

AVALIAÇÃO ANTIFÚNGICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Cymbopogon citratus* FRENTE A CEPAS HOSPITALARES DE LEVEDURAS DO GÊNERO *Candida*

Fernando de Sá Silva¹, Tatiane M. Ferreira², Milton Beltrame³, Sônia Khouri⁴

¹Universidade do Vale do Paraíba/Laboratório de Microbiologia, tati.bio@ig.com.br

²Universidade do Vale do Paraíba/Laboratório de Microbiologia, f2sb@hotmail.com.br

³Universidade do Vale do Paraíba/Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento/Laboratório de Síntese Orgânica, beltrame@univap.br

⁴Universidade do Vale do Paraíba/Laboratório de Microbiologia, soniak@univap.br

Resumo- Nos últimos anos, têm-se observado um aumento de resistência e infecções hospitalares ocasionadas por leveduras pertencentes ao gênero *Candida*. Assim, vários trabalhos vêm sendo realizados com produtos vegetais, com intuito de obter novos princípios ativos, para uma possível aplicação clínica. Neste trabalho foi realizada a avaliação da atividade antifúngica do óleo essencial obtido de *Cymbopogon citratus* contra cepas hospitalares de leveduras do gênero *Candida*. Os ensaios microbiológicos foram realizados *in vitro* contra 28 cepas de *Candida albicans* e 16 cepas de *Candida tropicalis*. Foi utilizado o método de difusão em ágar (cavidade/placa). O óleo essencial foi extraído das folhas frescas de *C. citratus* através da destilação com arraste de vapor. O óleo essencial de *C. citratus* apresentou atividade antifúngica em 100% das cepas de ambas as espécies de *Candida*, mostrando bons resultados da ação antifúngica do óleo essencial.

Palavras-chave: *Candida* spp, levedura, *Cymbopogon Citratus* e infecção hospitalar

Área do Conhecimento: IV - Ciências da Saúde

Introdução

A partir da década de 1970, observou-se um aumento na incidência de infecções sistêmicas graves, relacionado às micoses, tendo como fatores de predisposição o uso disseminado de antibióticos de amplo espectro, agentes imunossupressores, transplantes, procedimentos invasivos, o próprio ambiente hospitalar contaminado, neoplasias, diabetes e, recentemente, o surgimento da AIDS [1 e 2].

Candida spp, foi o quarto maior isolado de infecção sanguínea nosocomial registrado pelo SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (dados que abrangem até 1999), precedido apenas por *Staphylococcus aureus* [3].

Num levantamento realizado no período de 1997 a 1999, por Pfaller et al. (2001), que abrangeu 71 centros médicos em quatro regiões (América Latina, Canadá, Europa e EUA), observou-se a predominância de *Candida albicans* entre 45% a 60% de todas as infecções sanguíneas. Já *Candida tropicalis*, junto a *Candida parapsilosis*, tem sido a segunda espécie mais isolada, principalmente nos centros médicos da Europa e América Latina [3]. Resultados semelhantes em hospitais brasileiros foram observados por Colombo et al. (1999) [4].

Atualmente, além da toxicidade promovida pelos antifúngicos, um número cada vez maior de cepas de várias espécies de *Candida* está se tornando resistente a estes fármacos [3 e 6]. Com isso vários trabalhos tem sido desenvolvidos com

produtos de origem vegetal, no sentido de avaliar a sensibilidade dos microrganismos considerados de alta patogenicidade e resistência [7].

Pertencente à família Poaceae e originária da Índia, *Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf, conhecido popularmente no Brasil como capim-santo [8], é uma erva perene, ereta, de 0,60 a 2 m de altura com folhas esverdeadas, aromáticas, estreitas, longas, paralelinérvias partindo da base [8, 9]. Suas folhas a muito tempo são consumidas pela população na forma de chá ou infusão. O seu principal emprego está relacionado no alívio de pequenas cólicas uterinas e intestinais, má digestão, flatulência, no tratamento de insônia, nervosismo, além de produzir efeitos antitérmico, antiespasmódico e diurético [10, 11].

Dentre as inúmeras atividades farmacológicas atribuídas ao *C. citratus*, destaca-se a atividade antifúngica. Tal atividade está relacionada ao óleo essencial, princípio odorífero da planta, contido em suas folhas. Porém, poucos trabalhos têm sido realizados em relação à avaliação da ação antifúngica do óleo essencial de *C. citratus* contra leveduras do gênero *Candida*. Contudo, tem sido relatado que pequenas concentrações do óleo essencial promovem excelentes efeitos em cepas de distintas espécies de *Candida* obtidas de ambiente hospitalar [7].

Mishra e Dubey, em 1994, demonstraram que o óleo essencial foi ativo contra 47 espécies de fungos, incluindo *Candida* sp [12]. Resultados promissores contra fungos filamentosos [13] e bactérias [14], também foram evidenciados.

Diante das perspectivas oferecidas pela ação antifúngica do óleo essencial de *C. citratus*, e frente ao aumentando da resistência e incidência das infecções hospitalares por *Candida*, há grande interesse em desenvolver novos antifúngicos, eficientes, com baixa toxicidade e custo acessível. Desta forma o objetivo do presente trabalho foi avaliar a atividade antifúngica do óleo essencial de *C. citratus* contra cepas hospitalares de *C. albicans* e *C. tropicalis*.

Materiais e Métodos

A coleta das folhas de *Cymbopogon citratus* foi feita no Horto Medicinal da Universidade de Taubaté (UNITAU), Taubaté – SP, no dia 01 de março de 2005, no período da manhã, cortadas a uma altura de 20 a 30 cm a partir do solo [15]. A espécie foi identificada pela Dra Liliana Auxiliadora Avelar Pereira Pasin, no Núcleo de Estudos Botânicos do Centro de Estudos da Natureza (CEN), Universidade do Vale do Paraíba (UNIVAP), São José dos Campos – SP.

O processo de obtenção do óleo essencial, realizado no Laboratório de Síntese Orgânica do IP&D – UNIVAP, seguiu o método direto por destilação com arraste de vapor [16]. Foram utilizadas 100 g de folhas frescas picadas para 1500 ml de água destilada. O óleo foi separado da água utilizando acetato de etila; e seco com sulfato de magnésio anidro (MgSO₄). A solução foi filtrada, vaporada para a remoção do solvente, pesada e armazenada a 4 °C.

As concentrações de óleo essencial foram preparadas através da diluição em óleo vegetal (óleo de amêndoa), nas concentrações de 10 %, 15 %, 25 %, 35 %, 50 % e 60 %, armazenados em epindorfs a 4 °C. O controle positivo usado foi o Nitrato de Miconazol.

Foram estudadas 44 amostras de leveduras pertencentes ao Instituto Adolfo Lutz (IAL), coletadas, entre 2002 e 2003, apenas de pacientes com suspeita clínica de infecção hospitalar, no Hospital Universitário de Taubaté (HUT). A cepa padrão utilizada foi *C. albicans* ATCC 10231. As leveduras estão armazenadas em tubos inclinados em meio Sabouraud, no laboratório de Microbiologia da Faculdade de Ciências da Saúde – UNIVAP, onde foram realizados os testes de sensibilidade.

A avaliação da atividade antimicrobiana foi feita pelo método de difusão em ágar Cavidade – Placa. Placas de antibiograma foram inoculadas com 1 ml da suspensão do microrganismo, preparada em solução fisiológica a 0,9% e padronizada em 0,5 da escala de MacFarland. Em seguida, foi adicionado 70 ml do meio ágar Sabouraud dextrose – Difco Laboratórios Ltda. Após a solidificação do meio, em temperatura ambiente, foram feitos poços, onde 20 µl de cada

concentração do extrato e controle, foram pipetados. A seguir as placas foram incubadas a 37°C, durante 48 horas. Decorrido o período de incubação, foi realizado a leitura dos diâmetros dos halos de inibição em milímetros.

Resultados

Todo o processo de extração do óleo essencial foi feito em onze repetições, tendo obtido no total 6,1 g do óleo, utilizando 1100 g de folha frescas de *C. citratus*. Em média, foi obtida 0,55 g por extração, ou seja, um rendimento de 0,55% de óleo em 100 g de folhas.

Tabela 1- Halos de inibição (mm) dos testes de atividade antifúngica do óleo essencial de *C. citratus* (20 µl) contra cepas hospitalares de *C. albicans*.

Cepa nº	Concentrações (%)						NM
	10	15	25	35	50	60	
ATCC 10231	10	13	20	26	28	30	37
08	0	8	13	15	17	17	28
20	0	8	14	≥	≥	≥	38
24	15	15	18	21	26	32	42
25	0	12	16	19	21	30	34
27	0	0	18	22	24	24	45
29	0	0	15	20	21	23	42
30	0	0	16	19	21	23	39
31	0	0	15	19	26	29	30
34	0	0	19	22	24	27	32
35	0	0	16	18	21	21	40
46	0	0	18	25	32	38	50
55	0	0	17	21	34	36	45
56	0	0	16	18	21	23	36
60	0	9	13	≥	≥	≥	38
61	0	0	16	17	19	21	41
64	0	0	17	21	24	26	40
65	11	13	16	26	26	30	37
69	10	12	19	21	28	32	36
70	10	12	17	23	26	30	36
72	8	12	17	19	24	30	32
73	11	13	19	22	24	27	33
74	9	11	18	19	23	25	30
85	10	12	19	23	24	25	35
86	8	12	16	22	27	28	43
87	10	13	19	24	30	30	45
91	8	11	19	21	23	24	33
104	10	12	17	23	30	31	35
Média	10	12	17	21	25	27	38

NM (Nitrato de Miconazol)

≥ (valor maior ou igual ao controle)

O óleo essencial, na quantidade de 20 µl, apresentou atividade antifúngica em todas (100%) as cepas de *C. albicans* testadas (Tabela 1). Na concentração de 10% o óleo foi ativo em 46% das cepas, formando, em média, halos entre 8 a 15

mm de diâmetro. Foi observada inibição de todas as cepas a partir da concentração de 25% do óleo, onde ocorreu a formação de halos entre 13 a 20 mm. Duas cepas (nº 20 e 60), apresentaram inibição total a partir da concentração de 35%.

Em relação a *C. tropicalis*, o óleo essencial inibiu todas (100%) as cepas, apresentando boa atividade antifúngica (Tabela 2). Pode-se perceber que apenas três (19%) das dezesseis cepas sofreram inibição na concentração de 10%, formando halos entre 7 a 10 mm. Todas as cepas foram inibidas a partir da concentração de 25%, com diâmetros dos halos variando entre 11 a 14 mm. Apenas a cepa de número 09 apresentou halos com inibição maior ou igual ao controle.

Tabela 2- Halos de inibição (mm) dos testes de atividade antifúngica do óleo essencial de *C. citratus* (20 µl) contra cepas hospitalares de *C. tropicalis*.

Cepa nº	Concentrações (%)						NM
	10	15	25	35	50	60	
05	0	0	13	15	22	22	35
06	10	11	14	18	20	22	33
09	0	8	13	≥	≥	≥	32
33	0	0	13	16	18	20	35
37	8	9	13	16	19	20	31
57	0	0	12	15	17	18	29
58	0	10	14	18	20	21	33
62	0	0	13	17	24	24	31
66	0	8	11	13	15	16	29
67	0	9	13	15	17	18	30
71	0	8	14	16	18	22	27
81	0	0	12	14	17	21	33
82	0	8	11	14	17	19	33
83	7	8	12	14	18	19	32
95	0	0	13	16	20	22	32
97	0	8	13	16	18	19	33
Média	8	9	13	16	19	20	32

NM (Nitrato de Miconazol).

Discussão

O óleo essencial *C. citratus*, extraído pelo método de destilação com arraste de vapor, teve um rendimento de 0,55% de óleo em 100 g de folhas frescas. Este resultado mostrou estar de acordo com Akisue et al. (1996) que avaliou o rendimento do óleo, variando entre 0,46% a 0,86%, registrados mensalmente durante um ano, nas condições climáticas de Bragança Paulista – São Paulo [11].

Nos testes de sensibilidade, os resultados obtidos mostraram que o óleo essencial extraído foi muito eficiente frente às cepas hospitalares de *C. albicans* e *C. tropicalis*. O óleo se destacou por inibir 100% das cepas de ambas as espécies, a partir da concentração de 25%.

Apesar das poucas publicações referentes à ação antifúngica do óleo contra cepas de *Candida* de origem hospitalar, nossos resultados foram compatíveis as referências existentes. Lima e Farias (1999), demonstraram o potencial antifúngico do óleo essencial de *C. citratus*, no qual inibiu o crescimento de todas as cepas hospitalares do gênero *Candida* testadas, entre estas, *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. stellatoidea*, *C. pseudotropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* e *C. guilliermond* [7]. Resultados semelhantes foram obtidos por Carmo et al. (1998), onde 9 de 10 cepas, isoladas de pacientes com AIDS, foram sensíveis a ação antifúngica do óleo [17].

Em nossos resultados, pode-se perceber variações nos halos de inibição, principalmente se tratando de *C. albicans*, sendo bem evidenciado nas altas concentrações do óleo (60%), onde ocorreram halos de inibição entre 17 a 38 mm de diâmetro, o que foi evidenciado também em relação ao controle, com halos entre 28 a 50 mm (Tabela 1). Esta variedade é percebida com menos intensidade em relação à *C. tropicalis*, estando de acordo com Lima e Farias (1999), que obtiveram halos entre 20 a 40 mm em cepas de *Candida* [7].

Analisando separadamente nossos resultados, três cepas (duas *C. albicans* e uma *C. tropicalis*) apresentaram halos maiores ou iguais ao controle, nas concentrações acima de 15%.

Nos testes realizados por Schuck et al. (2001) o óleo essencial promoveu inibição total contra cepas de *Candida* padrão, formando halos superiores a nistatina, utilizada como controle [18].

Segundo Onawunmi (1989), a atividade antifúngica do óleo essencial de *C. citratus*, deve-se ao citral, componente majoritário do óleo [19].

Conclusão

Nosso trabalho mostrou bons resultados da ação antifúngica do óleo essencial de *C. citratus* contra cepas hospitalares de *C. albicans* e *C. tropicalis*, podendo, então, ser empregado como futuro fitoterápico em tratamento alternativo contra infecções fúngicas.

Referências

- [1] RANG, H.P. et al. **Farmacologia**. 5ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2003. 904p.
- [2] TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 4ed. São Paulo: Atheneu, 2004. 718p.
- [3] PFALLER, M.A. et al. International surveillance of bloodstream infections due to *Candida* species: Frequency of occurrence and in vitro susceptibilities to fluconazole, ravuconazole, and

voriconazole of isolates collected from 1997 through 1999 in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. **J. Clin. Microbiol.** v.39, n.9, p.3254-3259, 2001.

[4] COLOMBO, A.L. et al. High rate of non-*albicans* candidemia in Brazilian tertiary care hospitals. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.** v.34, p.281-286, 1999.

[5] *Candida*. In: ANAISSIE, E; MCGINNIS, M.R; PFALLER, M.A. **Medical Mycology**. Churchill Livingstone: Filadélfia, 2003. p.195-239.

[6] HAZEN, K.C. et al. Comparison of the susceptibilities of *candida* spp. to fluconazole and voriconazole in a 4-year global evaluation using disk diffusion. **Journal of Clinical Microbiology**. v.41, n.12, p.5623-5632, 2003.

[7] LIMA, E.O.; FARIAS, N.M.P. Atividade antifúngica de óleos essenciais, obtidos de plantas medicinais, contra leveduras do gênero *Candida*. **R Bras Ci Saúde**. v.3, n.1/3, p.51-64, 1999.

[8] CASTRO, L.O.; RAMOS, R.L.D. Principais gramíneas produtoras de óleos essenciais. **Boletim FEPRAGO**, n.2, 2003.

[9] ORTIZ, R.S.; MARRERO, G.V.; NAVARRO, A.L.T. Instructivo técnico para el cultivo de *Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf (Caña Santa). **Rev Cubana Plant Med**, v.7, n.2, p.89-95, 2002.

[10] CORTEZ, L.E.R.; JACOMOSSO, E.; CORTEZ, D.A.G. Levantamento das plantas medicinais utilizadas na medicina popular de Umuarama, PR. **Arq. Ciênc. Saúde Unipar**. v.3, n.2, p.97-104, 1999.

[11] AKISUE, G. et al. Padronização da droga e do extrato fluído de *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf. **LECTA – USF**, v.14, n.2, p.109-119, 1996.

[12] MISHRA, A. K.; DUBEY, N.K. Evaluation of some essential oils for their toxicity against fungi causing deterioration of stored food commodities. **Appl. Environ. Microbiol.** v.60, n.4, p.1101-1105, 1994.

[13] PONTES, Z.B.V. Atividade antifúngica de rodutos naturais e sintéticos sobre espécies de *Trichosporon* Behrend. 2002. 95f. Tese (Doutorado em Farmacologia) – Universidade Federal da Paraíba, 2002.

[14] 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.

[15] MARTINS, P.M. Influência da temperatura e da velocidade do ar de secagem no teor e da composição química do óleo essencial de capim-limão (*Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf). 2000. 38f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, 2000.

[16] FORTES, C.C; DALSTON, R.C.R. Manual de química orgânica experimental. Brasília, 2003. p.212.

[17] CARMO, C.M.F.; LIMA, E.O.; MILAN, E.P. Atividade antifúngica e extratos e óleos essenciais contra *Candida albicans* isolada de pacientes com AIDS. **Rev. Bras. Farm.**, v.79, n.3/4, p.108-111, 1998.

[18] SCHUCK, V.J.A. et al. Avaliação da atividade antimicrobiana de *Cymbopogon citratus*. **Rev Bras Ciênc Farm.** v.37, n.1, 2001.

[19] ONAWUNMI, G.O. Evaluation of the antifungal activity of lemon grass oil. **J. Crude Drug Res.** v.27, n.2, p. 121-126, 1989.