 0,1%	Citronela 0,5%	Citronela 2,0%
100,00 $\pm$ 14,98	106,38 $\pm$ 7,24	103,54 $\pm$ 5,05	113,98 $\pm$ 9,59

Os resultados indicaram que a viabilidade celular das células da linhagem Vero, frente a todas as concentrações testadas, manteve-se superior a 100 % (viabilidade celular referente ao controle DMEN), demonstrando que o óleo essencial de citronela não apresentou efeito citotóxico sobre as células em estudo.

**Figura 11:** Citotoxicidade de 24 horas apresentada como porcentagem de viabilidade celular. As colunas representam a média de células viáveis em relação ao controle negativo (DMEN).

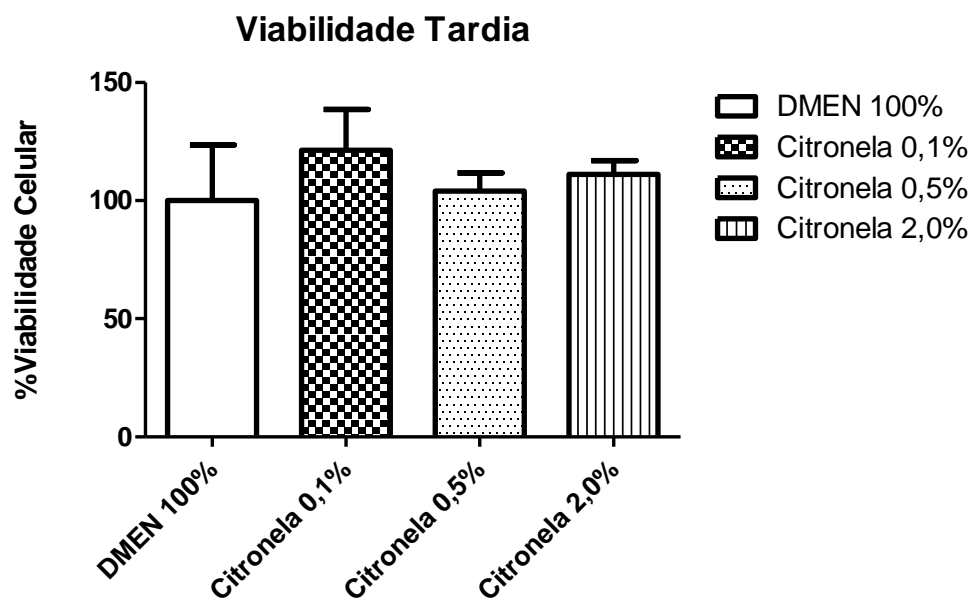


No teste de citotoxicidade de 24 horas, não houve diferença estatística significativa entre as amostras ( $P < 0,05$ ).

**Tabela 11:** Viabilidade celular (%)  $\pm$  desvio padrão do teste tardio.

Viabilidade (%) $\pm$ desvio padrão			
DMEN 100%	Citronela 0,1%	Citronela 0,5%	Citronela 2,0%
100,00 $\pm$ 11,78	121,30 $\pm$ 8,61	104,02 $\pm$ 3,86	111,03 $\pm$ 2,93

Os resultados indicaram, assim como para o tratamento de 24 horas, que a viabilidade celular tardia (48 horas) das células da linhagem Vero frente a todas as concentrações testadas manteve-se superior a 100 % (viabilidade celular referente ao controle DMEN), demonstrando que o óleo essencial de citronela não apresentou citotoxicidade sobre as células em estudo.

**Figura 12:** Citotoxicidade tardia apresentada como porcentagem de viabilidade celular. As colunas representam a média de células viáveis em relação ao controle negativo (DMEN).

Assim como no tratamento de 24 horas, não houve diferença estatística significativa entre as amostras ( $P < 0,05$ ).

Alguns pesquisadores, estudando atividades citotóxicas de óleos essenciais sobre células Vero, encontraram resultados diferenciados, ou seja, alguns com atividade tóxica e outros sem essa característica.

Silva et al. (2008) avaliando a citotoxicidade do óleo essencial de *Casearia sylvestris*, utilizando o método MTT, contra células de carcinoma do pulmão humano

(A-549), carcinoma cervical humano (HeLa) e de adenocarcinoma do cólon humano (HT-29) observaram que o uso da planta contra diferentes tipos de neoplasias pode apresentar resultados positivos, mesmo o óleo essencial apresentando baixa citotoxicidade contra células não tumorais (células Vero e macrófagos isolados de ratos), da mesma forma que no presente estudos, nos quais o óleo de citronela apresentou baixa citotoxicidade sobre células Vero.

O óleo essencial de *Myristica fragrans*, conhecida popularmente como nós-moscada, estudado por Piaru et al. (2012), também não apresentou citotoxicidade contra células Vero.

Ao contrário do que ocorreu no presente trabalho com o óleo de citronela, pesquisas de Vunda (2011) comprovaram que os óleos essenciais de *Croton ericoides*, *C. pallidulus* e *C. isabelli*, nas concentrações de 10; 5,0; 2,5; 1,0 e 0,5 µg/mL, apresentam citotoxicidade (pelo método MTT) significativa em células Vero.

Devido à grande procura de compostos naturais para auxiliar na terapia de diversas doenças, há necessidade de um estudo prévio e aprofundado sobre os benefícios e os possíveis danos que os mesmos possam causar ao ser humano.

A atividade antibacteriana por si só não é o suficiente para garantir o uso dos óleos essenciais como recurso terapêutico, pois diante dos resultados discutidos, verificou-se a necessidade de avaliar e considerar a citotoxicidade dos óleos essenciais.

## 6. CONCLUSÃO

Considerando os resultados obtidos, conclui-se que o óleo essencial de citronela possui atividade antimicrobiana frente às cepas Gram-positivas.

As análises das curvas de crescimento indicaram que o óleo de citronela apresentou atividade de inibição bacteriana inicial superior quando comparado com o antibiótico de referência, vancomicina. Porém, após 24 horas, esta atividade mostrou-se reduzida, sugerindo que a temperatura de incubação alterou a ação antibacteriana do óleo, devido, muito provavelmente, a volatilidade de vários componentes do mesmo.

Os resultados de citotoxicidade indicaram que o óleo não é tóxico para as células Vero.

Embora estudos mais aprofundados sejam necessários, os resultados apresentados neste trabalho constituem uma base rica de dados referentes à atividade biológica do óleo essencial de citronela, sendo uma fonte preliminar de informações científicas importantes que podem estimular investigações futuras.

Recomenda-se a realização de mais estudos para que seja definido o grau de segurança desta matéria-prima de origem natural para o desenvolvimento de produtos farmacêuticos.

## 7. REFERÊNCIAS

- ADEMILUYI, A. O. et al. Modulatory effects of dietary inclusion of garlic (*Allium sativum*) on gentamycin-induced hepatotoxicity and oxidative stress in rats. **Asian Pac J Trop Biomed**, v. 3, n. 6, p. 470-475, 2013.
- AGRA, M. F., FRANÇA, P.F., BARBOSA-FILHO, J. M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Rev Bras Farmacogn.**, v. 17, p. 114-140, 2007.
- ALBUQUERQUE, U. P., HANAZAKI, N. As pesquisas etnodirigidas na descoberta de novos fármacos de interesse médico e farmacêutico: fragilidades e perspectivas. **Rev Bras Farmacogn**, supl. 16, p. 678-689, 2006.
- ANGÉLICO, E. C. **Avaliação das atividades antibacteriana e antioxidante de *Croton heliotropiifolius* KUNTE e *Croton blanchetianus* BAILL.** 2011. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal de Campina Grande, Patos, PB, 2011.
- ARANGO, A. C. M. et al. Citral and carvone chemotypes from the essential oils of Colombian *Lippia alba* (Mill) N.E. Brown: composition, cytotoxicity and antifungal activity. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 6, p. 878-884, 2009.
- AZEREDO, T. L. et al. Rendimento do óleo essencial de citronela (*Cymbopogon winterianus*) em função do uso de diferentes partes da planta e do acondicionamento da biomassa no extrator. In: **II Jornada Nacional da Agroindústria**, Bananeiras, 2007.
- BAGETTA, G. et al. Neuropharmacology of the essential oil of bergamot. **Fitoterapia**, v. 81, n. 6, p. 453-461, 2010.
- BAJPAI, V. K., BAEK, K. H., KANG, S. C. Control of Salmonella in foods by using essential oils: a review. **Food Research International**, v. 45, p. 722-734, 2012.
- BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 446-475, 2008.
- BALUNAS, M. J., KINGHORN, A. D. Drug discovery from medicinal plants. **Life Sciences**, v. 8, n. 5, p. 431-441, 2005.
- BANDONI, A. L., CZEPACK, M. P. **Os recursos vegetais aromáticos no Brasil.** Vitória: EDUFES, p. 624, 2008.
- BIAVATTI, M. W. et al. Ethnopharmacognostic survey on botanical compendia for potential cosmeceutic species from Atlantic Forest. **Rev Bras Farmacogn.**, v. 17, p. 640-653, 2007.
- BILLERBECK, V. G. Effects of *Cymbopogon nardus* (L.) W. Watson essential oil on the growth and morphogenesis of *Aspergillus niger*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 47, n. 1, p. 9-17, 2001.

- BIZZO, H., HOVELL, A. M. C., REZENDE, C. M. Oleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 588-594, 2009.
- BLANK, A.F. et al. Influence of season, harvest time and drying on Java citronella (*Cymbopogon winterianus* Jowitt) volatile oil. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 17, p. 557-64, 2007.
- BOMONO, R. A., SZABO, D. Mechanisms of multidrug resistance in Acinetobacter species, *Pseudomonas aeruginosa*. **Clin Infect Dis.**, v. 43, p. 49-56, 2006.
- BRANDÃO, M. G. L. et al. Medicinal plants and other botanical products from the Brazilian Official Pharmacopoeia. **Rev Bras Farmacogn**, v. 16, p. 408-420, 2006.
- BROOKER, D. J. et. al. Single case evaluation of the effects of aromatherapy and massage on disturbed behaviour in severe dementia. **Brazilian Journal of Clinical Psychology**, v. 36, p. 287-96, may. 1997.
- BRUNTON, L. L., CHABNER, B. A., KNOLLMANN, B. C. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica de Goodman & Gilman**. 12. ed. Rio de Janeiro: Mc Graw Hill, 2012.
- BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods -a review. **Int J Food Microbiol**, v. 94, p. 223-253, 2004.
- BUSH, K. et al. Tackling antibiotic resistance. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, p. 894-896, 2011.
- CABRAL, C. et al. *Otanthus maritimus* (L.) Hoffmanns. & Link as a source of a bioactive and fragrant oil. **Industrial Crops and Products**, v. 43, p. 484– 489, 2013.
- CALIXTO, J. B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America: a personal review. **J. Ethnofarmacol**, v. 100, p. 131-134, 2005.
- CAMESANO, T. A., Abu-Lail, N. I. Heterogeneity in bacterial surface polysaccharides, probed on a single-molecule basis. **Biomacromolecules**, v. 3, p. 661-667, 2002.
- CARLINI, E. A. Plants and the central nervous system. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 75, p. 501-512, 2003.
- CARMO, E. S., LIMA, E.O., SOUZA, E. L. The potential of *Origanum vulgare* L. (lamiaceae) essential oil in inhibiting the growth of some food-related aspergillus species. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, n.2, p. 362-367, 2008.
- CAROVIK-STANKO, K. et al. Composition and antibacterial activities of essential oils of seven *Ocimum* taxa. **Food Chemistry**, v. 119, p. 196-201, 2010.

CARVALHO JR., P. M. et al. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Cordia verbenaceae* D.C. **J Ethnopharmacol.**, v. 95, p. 297-301, 2004.

CASSONE, M., OTVOS, L. J. R. Synergy among antibacterial peptides and between peptides and small-molecule antibiotics. **Expert Rev Anti Infect Ther.**, n. 8, p. 703-16, 2010.

CASTAGNINO, G. L. B., ORSI, R. O. Produtos naturais para o controle do ácaro *Varroa destructor* em abelhas africanizadas. **Pesq. agropec. bras.**, v. 47, n. 6, 2012.

CASTRO, H. G. et al. Crescimento, teor e composição do óleo essencial de *Cymbopogon nardus* (L.). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 9, n. 4, p. 55-61, 2007.

CASTRO, R. D., LIMA, E. O. Atividade antifúngica in vitro do óleo essencial de *Eucalyptus globulus* L. sobre *Candida spp.* **Revista De Odontologia da UNESP**, v. 39, n. 3, p. 179-184, 2010.

ÇETIN, B., CAKMAKCI, S., CAKMAKCI, R. The investigation of antimicrobial activity of thyme and oregano essential oils. **Turk J Agric For**, v. 35, p. 145-154, 2011.

CIMANGA, K. et al. Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 79, p. 213–220, 2002.

**CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE/ CLSI.** Performance standards for antimicrobial disk susceptibility testing. Approved standard M100-S17, ed. 17, Wayne, PA, 2007.

CLANCY, K. W., MELVIN, J. A., MCCAFFERTY, D. G. Sortase transpeptidases: insights into mechanism, substrate specificity, and inhibition. **Biopolymers**, v. 94, p. 385-96, 2010.

CORRÊA, M. F. P., MELO, G. O., COSTA, S. S. Natural products from plant origin potentially useful in the asthma therapy. **Rev. bras. farmacogn.**, v. 18 supl. 0, 2008.

COSTA, L. C. B. et al. Secagem e fragmentação da matéria seca no rendimento e composição do óleo essencial de capim-limão. **Hortic. Bras.**, v. 23, n. 4, p. 956-959, 2005.

COSTA, C. M. G. R. et al. Óleo essencial de citronela no controle da bactéria fitopatogênica *Erwinia carotovora*. **Tecnol. & Ciên. Agropec.**, v. 2., n. 2, p. 11-14, 2008.

COWAN, M. M. Plant products as antimicrobial agents. **Clin Microbiol Ver**, v. 12, p. 564-582, 1999.

DI PASQUA, R. et al. Changes in the proteome of *Salmonella enterica* serovar Thompson as stress adaptation to sublethal concentrations of thymol. **Proteomics**, v. 10, n. 5, p. 1040-9, 2010.

DORMAN, H.J.D., DEANS, S.G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plants volatile oils. **Journal of Applied Microbiology**, n. 88, p. 308-316, 2000.

DUARTE, M.C.T. Atividade antimicrobiana de plantas medicinais e aromáticas utilizadas no Brasil. **Multi-Ciência**, v. 7, p. 17, 2006.

DUARTE, M. C. T. et al. Activity of essential oil from Brazilian medicinal plants on *Escherichia coli*. **J. Ethnopharmacol**, v. 111, p. 197-201, 2007.

EDRIS, A. E. Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: a review. **Phytotherapy Research**, v. 21, n. 4, p. 308- 23, 2007.

ERSON, K. L. Is bacterial resistance to antibiotic an appropriate example of evolutionary change? **CRSQ**, v. 41, p. 318-26, 2005.

EVANS, W. C. Orders and families of medicinal plants. **Pharmacognosy**, ed. 4, 1996.

FERREIRA, B.L.A. **Compostos sintéticos: identificação da atividade antibacteriana na perspectiva de formação de nanopartículas**. 2010. Tese de Doutorado, Niterói, 2010.

FERRONATTO, R. et al. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais produzidos por *Baccharis dracunculifolia* D.C. e *Baccharis uncinella* D.C. (Asteraceae). **Rev. bras. farmacogn.**, v. 17, n. 2, 2007.

FIGUEIREDO, A. C. et al. Factors affecting secondary metabolite production in plants: volatile components and essential oils. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 23, n. 4, p. 213-26, 2008.

FLUHR, J. W., DEGITZ K. Antibiotics, azelaic acid and benzoyl peroxide in topical acne therapy. **J Dtsch Dermatol Ges.**, v. 1, p. 24-30, 2010.

FLUIT, A. C., SCHMITZ, F. J. Resistance integrons, super-integrons. **Clin. Microbiol. Infect.**, v. 10, p. 272–88, 2004.

FRANCISCO, V. et al. *Cymbopogon citratus* as source of new and safe anti-inflammatory drugs: bio-guided assay using lipopolysaccharide-stimulated macrophages. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 133, 2011.

FRANZ, C. M. Essential oil research: past, present and future. **Flavour Fragrance Journal**, v. 25, p. 112-113, 2010.



FREITAS, C.C. O fenômeno da tolerância bacteriana aos antibióticos. **J Bras. Doenças Sex. Transm.**, v. 1, n. 3, p. 103-108, 1989.

GALINDO, L. A., PULTRINI, A. M., COSTA, M. Biological effects of *Ocimum gratissimum* L. are due to synergic action among multiple compounds present in essential oil. **Journal of Natural Medicines**, v. 64, n. 4, p. 436-41, 2010.

GARCIA, R. G., MALO, A. L., PALOU, E. Bactericidal action of binary and ternary mixtures of carvacrol, thymol, and eugenol against *Listeria innocua*. **Journal of Food Science**, v. 76, p. 95–100, 2011.

GEORGE, D. R. et al. Environmental interactions with the toxicity of plant essential oils to the poultry red mite *Dermanyssus gallinae*. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 24, p. 1–8, 2010.

GOLD, H. S., MOELLERING, R. C. Jr. Antimicrobial-Drug Resistance. **N Engl J Med.**, v. 355, n. 19, p. 1445-53, 1996.

GOÑI, P. et al., Antimicrobial activity in the vapour phase of a combination of cinnamon and clove essential oils. **Food Chemistry**, v. 116, p. 982–989, 2009.

GRAHAME-SMITH, D. G., ARONSOM, J. K. **Tratado de Farmacologia Clínica e Farmacoterapia**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

GREAY, S. J., HAMMER, K. A. Recent developments in the bioactivity of mono- and diterpenes: anticancer and antimicrobial activity. **Phytochemistry Reviews**, abr. 2011.

HALBERSTEIN, R. A. Medicinal plants: historical and cross-cultural usage patterns. **Annals of Epidemiology**, v. 15, n. 9, p. 686-99, 2005.

HAMDAN, J. S., HAHN, R. C. Antifungal drugs for systemic mycosis: an overview of mechanism of action and resistance. **Anti-Infective agents in Medicinal Chemistry**, v. 5, n. 4. p. 1-10, 2006.

HAMMER, K.A, CARSON,C.F, RILEY, T.V. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. **Journal of Applied Microbiology**, v. 86, n. 6, p. 985-90, 1999.

HAWKEY, P. M. The origins and molecular basis of antibiotic resistance. **BMJ**, v. 317, p. 657-660, 1998.

HOIBY, N. et al. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. **Int J Antimicrob Agents**, v. 35, p. 322-32, 2010.

HOOPER, D. C. Pumps, nosocomial antibiotic resistance: a primer for hospital epidemiology. **Clin Infect Dis.**, v. 40, p. 1811-17, 2005.

HYDER, S. L., STREITFELD, M. M. Transfer of erythromycin resistance from clinically isolated lysogenic strains of *Streptococcus pyogenes* via their endogenous phage. **J Infect Dis.**, v. 138, p. 281-286, 1978.

JACOBY, G. A. Mechanisms of resistance to quinolones. **Clin Infect Dis.**, v. 41, p. 120-26, 2005.

JEFFERSON, K. K. What drives bacteria to produce a biofilm? **FEMS Microbiology Letters**, v. 236, ed. 6, p. 163–173, 2004.

JONES, R. N. Microbiological features of vancomycin in the 21st century: minimum inhibitory concentration creep, bactericidal/ static activity, and applied breakpoints to predict clinical outcomes or detect resistant strains. **Clin Infect Dis.**, v. 42, n. 1, p. 13-24, 2006.

JUSTO, O. R. et al. Evaluation of the antioxidant potential of plant extracts obtained by supercritical fluid extraction. **Quím. Nova**, v. 31, n.7, 2008.

KAVOOSI, G., ROWSHAN, V. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of essential oil obtained from *Ferula assa-foetida* oleo-gum-resin: Effect of collection time. **Food Chemistry**, v. 138, p. 2180–2187, 2013.

KHUNKITTI, W. In vitro antimicrobial and antioxidant activities of some *Cymbopogon* species. In: Anand, A. (Ed.), *Essential Oil-Bearing Grasses: The genus Cymbopogon*. **CRC Press Inc.**, USA, p. 167–183, 2010.

LACEY, R. W. Antibiotic Resistance plasmids of *Staphylococcus aureus* and their clinical importance. **Bacteriol Rev.**, v. 39, p. 1-32, 1975.

LAMBERT, R. J. W. et al. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. **Journal of Applied Microbiology**, v. 91, p. 453–462, 2001.

LECHENER, S.; LEWIS, K.; BERTRAN, R. *Staphylococcus aureus* Persists Tolerant to Bactericidal Antibiotics. **J Mol Microbiol Biotechnol**, v. 22, p. 235–244, 2012.

LI, J. W. H., VEDERAS, J. C. Drug discovery and natural products: end of an era or an endless frontier? **Science**, v. 325, n. 5837, p. 161-65, 2009.

LORENZI, H., MATOS, F. J. A. **Plantas Medicinais no Brasil: Nativas e Exóticas**. 2. ed. Nova Odessa, S.P.: Instituto Plantarum, p. 512, 2008.

MAJIDUDDIN, F. K., MATERON, I. C., PALZKILL, T. G. Molecular analysis of beta-lactamase structure and function. **Int J Med Microbiol.**, v. 292, p. 127-37, 2002.

MANSOUR, M. B. et al. Chemical composition, angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory, antioxidant and antimicrobial activities of the essential oil from south Tunisian *Ajuga pseudoiva* Rob. Lamiaceae. **Process Biochemistry**, Journal homepage: [www.elsevier.com/locate/procbio](http://www.elsevier.com/locate/procbio), 2013.

- MARCO, C. A. et al. Características do óleo essencial de capim-citronela em função de espaçamento, altura e época de corte. **Horticultura Brasileira**, v. 25, n. 3, p. 429-432, 2007.
- MARCO, C. A. et al. Influência de espaçamento, altura e época de corte no rendimento a biomassa e óleo essencial na cultura de capim citronela (*Cymbopogon winterianus* Jowitt.). **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v.37, n.1, p.32-36, 2006.
- MARTINS, A. G. L. A. et al. Antibacterial activity of essential basil oil against serogroups of enteropathogenic *Escherichia coli* isolated from lettuce. **Cienc. Rural**, v. 40, n.8, 2010.
- MARTINS, E. R., et al. **Plantas Medicinais**, p. 220, Viçosa: UFV, 2000.
- MARTOS, M. V. et al. In vitro antioxidant and antibacterial activities of essential oils obtained from Egyptian aromatic plants. **Food Control**, v. 22, p. 1715-1722, 2011.
- MCGOWAN, J.E. Economic impact of antimicrobial resistance. **Emerg Infect Dis**, v. 7, n. 2, 2001.
- MENDES, L.P.M. et al. Atividade Antimicrobiana de Extratos Etanólicos de *Peperomia pellucida* e *Portulaca pilosa*. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 32, n.1, p. 121-125, 2011.
- MENDONÇA, A. E. et al. Study of antibiotics prescriptions tendencies for elderly inpatients concerning the rational drug use perspective. **HU Revista**, v. 35, p. 81-87, 2009.
- MEURE, L. A., FOSTER, N. R., DEGHANI, F. Conventional and dense gas techniques for the production of liposomes. **AAPS PharmSciTech**, v. 9, p. 798-809, 2008.
- MIN, L. I. et al. Gram Positive Three-component Antimicrobial Peptide-sensing System. **PNAS**, v. 104, p. 9469-74, 2007.
- MOELLERING, R. C. Jr. Interaction between antimicrobial consumption and selection of resistant bacterial strains. **Scand J Infect Dis Suppl.**, v. 70, p. 18-24, 1990.
- MONTANARI, C. A., BOLZANI, V. S. Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 105-111, 2001.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods**, Dec v. 16; n. 65, p. 55-63, 1983.
- MURRAY, B. E.; MOELLERING R.C. JR. Patterns and mechanisms of antibiotic resistance. **Med Clin North Am.**, v. 62, p. 899-923, 1978.

- NASCIMENTO, G. G. F. et al. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 31, n. 2, p. 247-256, 2000.
- NEU, H. C. The crisis in antibiotic resistance. **Med Sci**, v. 257, p. 1064-77, 1992.
- NEWMAN, D. J. Natural products as leads to potential drugs: an old process or the new hope for drug discovery? **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 51, n. 9, p. 2589-99, 2008.
- NICOLINI, P. et al. Fatores relacionados à prescrição médica de antibióticos em farmácia pública da região da região Oeste da cidade de São Paulo. **Ciência e Saúde Coletiva**, v. 13, p. 689-696, 2008.
- NIKAIDO, H. Preventing drug access to targets: cell surface permeability barriers, active efflux in bacteria. *Semin. Cell Dev. Biol.*, v. 12, p. 215–23, 2001.
- NIEDERMAN, M. S. Principles of appropriate antibiotic use. **Int J Antimicrob Agents**, v. 26, p. 170-175, 2005.
- NIRMAL, S. A., GIRME, A. S., BHALKE, R. D. Major constituents and antihelmintic activity of volatile oils from leaves and flowers of *Cymbopogon martini* Roxb. **Natural Product Research**, v. 21, 2007.
- ODONKOR, S., ADDO, K. Bacteria resistance to antibiotics: recent trends and challenges. **International Journal of Biological & Medical Research**, v. 2, p. 1204-1210, 2011.
- OKOH, O. O., SADIMENKO, A. P., AFOLAYAN, A. J. Comparative evaluation of the antibacterial activities of the essential oils of *Rosmarinus officinalis* L. obtained by hydrodistillation and solvent free microwave extraction methods. **Food Chemistry**, v. 120, p. 308-312, 2010.
- OLIVEIRA, A. C., SILVA, R. S. Desafios do cuidar em saúde frente à resistência bacteriana: uma revisão. **Revista Eletrônica de Enfermagem**, v. 10, n. 1, p. 189-197, 2008.
- OLIVEIRA, G. A. et al. Avaliação da tolerância à vancomicina em 395 cepas hospitalares de *Staphylococcus aureus* resistentes à oxacilina. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, v. 37, n. 4, 2001.
- ORAFIDIYA, L. O. et al. Studies on the acute and sub-chronic toxicity of the essential oil of *Ocimum gratissimum* L. leaf. **Phytomedicine**, v. 11, p. 71-76, 2004.
- OUSSALAH, M. et al. Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. **Food Control**, v. 18, p. 414-20, 2007.

PANDEY, A. K., RAI, M. Antimycotic potential in some naturally occurring essential oils. **London: Food Products Press**, n. 13, p. 344-345, 2003.

PARREIRA, N. A. et al. Antiprotozoal, schistosomicidal, and antimicrobial activities of the essential oil from the leaves of *Baccharis dracunculifolia*. **Chemistry and Biodiversity**, v. 7, p. 993-1001, 2010.

PATTNAIK, S. et al. Antimicrobial activity of oils from *Cymbopogon* inter and intraspecific differences. **Microbios**, v. 84, p. 239–245, 1995.

PELLISSARI, G. P. et al. Atividade antibacteriana do óleo essencial de *Melampodium divaricatum* (Rich.) DC., Asteraceae. **Rev. bras. farmacogn.**, v. 20, n. 1, p. 70-74, 2010.

PEREIRA, F.O. **Atividade Antifúngica do óleo essencial *Cymbopogon winterianus* Jowitti ex Bor sobre dermatófitos do gênero *Trychophyton***. 2009. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2009.

PERESI, J. T. M. et al. Susceptibilidade Antimicrobiana de cepas de *Staphylococcus aureus* e *Salmonella* spp. Isoladas de alimentos envolvidos em surtos de doenças bacterianas transmitidas por alimentos, ocorridos na região noroeste do Estado de São Paulo, no período de abril de 1990 a dezembro de 2003. **Instituto Adolf Lutz**. Disponível em: <http://www.ial.sp.gov.br/publicação/biblioteca> acesso em: 6 de julho de 2012. Publicação on-line, 2007.

PEREZ-TRALLERO, E., IGLESIAS, L. Tetracyclines, sulfonamides and metronidazole. **Enferm Infecc Microbiol Clin**, v. 21, p. 520–29, 2003.

PÉRICHON, B., COURVALIN, P. *Staphylococcus aureus* VRSA-11B is a constitutive vancomycin-resistant mutant of vancomycin-dependent VRSA-11A. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 56, n. 9, p. 4693-4696, 2012.

PIARU, S. P, MAHMUD, R., PERUMAL, S. Detremination of antibacterial activity of essential oil of *Myristica fragrans* Houtt. using tetrazolium microplate assay and its citotoxic activity against Vero cell line. **International Journal of Pharmacology**, v. 8, n. 6, p. 572-576, 2012.

QIU, J. et al. Subinhibitory concentrations of perilla oil affect the expression of secreted virulence factor genes in *Staphylococcus aureus*. **PLoS ONE**, v. 6, n. 1, 2011.

QUINTAS-JÚNIOR, L. J. et al. Carvacrol, (-)-borneol and citral reduce convulsant activity in rodents. **Afr. J. Biotechnol**, v. 9, p. 6566-6572, 2010.

\_\_\_\_\_. Phytochemical screening and anticonvulsivant activity of *Cymbopogon winterianus* Jowitt (Poaceae) leaf essential oil in rodents. **Phytomedicine**, v. 15, p. 619-624, 2008.

- RAJKUMAR, S., JEBANESAN, A. Chemical composition and larvicidal activity of leaf essential oil from *Clausena dentata* (Willd) M. Roam. (*Rutaceae*) against the chikungunya vector, *Aedes aegypti* Linn. (Diptera: *Culicidae*). **Journal of Asia-Pacific Entomology**, v. 13, p. 107-109, 2010.
- RASHID, S. et al. Chemical composition, antimicrobial, cytotoxic and antioxidant activities of the essential oil of *Artemisia indica* Willd. **Food Chemistry**, v. 138, p. 693–700, 2013.
- RASKIN, I. et al. Plants and human health in the twenty-first century. **Trends in Biotechnology**, v. 20, n. 12, p. 522-31, 2002.
- RATES, S. M. K. Plants as source of drugs. **Toxicon**, v. 39, p. 603- 613, 2001.
- RAVAT, F. et al. Antibiotics and the burn patient. **SFETB .Burns**, v. 5, p. 20510-518, 2010.
- REIS, G. G. et al. Estudo do efeito da secagem em convecção naturaç e forçada na comporsição do óleo essencial de citronela (*Cymbopogon nardus*). **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, Botucatu, v. 8, n. 4, p. 47-55, 2006.
- ROCHA, S.F.R., MING, L. C., MARQUES, M. O. M. The influence of drying temperature on the yield composition of citronella (*Cymbopogon winterianus* Jowitt) essential oil. **Revista Brasileira Plantas Medicinai**s, v. 3, p. 73–78, 2000.
- ROLAIN, J. M., RAULT D. Genome comparison analysis of molecular mechanisms of resistance to antibiotics in *Richettsia* genus. **Ann N Y Acad Sci.**, n. 1063, p. 222-30, 2005.
- ROUVEIX, B. Clinical Implications of Multiple Drug Resistance Efflux Pumps of Pathogenic Bacteria. **J Anti Chem.**, v. 59, p. 1208-09, 2007.
- RUA, J. et al. Antibacterial activity against foodborne *S. aureus* and antioxidant capacity of various pure phenolic compounds. **Foodborne Pathogen and Diseases**, v. 8, p. 149–157, 2011.
- SADER, H. S. et al. Oxacilin and quinolone resistant *Staphylococcus aureus* in São Paulo, Brazil: a multicenter molecular epidemiology study. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 14, n. 5, p. 260-264, 1993.
- SAHOO, S., DEBATA, B. K. Recent advances in breeding and biotechnology of aromatic plants: *Cymbopogon* species. **Plant Breeding Abstracts**, v. 65, n. 12, 1995.
- SANTOS, A. P. et al. Composição química, atividade antimicrobiana do óleo essencial e ocorrência de esteróides nas folhas de *Pterodon emarginatus* Vogel, Fabaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 6, p. 891-896, 2010.
- SANTOS, F. S., NOVALES, M. G. M. Essential oils from aromatic herbs as antimicrobial agents. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 23, p. 1-6, 2011.

- SANTOS, F. S., NOVALES, M. G. M. , Essential oils from aromatic herbs as antimicrobial agents. **Current in Opinion Biotechnology**, v. 23, p. 136–141, 2012.
- SANTOS, B. R. et al. Aspecto da anatomia e do óleo essencial em folhas de Pindaíba (*Xylopia brasiliensis* Spreng.). **Ciênc. Agrotec.**, Lavras, v. 28, n. 2, p. 345-34, 2004.
- SANTURIO, D. F. et al. Antimicrobial activity of spice essential oils against *Escherichia coli* strains isolated from poultry and cattle. **Cienc. Rural**, v. 41 n. 6, 2011.
- SEPUTIENE, V. et al. Tigecycline - how powerful is it in the fight against antibiotic-resistant bacteria? **Medicina** (Kaunas), v. 53, p. 152-55, 2010.
- SHASANY, A. K. et al. Phenotypic and RAPD diversity among *Cymbopogon Winterianus* Jowitt accessions in relation to *Cymbopogon nardus* Rendle. **Genetic Resources and Crop Evolution**, Holanda, v. 47, n. 5, p. 553-559, 2000.
- Si, W. et al. Antimicrobial activity of essential oils and structurally related synthetic food additives towards selected pathogenic and beneficial gut bacteria. **J. Appl. Microbiol.**, v. 100, p. 296-305, 2006.
- SILVA, A. R. **Tudo sobre aromaterapia**. Sao Paulo: Roca, p. 624, 1998.
- SILVA, L. L. S. et al. Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos de *Dioclea grandiflora* Mart. ex. Benth., Fabaceae. **Rev. bras. farmacogn.**, v. 20 n. 2, 2010.
- SILVA, M. E. **Avaliação da composição do óleo de citronela (*Cymbopogon winterianus* Jowitt) extraído da planta fresca e seca e da influência do período de colheita**. 2011. Monografia – Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, MG, 2011.
- SILVA, S. L. et al. Cytotoxic evaluation of essential oil from *Casearia sylvestris* Sw on human cancer cells and erythrocytes. **Acta Amazônica**. Manaus, v. 38, n. 1, p. 107-112, 2008.
- SILVESTRI, J. D. F. et al. Perfil da composição química e atividades antibacteriana e antioxidante do óleo essencial do cravo-da-índia (*Eugenia caryophyllata* Thunb.). **Rev. Ceres**, v. 57, n. 5, p. 589-594, 2010.
- SIMIC, A. et al. Essential Oil Composition of *Cymbopogon winterianus* and *Carum carvi* and Their Antimicrobial Activities. **Pharmaceutical Biology**, v. 46, n. 6, p. 437-441, 2008.
- SIMÕES, C.M.O., SPITZER, V. Óleos voláteis. In: SIMÕES, C.M.O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS/UFSC, cap. 18, 2000.

SIMÕES, M., BENNETTE, R. N., ROSA, E. A. S. Understanding antimicrobial activities of phytochemicals against multidrug resistant bacteria and biofilms. **Natural Products Report**, v. 26, n. 6, p. 746-57, 2009.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 4. ed. Porto Alegre: UFSC, p. 883, 2002.

SINHA S., BISWAS, D., MUKHERJEE, A. Antigenotoxic and antioxidant activities of palmarosa and citronella essential oils. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 137, n. 3, p. 1521-1527, 2011.

SOARES, A. K. A. et al. Avaliação da segurança clínica de um fitoterápico contendo *Mikania glomerata*, *Grindelia robusta*, *Copaifera officinalis*, *Myroxylon toluifera*, *Nasturtium officinale*, própolis e mel em voluntários saudáveis. **Rev Bras Farmacogn.**, v. 16, p. 447-454, 2006.

SRINIVASAN, A., DICK, J. D., PERL T. M. Vancomycin Resistance in *Staphylococci*. **Clin Microb.**, v. 48, p. 430-38, 2002.

STEFFENS, A. H. **Estudo da composição química dos óleos essenciais obtidos por destilação por arraste a vapor em escala laboratorial e industrial**. 2010. **Dissertação** (Mestrado em Engenharia e Tecnologia de Materiais) – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

TANU, P. A., ADHOLEYA, A. Effect of different organic manures/composts on the herbage and essential oil of *Cymbopogon winterianus* and their influence on the native AM population in a marginal alfisol. **Bioresource Technology**, v. 92, p. 311-319, 2004.

TAVARES, I. B. **Propagação vegetativa, adubação orgânica e idades de colheita de quimiotipos de erva-cidreira [*Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown]**. 2009. **Dissertação** (Mestrado em Produção Vegetal) – Universidade Federal do, Tocantins, Gurupi, Tocantins, jul. 2009.

TAVARES, W. **Manual de Antibióticos e Quimioterápicos Antiinfeciosos**. Atheneu, 2. ed., São Paulo, 1996.

TAWATSIN, A. et al. Repellency of volatile oils from plants against three mosquito vectors. **Journal of Vector Ecology**, v. 26, n. 1, p. 76-82, 2001.

TORTORA, G. J., FUNKE, B. R., CASE, C.L. **Microbiologia**, 6. ed., Ed. Artmed, Porto Alegre, 2005.

TOWNER, K. J. **The problem of resistance**. In: David Greenwood; Antimicrobial Chemotherapy, Ed. 3. Oxford University Press. Oxford, 1997.

TRABULSI, L. R. et al. **Microbiologia**. Atheneu, 3. ed., p. 586, São Paulo, 1999.



TROMBETTA, D. et al. Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 6, p. 2474-2478, 2005.

UNLU, M. et al. Composition, antimicrobial activity and in vitro cytotoxicity of essential oil from *Cinnamomum zeylanicum* Blume (Lauraceae). **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, p. 3274-3280, 2010.

VALDIR, F., VEIGA JR., ANGELO, C.P. PLANTAS MEDICINAIS: CURA SEGURA? **Quim. Nova**, v. 28, n. 3, p. 519-528, 2005.

VALGAS, C. et al. Screening methods to determine antibacterial activity of natural products. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 369-380, 2007.

VALADARES, M. C., CASTRO, N., C., CUNHA, L. C. *Synadenium umbellatum*: citotoxicidade e danos ao DNA de células da medula óssea de camundongos. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 43, n. 4, 2007.

VEIGA JR. V. F. Estudo do consumo de plantas medicinais na Região Centro-Norte do Estado do Rio de Janeiro: aceitação pelos profissionais de saúde e modo de uso pela população. **Rev Bras Farmacogn**, v. 18, p. 308-313, 2008.

VIGIL, A.L.M. et al. **Methods for activity assay and evaluation of results**. In *Antimicrobial in Food*, (P.M. Davidson, J.N. Sofos and A.L. Barnen, eds.), 3. ed, p. 659–680, CRC, Taylor and Francis, New York, NY, 2005.

VIKSVEEN, P. Antibiotics and The Development of Resistent Microorganisms. Can Homeopathy be an Alternative? **Journal of Homeopathy**, v. 92, p. 99-107, 2003.

VUNDA, S. L. A. L. **Estudo químico e biológico de species de *Croton* (Euphorbiaceae) nativas do Rio Grande do Sul**. 2011. Tese de Mestrado, Porto Alegre, 2011.

XING, Y. et al. Antifungal activities of clove against *Rhizopus nigricans*, *Aspergillus flavus* and *Penicillium citrinum* in vitro and in wounded fruit test. **Journal of Food Safety**, v. 32, p. 84-93, 2012.

ZUZARTE, M. et al. Lavandula luisieri essential oil as a source of antifungal drugs. **Food Chemistry**, v. 135, p. 1505-1510, 2012.

WANNES, W. A. et al. Antioxidant activities of the essential oils and methanol extracts from myrtle (*Myrtus communis* var. *italica* L.) leaf, stem and flower. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, n. 5, p. 1362-1370, 2010.

WARDAL, E., SADOWY, E., HRYNIEWICZ, W. Complex nature of enterococcal pheromone-responsive plasmids. **Pol J Microbiol.**, v. 59, p. 79-87, 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Regulatory situation of herbal medicines. A worldwide review, Geneva, 1998.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO Health, Geneve: Site do WHO. <http://www.who.int/en>. Acessado em maio de 2012.

\_\_\_\_\_. WHO Health, Geneve: Site do WHO, <http://www.who.int/en>. Acessado em outubro de 2011.