ARTIGO
https://doi.org/10.22239/2317-269X.02494

Avaliação da atividade antimicrobiana *in vitro* do óleo essencial livre e nanoemulsão de *Cymbopogon winterianus* frente à *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*

Evaluation of the *in vitro* antimicrobial activity of free and nanoemulsified essential oil of *Cymbopogon winterianus* against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*

Vanessa Konarzewski[I]
Simony Costa Beber[II]
Lenara Schalanski Krause[II]
Giane Engel Montagner[III]
Patrícia Gomes[III]
Christiane de Fátima Colet[II]
Keli Jaqueline Staudt[I]

[I] Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Santo Ângelo, RS, Brasil

[II] Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul (Unijuí), Ijuí, RS, Brasil

[III] Universidade Franciscana, Santa Maria, RS, Brasil

* **E-mail:** kelijaquelines@hotmail.com

Recebido: 02 maio 2025
Aprovado: 09 jun 2026

Como citar: Konarzewski V, Beber SC, Krause LS, Montagner GE, Gomes P, Colet CF, Staudt KJ. Avaliação da atividade antimicrobiana *in vitro* do óleo essencial livre e nanoemulsão de *Cymbopogon winterianus* frente à *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. Vigil Sanit Debate, Rio de Janeiro, 2026, v.14: e02494. https://doi.org/10.22239/2317-269X.02494

RESUMO

Introdução: A resistência microbiana representa um importante problema de saúde pública, impulsionando a busca por novas alternativas terapêuticas. A nanoencapsulação do óleo essencial de *Cymbopogon winterianus* surge como estratégia promissora para potencializar sua estabilidade e atividade frente a microrganismos de relevância clínica. **Objetivo:** Avaliar a atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Cymbopogon winterianus* livre e em nanoemulsão pelo método de disco-difusão e determinar a concentração inibitória mínima frente a *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. **Método:** Para determinação da menor concentração capaz de inibir o crescimento microbiano, utilizou-se a microdiluição. O teste de suscetibilidade antibacteriana foi realizado pelo método de disco-difusão, utilizando concentrações múltiplas da concentração inibitória mínima. **Resultados:** O óleo essencial, tanto livre como em nanoemulsão de citronela, apresentou uma fraca atividade antibacteriana frente a *S. aureus*, com uma concentração inibitória mínima de 2.048 µg/mL para o óleo livre e de 62.500 µg/mL para a nanoemulsão, e uma atividade moderada frente a *E. coli*, com uma concentração inibitória mínima de 512 µg/mL e 31.250 µg/mL para a nanoemulsão. Já no teste de suscetibilidade, o óleo não apresentou halo de inibição em nenhuma das concentrações testadas. **Conclusões:** O óleo essencial de citronela apresentou atividade antibacteriana *in vitro* limitada frente às cepas avaliadas, sendo observada uma eficácia melhor na forma livre em comparação à nanoemulsão. A nanoemulsão não demonstrou ganho de atividade, sugerindo que fatores relacionados à formulação e às condições experimentais podem ter influenciado seu desempenho. Esses achados indicam que, nas condições testadas, a incorporação em nanoemulsão não potencializou o efeito antimicrobiano do óleo essencial.

PALAVRAS-CHAVE: Óleos Essenciais; Ação Antimicrobiana; Citronela

ABSTRACT

Introduction: Antimicrobial resistance represents a significant public health problem, driving the search for new therapeutic alternatives. Nanoencapsulation of *Cymbopogon winterianus* essential oil emerges as a promising strategy to enhance its stability and activity against clinically relevant microorganisms. **Objective:** To evaluate the antimicrobial activity of free *Cymbopogon winterianus* essential oil and nanoemulsion using the disk diffusion method and determine the minimum inhibitory concentration against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. **Method:** To determine the lowest concentration capable of inhibiting microbial growth, microdilution was used, and the antibacterial susceptibility test was performed using the disk diffusion method, using multiple concentrations of the MIC. **Results:** The EO, both free and in citronella nanoemulsion, showed weak antibacterial activity against S. aureus, with an MIC of

2048 µg/mL for the free oil and 62,500 µg/mL for the nanoemulsion, and a moderate activity against *E. coli*, with an MIC of 512 µg/mL and 31,250 µg/mL for the nanoemulsion. In the susceptibility test, the oil did not show an inhibition halo at any concentration tested. **Conclusions:** It is concluded that citronella essential oil exhibited limited in vitro antibacterial activity against the evaluated strains, with better efficacy observed in the free form compared with nanoemulsion. The nanoemulsion did not demonstrate enhanced activity, suggesting that factors related to formulation and experimental conditions may have influenced its performance. These findings indicate that, under the tested conditions, incorporation into a nanoemulsion did not potentiate the antimicrobial effect of the essential oil.

KEYWORDS: Essential Oils; Antimicrobial Action; Citronella

INTRODUÇÃO

O aumento dos casos de resistência microbiana é considerado um problema de saúde pública, limitando a eficácia de terapias antimicrobianas convencionais e elevando taxas de morbidade, mortalidade e custos assistenciais. Muitos pesquisadores buscam o desenvolvimento de novos antimicrobianos, entretanto, as barreiras de desenvolvimento passam por longos períodos de aprovação, além de possuírem custos e elevadas taxas de insucesso e de reprovação[1].

Além disso, com o aumento da resistência dos microrganismos patogênicos a múltiplos medicamentos e a suscetibilidade da atuação sobre diversos substratos, em diferentes condições ambientais, surgem preocupações e a procura por novas alternativas terapêuticas e, com isso, a iniciativa da procura por antibióticos naturais[2].

Nesse contexto, os compostos de origem natural, especialmente os derivados de plantas medicinais, têm sido amplamente investigados como potenciais agentes antimicrobianos. Entre esses, destacam-se os óleos essenciais (OEs), que apresentam atividade antibacteriana atribuída, principalmente, à sua capacidade de interagir com a membrana celular microbiana, alterando sua permeabilidade e integridade estrutural. Estudos que foram realizados *in vitro* demonstraram que as bactérias Gram-positivas são mais sensíveis, comparadas com as Gram-negativas, quando expostas aos OEs. No entanto, apesar do potencial biológico promissor, a aplicação terapêutica dos OEs é limitada por características intrínsecas, como alta volatilidade, baixa solubilidade em meio aquoso e suscetibilidade à degradação oxidativa, fatores que comprometem sua estabilidade e eficácia[3,4].

Diante dessas limitações, o uso de sistemas nanoestruturados, como nanoemulsões, tem emergido como uma estratégia promissora para melhorar a estabilidade físico-química, a biodisponibilidade e a atividade biológica dos OEs. A redução do tamanho de gotícula aumenta a área de contato com os microrganismos, podendo potencializar a atividade antimicrobiana e favorecer a interação com estruturas celulares bacterianas[5]. Apesar desses avanços, ainda são limitados os estudos que avaliam a eficácia de nanoemulsões OEs de *Cymbopogon winterianus* (*C. winterianus*), especialmente em comparação com sua forma livre, bem como sua atuação frente a microrganismos de relevância clínica.

O *Cymbopogon winterianus,* popularmente conhecido como citronela ou capim-citronela, apresenta diversos componentes como o geraniol, citronelol e limonemo, sendo que o citronelal é conhecido por apresentar ação antimicrobiana e antifúngica[5].

Entretanto, os OEs são produtos que apresentam instabilidade, sofrendo muitas vezes oxidação. A utilização de nanotecnologia pode proporcionar uma concentração exata e específica do produto desejado, garantindo também que estes produtos não percam as suas propriedades originais[6]. Contudo, não está totalmente elucidado se a nanoencapsulação desse óleo pode potencializar sua atividade antibacteriana, especialmente contra bactérias de importância clínica, como *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) e *Escherichia coli* (*E. coli*), frequentemente associadas a infecções comunitárias e hospitalares.

Considerando a atividade dos OEs de *C. winterianus* para as cepas bacterianas, cita-se que um dos principais microrganismos de importância clínica é *S. aureus*, uma bactéria Gram-positiva a qual está presente na flora normal. Todavia, quando ocorre esta descompensação, ela pode acarretar infecções como acne, furunculose, podendo se tornar mais graves como pneumonia, endocardite e meningite. Além dessa, outra bactéria importante para a saúde é a *E. coli*, uma bactéria Gram-negativa comumente presente no trato gastrointestinal e que auxilia na síntese da vitamina K, e quando presente no trato urinário pode acarretar infecções[4].

Dessa forma, este estudo justifica-se pela necessidade de investigar estratégias que aumentem a eficácia de compostos naturais frente à resistência microbiana crescente. Considerando o exposto, este trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antibacteriana *in vitro* dos OEs de *C. winterianus* livre e em nanoemulsão, frente aos microrganismos *E. coli* e *S. aureus*.

MÉTODO

Material vegetal

O OE de *C. winterianus* utilizado nas formulações foi obtido de folhas secas da planta extraídas no Polo Oleoquímico da Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul (Unijuí), localizado no município de Três Passos/RS, posição geográfica 27°26’02.4” de latitude S e 53°57’06.7” de

longitude W. Depois de identificada no Laboratório de Botânica da Unijuí, a espécie foi catalogada e registrada no Herbário Universitário Rogério Bueno (HURB), local no qual uma exsicata foi depositada sob número 8114 (*C. winterianus*). A extração do OE foi realizada no mês de março de 2024.

O capim-citronela adapta-se muito bem ao clima tropical e subtropical, entretanto, não suporta temperaturas baixas e não resiste a geadas. A chuva é essencial para o seu desenvolvimento, entretanto, no período que precede a colheita, a chuva em excesso pode acarretar a redução do teor de OE. É considerada uma planta resistente e perene, podendo chegar até um metro de altura e pode crescer em solos que possuem características diferentes, mas possui uma preferência por solos drenados e ricos em nutrientes. Suas folhas são alongadas e possuem bordas cortantes e com uma coloração verde-clara, com odor forte e característico[7].

A Lei da Biodiversidade n° 13.123, de 20 de maio de 2015, define "o acesso ao patrimônio genético, proteção e acesso ao conhecimento tradicional associado e a repartição de benefícios para a conservação e uso sustentável da biodiversidade"[8]. Desta forma, toda pesquisa com patrimônio genético brasileiro ou com desenvolvimento de produtos com a biodiversidade brasileira, deverá ser cadastrada no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético (SisGen), portanto essa pesquisa está cadastrada no SisGen sob número AE1F391.

Obtenção do OE livre e da nanoemulsão

O OE livre obtido pela técnica de hidrodestilação, utilizando um aparelho tipo Clevenger modificado, modelo D20, fabricado pela LINAX, pelo período de 1 h e 30 min foi disponibilizado pelo Grupo de Pesquisa em Plantas Medicinais e Medicamentos (Plamedic) da Unijuí, por meio de uma parceria realizada.

Já a nanoemulsão do óleo foi disponibilizada e desenvolvida no Laboratório de Nanotecnologia da Universidade Franciscana (UFN), de Santa Maria/RS, pelo método de alta energia, sem o uso de solventes orgânicos, e com controle de temperatura, segundo método descrito por Pazze et al.[9]. A nanoemulsão foi obtida após adição da fase oleosa (5% de óleo e 2% de monooleato de sorbitano (Span 80®) na fase aquosa (2% de polissorbato 80 (Tween 80®) e água ultrapura) sob alta agitação, empregando um Ultra-Turrax® modelo T18 (IKA®, Alemanha) a 10.000 rpm. Em seguida, a velocidade de agitação foi aumentada para 17.000 rpm e mantida por 45 min. Foi realizado um controle de temperatura (banho de gelo), durante o processo de obtenção da nanoemulsão, a fim de prevenir a degradação e/ou ocorrência da volatilização dos constituintes do óleo. A formulação foi preparada em triplicata e armazenada sob proteção da luz. A concentração final do OE na nanoemulsão foi de 5%.

Análise química

A caracterização química foi realizada por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-MS), utilizando o equipamento Shimadzu QP5000, em parceria com a Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). A separação dos constituintes ocorreu em coluna capilar de sílica fundida Durabond-DB-5 (30 m × 0,25 mm × 0,25 µm; John Wiley & Sons Scientific, EUA). As condições operacionais incluíram temperaturas de 200ºC para o injetor e 250ºC para o detector, além de programação da temperatura da coluna de 60ºC a 300ºC, com taxa de aquecimento de 3ºC/min. O gás carreador utilizado foi hélio, com fluxo de 1 mL/min. As amostras foram preparadas por diluição a 2% (v/v) em éter etílico (Tédia®).

Os componentes foram identificados por comparação de seu índice de retenção relativo, calculado por interpolação linear relativa para o tempo de retenção de uma série de n-alcanos (C8 a C22), associado com seu espectro de massa, bem como, por comparação com espectros de massa de espectroteca de aquisição (NIST 62 - *National Institute of Standards and Technology*, Kyoto, JP). Quantidades relativas de cada composto foram calculadas a partir das áreas dos picos por normalização.

Caracterização da nanoemulsão

A determinação do índice de polidispersidade e do diâmetro médio das partículas da nanoemulsão foi realizada por dispersão dinâmica de luz, utilizando o equipamento Zetasizer® Nano-ZS modelo ZEN 3600 (Malvern, Inglaterra). Para as análises, as formulações foram diluídas 500 vezes (v/v) em água ultrapura previamente filtrada, com auxílio de seringa e membrana de 0,22 µm (Millipore®), visando assegurar adequada transparência óptica e reduzir a interferência da dispersão de luz causada pelas partículas. Os resultados foram expressos em nanômetros (nm), a partir da média de três determinações.

A avaliação do potencial zeta da formulação foi realizada por mobilidade eletroforética, empregando o equipamento Zetasizer® Nano-ZS modelo ZEN 3600 (Malvern, Inglaterra). Para as análises, as amostras foram diluídas 500 vezes (v/v) em solução de cloreto de sódio (10 mmol L^{-1}). Os valores obtidos foram expressos em milivolts (mV), a partir da média de três determinações.

Ensaios antimicrobianos

O OE nas suas porções livre e em nanoemulsão foram testados contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Os testes de suscetibilidade antimicrobiana foram realizados conforme a padronização da técnica de microdiluição em caldo do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI)[10,11], M07-A9 [33] para bactérias[12]. Ambos os testes foram realizados no laboratório de microbiologia da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões (URI), no *campus* Santo Ângelo.

A solução utilizada para os testes foi preparada com água estéril e Tween 80, e obteve-se uma concentração de solução estoque de 10.000 µg/mL no OE livre e uma concentração de solução estoque de 1.000.000 µg/mL para a nanoemulsão. As soluções estoques foram preparadas e utilizadas no mesmo dia, os testes para determinar a concentração inibitória

mínima (CIM) e o disco-difusão foram realizados em triplicata. As concentrações testadas na CIM no OE livre variaram de 0,5 µg/mL a 16.384 µg/mL para todos os microrganismos que foram testados. Já no OE em nanoemulsão foi de 1.953,125 µg/mL a 500.000 µg/mL.

A partir da determinação da CIM, para realização do teste de disco-difusão, as concentrações utilizadas foram múltiplas da CIM. Foram testadas concentrações menores e maiores que a CIM, que variaram de 0,25 a 10 X CIM.

Atividade antibacteriana

Os microrganismos utilizados para o estudo foram *E. coli* (ATCC 25923) e *S. aureus* (ATCC 25923), os quais foram repicados toda vez que foram realizados os testes, para assim verificar a morfologia e a pureza das colônias, incubadas a 37°C por 24 h.

Os OEs foram testados pelo método de microdiluição em caldo utilizando caldo Mueller Hinton, em placas do tipo Elisa contendo 96 poços. O fármaco foi adicionado apenas no primeiro poço. A partir do segundo, foi diluído até o décimo poço, o décimo primeiro e o décimo segundo foram utilizados como controle positivo (controle do microrganismo) e controle negativo (esterilidade do caldo). O inóculo foi preparado a partir do repique da bactéria após incubação a 37°C por 24 h, sendo suspensas de duas a três colônias em 3 mL de solução salina, até alcançar a turbidez determinada pela escala de McFarland (1,5 x 10^8 UFC/mL). Em seguida, realizou-se uma diluição em caldo do inóculo (1:100) que foi adicionado a todos os poços, exceto no controle negativo[13].

O método de disco-difusão foi realizado conforme a especificação do CLSI[10]. Utilizando placas com meio de ágar Mueller Hinton, o microrganismo foi semeado após a realização do inóculo de 1,5 x 10^8 UFC/mL, com a utilização de *swab* estéril, ocupando toda a placa para um crescimento uniforme do microrganismo.

A partir disso, foi impregnado nos discos de papel filtro esterilizados 10 µL das concentrações desejadas. Como controle positivo para *E. coli* foi utilizado ciprofloxacino e para *S. aureus* foi utilizada oxaciclina. O controle negativo em ambos foi o Tween 80, diluído em água a 2%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os constituintes encontrados majoritariamente no OE de *C. winterianus* foram o citronelal (46,7% citronela livre e 44,14% citronela nanoemulsionada), o geraniol (19,7% citronela livre e 29,98% citronela nanoemulsionada) e o citronelol (18,1% citronela livre e 16,24% citronela nanoemulsionada), totalizando nove compostos identificados no óleo livre e sete no óleo nanoemulsionado. Os demais compostos encontrados, mas em menor quantidade, foram: o elemol (4,2% citronela livre e 1,42% citronela nanoemulsionada), o limoneno (1,3% citronela livre e 2,84% citronela nanoemulsionada), acetato de geranila (1,9% citronela livre e 1,13% citronela nanoemulsionada), acetato de citronelila (2,5% citronela livre e traços citronela nanoemulsionada), beta-elemeno (2,5% citronela livre), delta-cadineno (1,5% citronela livre) e germacreno D (0,7% citronela livre).

A literatura descreve que o óleo de *C. winterianus* tem como composto predominante o citronelal, citronelol e geraniol, compostos que possuem ação sobre a membrana celular bacteriana[14,15].

As formulações contendo OE de *C. winterianus* apresentaram diâmetro médio inicial em torno de 134,0 nm; índice de polidispersão de 0,221; e potencial Zeta de -6,5 mV.

O índice de polidispersão evidencia informações sobre a homogeneidade na distribuição de tamanhos de nanopartículas em dispersão, e esses valores podem variar de 0 a 1, de acordo com a literatura. Valor de polidispersão abaixo de 0,3 representa um sistema monodisperso, ou seja, homogêneo na distribuição das nanopartículas[16]. Já os valores do potencial zeta são geralmente usados para prever a estabilidade de sistemas coloidais em geral. Quanto maior o potencial zeta em módulo, maior é a estabilidade desses sistemas, pois as partículas tendem a se repelir entre si, evitando agregação e perda de estabilidade[17].

Os resultados obtidos no teste de CIM para o OE livre foram de 512 µg/mL para *E. coli* e de 2.048 µg/mL para *S. aureus*. Já o OE em nanoemulsão apresentou menor CIM para *E. coli* com um valor de 31.250 µg/mL e de 62.500 µg/mL para a *S. aureus*. Com isso, observa-se que, mesmo em altas concentrações, o OE de citronela livre é capaz de inibir o crescimento em uma menor concentração frente a *E. coli* do que *S. aureus* e apresenta-se mais eficiente que o OE nanoemulsionado.

Scherer et al.[18] tiveram como resultado na realização da CIM, que o OE de cravo-da-índia apresentou uma melhor atividade antimicrobiana frente aos microrganismos *S. aureus*, *E. coli* e *Pseudomonas aeruginosa*. Frente ao óleo de citronela, os microrganismos em que se observou uma melhor atividade antimicrobiana foram *S. aureus*, *Salmonella Typhimurium* e *Clostridium perfringens*. O OE de citronela apresentou como CIM 800, 400 e 50 µg/mL, para *E. coli*, *S. Thyphimurium* e *S. aureus*, respectivamente. Resultado semelhante ao encontrado no estudo, para *E. coli* que obteve uma CIM de 512 µg/mL e já para *S. aureus* apresentou um resultado um pouco diferente do encontrado pelo autor, e teve uma CIM de 2.048 µg/mL.

Silveira[19] testou a atividade antibacteriana de três OEs, *C. winterianus* (citronela), *Eucalyptus paniculata* (eucalipto) e *Lavandula angustifolia* (lavanda) e constatou que o OE de citronela apresentou uma CIM frente a *S. aureus* de 2.500 µg/mL e o OE de eucalipto frente a *S. aureus* teve a CIM de 1.250 µg/mL. Ambos não apresentaram uma atividade significativa contra *E. coli*. Por fim, a lavanda obteve contra *S. aureus* uma CIM de 1.250 µg/mL e para *E. coli* de 2.500 µg/mL. Neste estudo, o autor obteve um resultado utilizando três OEs, com uma melhor atividade frente a *S. aureus*; já para *E. coli* não teve um resultado muito satisfatório frente aos três OE testados. Já no estudo em questão, a CIM foi mais satisfatória para *E. coli* do que para *S. aureus*.

Em um estudo realizado por Seibert[20] utilizando o OE puro e em nanoemulsão de *C. densiflorus* (citronela), observou-se o efeito bactericida sobre as espécies *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *Candida albicans* nas concentrações de 3,906; 7,812; 15,625 e 0,488 µL/mL, respectivamente, para o OE livre e 31,25; 62,5; 125,0 e 15,625 µL/mL para a nanoemulsão. Entretanto, observou-se que a nanoemulsão se demonstrou mais efetiva a partir dos resultados obtidos na CIM que foram 1,562; 3,125 e 6,250 µL/mL quando testados sobre as bactérias *E. coli*, *S. aureus* e *P. aeruginosa* respectivamente, valores os quais se demonstraram inferiores com OE puro. Com isso, é possível observar que o OE das folhas de *C. densiflorus* na forma de nanoemulsão tem um alto potencial antibiótico frente às bactérias acima citadas[19]. É possível verificar que a nanoemulsão possui um alto potencial de inibir o crescimento quando adicionada junto ao OE, garantindo uma maior estabilidade para o OE, já que tem uma grande facilidade de sofrer oxidação, perdendo um pouco do seu efeito. Entretanto, no estudo realizado, não houve uma boa atividade do OE de citronela em nanoemulsão. Isso pode ser explicado por uma baixa solubilidade e dispersão do OE no meio aquoso. Apesar da utilização de Tween 80 como agente emulsificante, a dispersão do OE pode não ter sido completamente homogênea, o que pode ter resultado em uma distribuição desigual do composto ativo nos poços da microdiluição, interferindo na determinação da CIM, esse aspecto pode ter contribuído para a menor atividade observada na nanoemulsão em comparação ao óleo livre.

Holetz et al.[21] e Ayres et al.[22] apresentaram valores de CIM inferiores a 100 µg/mL (0,1 mg/mL), o que, para estes autores, representa uma boa atividade antimicrobiana, valores situados entre 100 e 500 µg/mL (0,1–0,5 mg/mL) nesse estudo indicam atividade moderada e, por fim, valores entre 500 e 100 µg/mL (0,5–1,0 mg/mL) foram considerados com uma fraca atividade antimicrobiana.

A Tabela apresenta os resultados do método de disco-difusão frente à *S. aureus* e *E. coli* a partir de concentrações múltiplas dos valores obtidos na CIM, tanto do OE livre como do OE em nanoemulsão.

A Tabela apresenta o resultado da avaliação da atividade antibacteriana do OE de citronela livre a partir da determinação da CIM. Obteve-se uma CIM para *S. aureus* de 2.048 µg/mL e para *E. coli* de 512 µg/mL e, assim, multiplicamos esses valores pelos valores que variaram de 0,25 a 10 X, para que assim fosse determinada a concentração em cada disco. Obtivemos, assim, concentrações de 512 µg/mL a 20.480 µg/mL para *S. aureus*. E frente a *E. coli* concentrações de 128 µg/mL a 5.120 µg/mL. Da mesma forma foi realizado com a nanoemulsão, e obtivemos uma CIM de 62.500 µg/mL para *S. aureus* e de 31.250 µg/mL para *E. coli*. As concentrações adicionadas aos discos de OE em nanoemulsão para *S. aureus* foram de 15.625 µg/mL até 625.000 µg/mL, já para *E. coli* as concentrações variaram de 7.812 µg/mL a 312.500 µg/mL.

Os resultados obtidos foram limitados: os dois OEs apresentaram-se resistentes frente aos microrganismos, não ocorrendo nenhum halo de inibição, ao contrário do que se esperava e diferentemente dos estudos realizados por outros autores.

Apesar de o método de disco-difusão ser um método em que os OEs apresentam uma baixa difusibilidade em meio sólido, devido à sua natureza hidrofóbica, é um método simples, de baixo custo e é amplamente utilizado como ferramenta de triagem inicial da atividade antimicrobiana[14,23]. Apesar das adversidades, o método

Tabela. Avaliação da suscetibilidade do OE de citronela livre e em nanoemulsão pelo método de disco-difusão frente a *S. aureus* e *E. coli*.

		Staphylococcus aureus			***Escherichia coli***		
CIM OE livre		2.048 µg/mL			512 µg/mL		
CIM OE nanoemulsão		62.500 µg/mL			31.250 µg/mL		
Halo de Inibição							
	Concentrações	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
OE citronela livre e em nanoemulsão	0,25 X CIM	R	R	R	R	R	R
	0,5 X CIM	R	R	R	R	R	R
	1 X CIM	R	R	R	R	R	R
	2 X CIM	R	R	R	R	R	R
	3 X CIM	R	R	R	R	R	R
	5 X CIM	R	R	R	R	R	R
	10 X CIM	R	R	R	R	R	R
Controle positivo	Oxaciclina (*S. aureus*)	+30	+30	+30	+30	+30	+30
	Ciprofloxacino (*E. coli*)	+30	+30	+30	+30	+30	+30
Controle negativo	Água e Twen 80	*	*	*	*	*	*

Fonte: Elaborada pelos autores, 2024.
OE: óleo essencial; CIM: concentração inibitória mínima.
Resistente (R) + 30 indica que o halo foi maior que 30 mm e que o microrganismo é sensível ao antibiótico; * não ocorreu inibição.

permite uma comparação qualitativa entre as amostras e a identificação de potenciais efeitos antimicrobianos. Além disso, algumas adaptações metodológicas, como, por exemplo, agentes emulsificantes, podem minimizar essa limitação[24]. Dessa forma, os resultados que são obtidos a partir dele devem ser analisados de forma qualitativa, sendo necessária a complementação com outros métodos quantitativos, como a determinação da CIM[25]. Além disso, o volume de 10 µL aplicado nos discos pode não ter sido suficiente para garantir difusão adequada do composto ativo no meio, especialmente considerando possíveis perdas por volatilização e retenção do óleo no próprio disco.

A ausência de halos de inibição no ensaio de disco-difusão não necessariamente indica ausência de atividade antimicrobiana, especialmente no caso dos OEs, cuja natureza é hidrofóbica, o que pode limitar a sua difusão no meio de cultura[14,23]. Portanto, os resultados devem ser interpretados com cautela, pois podem acarretar um resultado falso-negativo quando avaliados exclusivamente por métodos baseados em difusão[14]. É recomendada a utilização de métodos complementares, como a determinação da CIM, conforme apresentamos acima, para uma avaliação mais precisa da atividade antimicrobiana[23,25].

Silveira et al.[19] observaram que o OE de citronela apresentou, no método disco-difusão, as maiores zonas de inibição para as espécies Gram-positivas, como *S. aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* e *Bacillus subtilis*.

Alves et al.[26] avaliaram a atividade antibacteriana do OE de *Eucalyptus citriodora* e *Lavandula dentata* frente a *S. aureus* (ATCC 6538) e *P. aeruginosa* (ATCC 15442), utilizando concentrações que variaram de 5% até 100% para o método do disco-difusão. As concentrações de 5% e 10% não apresentaram halo de inibição para ambos os microrganismos. Entretanto, para *P. aeruginosa*, não foi observada atividade de inibição com nenhum dos OEs, demonstrando que o OE não é efetivo contra este patógeno. Já para o *S. aureus*, os OEs foram mais efetivos, o OE de lavanda apresentou resultados superiores aos controles positivos quando comparado com o OE de eucalipto nas concentrações de 30% a 50%.

Isso pode ser justificado devido ao OE de lavanda ter apresentado um maior número de compostos quando comparado ao OE de eucalipto. Além disso, a maioria dos estudos demonstra que os OEs são mais efetivos contra as bactérias Gram-positivas. As bactérias Gram-negativas apresentam uma maior resistência por possuírem uma membrana externa envolvendo a parede celular, o que pode dificultar a difusão de compostos hidrofóbicos por meio de uma cobertura de lipopolissacarídeos, dificultando a passagem do OE por essa barreira[26,27].

Jusvick[28] avaliou a atividade antibacteriana do extrato bruto de *Arctium minus* em concentrações de 10.000 µg/mL, 50.000 µg/mL e 100.000 µg/mL utilizando o método disco-difusão contra diversas cepas bacterianas, *P. aeruginosa*, *Streptococcus Agalactiae*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella* spp, *E. coli*, *Salmonella*, *Streptococcus epidermidis*, *S. aureus*, *Acinetobacter baumannii*, *Morganella morganii*. No final do teste, não foi possível observar um halo de inibição, o que é semelhante ao resultado obtido neste estudo, o que é capaz de demonstrar que nem sempre os produtos obtidos de plantas medicinais apresentam resultados satisfatórios.

Sabe-se que sistemas nanoemulsionados têm um futuro bastante promissor. Entretanto, é necessário realizar pesquisas para desenvolver uma formulação que seja estável por um longo período, pois alguns estudos demonstraram que estas formulações mantêm as suas características físico-químicas por até 60 dias[29]. Neste estudo, a nanoemulsão não apresentou resultado tão satisfatório, considerando que foi utilizada uma concentração de 5% do OE livre.

A espécie *C. winterianus* adapta-se muito bem a temperaturas subtropicais e tropicais. A chuva é essencial no seu período de crescimento e desenvolvimento, e ela não se adapta muito bem a temperaturas baixas. A chuva em excesso no seu período de colheita pode baixar o teor de OE; por isso, é recomendável que o horário da colheita da planta seja entre as 5 ou as 6 h da manhã, já que é o horário em que há uma maior concentração do OE[30].

A partir dos estudos observados, encontra-se uma grande dificuldade na forma de comparar os resultados de outros autores pela grande variabilidade nas metodologias utilizadas, que variam desde as diversas formas de preparação do inóculo, a forma de utilização do OE tanto puro ou quando diluído, o solvente utilizado e o volume depositado sobre os discos de papéis e o tamanho do disco. Assim, são necessários mais estudos sobre a atividade antibacteriana do OE de *Cymbopogon winterianus*.

Silveira et al.[19], entre outros autores, relataram a necessidade da padronização de um método robusto e reprodutível para assim observar a atividade antibacteriana dos OEs, para que assim, caso seja obtido um resultado diferente, possa ser feita uma comparação do que pode ter causado esse efeito.

Além disso, a ausência de halos de inibição no ensaio de disco-difusão, mesmo em concentrações elevadas (até 10× CIM), reforça a interpretação de limitada eficácia do OE quando avaliado isoladamente. Nesse contexto, destaca-se que OEs podem apresentar maior relevância terapêutica quando utilizados em associação com antimicrobianos convencionais, atuando de forma sinérgica. Estudos têm demonstrado que esses compostos podem aumentar a permeabilidade da membrana bacteriana e potencializar a ação de antibióticos. Dessa forma, investigações futuras envolvendo ensaios de sinergismo, como testes de combinação com fármacos antimicrobianos, podem representar uma abordagem promissora para melhor explorar o potencial antibacteriano OE de *Cymbopogon winterianus*[14,31].

Uma limitação do estudo refere-se às metodologias utilizadas, que podem não refletir completamente a atividade de sistemas nanoestruturados, especialmente devido à possível liberação modificada do OE. Métodos complementares, como ensaios de cinética de morte microbiana, poderiam proporcionar uma avaliação mais adequada, sendo recomendados em estudos futuros.

CONCLUSÕES

A partir da aplicação dos métodos de disco-difusão e da determinação da CIM, observou-se que o OE de citronela, tanto na forma livre quanto em nanoemulsão, apresentou atividade antimicrobiana limitada *in vitro* frente a *E. coli* e a *S. aureus*.

De modo geral, os resultados indicam que o OE apresentou pouca atividade antibacteriana nas condições avaliadas, evidenciando um potencial limitado de aplicação. Embora esses achados contribuam para o avanço dos estudos com plantas medicinais, são necessárias investigações adicionais para melhor compreender a eficácia e os mecanismos de ação envolvidos.

REFERÊNCIAS

1. Rabêlo WF. Caracterização química, toxicidade e avaliação da atividade antibacteriana do óleo essencial do cravo da índia (*Syzygium aromaticum*) [dissertação]. São Luís: Universidade Federal do Maranhão; 2010[acesso 15 jun 2026]. Disponível em: https://tedebc.ufma.br/jspui/bitstream/tede/911/1/WALERIA_%20FERREIRA_%20RABELO.pdf
2. Borges LR, Amorim VA. Metabólitos secundários de plantas. Rev Agrotecnol. 2020;11(1):54-67.
3. Mendes FLR, Carvalho EM, Abrantes JA, Nogueira JMR. Buscando novos antimicrobianos: avaliação da atividade antibacteriana de extratos de *Eugenia brasiliensis*. Rev Bras Análises Clin. 2020;52(3):228-34. https://doi.org/10.21877/2448-3877.202002022
4. Monteiro MVM. Avaliar a atividade antimicrobiana de óloes essenciais citronela (*Cymbopogon winterianus*) e Andiroba (*Carapa guianensis* aubl) em cepas clínicas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* [monografia de graduação]. Lagarto: Universidade Federal de Sergipe; 2017[acesso 15 jun 2026]. Disponível em: https://ri.ufs.br/bitstream/riufs/7450/2/MICHELE_VIT%c3%93RIA_DE_MELO_MONTEIRO.pdf
5. Trindade LA. Avaliação da atividade biológica do óleo essencial de *Cymbopogon nardus* (L.) Rendle e do fitoconstituinte citronelal sobre *Candida albicans* [tese]. Recife: Universidade Federal de Pernambuco; 2021[acesso 15 jun 2026]. Disponível em: https://repositorio.ufpe.br/bitstream/123456789/40678/1/TESE%20Leonardo%20Antunes%20Trindade.pdf
6. Guimarães FDG. Avaliação da atividade microbiológica e citotóxica do óleo essencial de *Cymbopogon winterianus* JOWITT ex BOR [dissertação]. Juiz de Fora: Universidade Federal de Juiz de Fora; 2013[acesso 15 jun 2026]. Disponível em: https://repositorio.ufjf.br/jspui/bitstream/ufjf/1529/1/flaviadelgaudioguimaraes.pdf
7. Freire NF. Desenvolvimento de nanopartículas poliméricas contendo o óleo essencial de citronela (*Cymbopogon winterianus*) [dissertação]. Salvador: Universidade Federal da Bahia; 2017[acesso 15 jun 2026]. Disponível em: https://repositorio.ufba.br/bitstream/ri/24876/4/Disserta%C3%A7%C3%A3o_Nath%C3%A1lia%20Freitas%20Freire.pdf
8. Brasil. Lei Nº 13.123, de 20 de maio de 2015. Dispõe sobre o acesso ao patrimônio genético, sobre a proteção e o acesso ao conhecimento tradicional associado e sobre a repartição de benefícios para a conservação e uso sustentável da biodiversidade. Diário Oficial União. 21 maio 2015.
9. Pazze DM, Strada KL, Kleibert KRU, Bertoldi GM, Carvalho IR, Silva JAG et al. Óleo essencial de *Cymbopogon flexuosus* livre e nanoemulsionado: efeito antifúngico sobre *Candida* spp. *in vitro*. Rev Epidemiol Controle Infec. 2026;15(4):1-10. https://doi.org/10.17058/reci.v15i4.20350
10. Giongo JL, Almeida Vaucher R, Fausto VP, Quatrin PM, Lopes LQS, Santos RCV et al. Anti-Candida activity assessment of *Pelargonium graveolens* oil free and nanoemulsion in biofilm formation in hospital medical supplies. Microb Pathog. 2016;100:170-8. https://doi.org/10.1016/j.micpath.2016.08.013.
11. Clinical and Laboratory Standards Institute – CLSI. Métodos para testes de suscetibilidade antimicrobiana por diluição para bactérias que crescem em aerobiose: M07-A8. 8a ed. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2009[acesso 15 jun 2026]. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/metodo_ref_testes_diluicao_modulo3.pdf
12. Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing – BrCAST. Método de Disco-Difusão para Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos: Versão 9.0. São Paulo: Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing; 2021[acesso 15 jun 2026]. Disponível em: https://brcast.org.br/wp-content/uploads/2022/09/06-Me%CC%81todo-de-Disco-Difusa%CC%83o-BrCAST-24-6-2021.pdf
13. Da Cruz RC, Denardi LB, Mossmann NJ, Piana M, Alves SH, De Campos MMA. Antimicrobial activity and chromatographic analysis of extracts from *Tropaeolum pentaphyllum* Lam. Tubers. Molecules. 2016;21(5):1-11. https://doi.org/10.3390/molecules21050566
14. Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods. Int J Food Microbiol. 2004;94(3):223-53. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022
15. Silva J, Abebe W, Sousa SM, Duarte VG, Machado MIL, Matos FJA. Analgesic and anti-inflammatory effects of essential oils of *Eucalyptus*. J Ethnopharmacol. 2003;89(2-3):277-83. https://doi.org/10.1016/j.jep.2003.09.007
16. Kumar K, Malhotra J, Kumar S, Sood V, Singh D, Sharma M et al. Citral enrichment in Lemongrass (*Cymbopogon flexuosus*) oil using spinning band equipped high vacuum distillation column and sensory evaluation of fractions. Food Chem Adv. 2023;2:1-8. https://doi.org/10.1016/j.focha.2023.100291

17. Laouini A, Jaafar-Maalej C, Limayem-Blouza I, Sfar S, Charcosset C, Fessi H. Preparation, characterization and applications of liposomes: state of art. J Colloid Sci Biotechnol. 2012;1(2):147-68. https://doi.org/10.1166/jcsb.2012.1020.

18. Scherer R, Wagner R, Duarte MCT, Godoy HT. Composição e atividades antioxidante e antimicrobiana dos óleos essenciais de cravo-da-índia, citronela e palmarosa. Rev Bras Pl Med. 2009;11(4):442-9. https://doi.org/10.1590/S1516-05722009000400011

19. Silveira SM, Cunha Júnior A, Scheuermann GN, Secchi FL, Verruck S, Krohn M et al. Composição química e atividade antibacteriana dos óleos essenciais de *Cymbopogon winterianus* (citronela), *Eucalyptus paniculata* (eucalipto) e *Lavandula angustifolia* (lavanda). Rev Inst Adolfo Lutz. 2012;71(3):471-80.

20. Seibert JB. Desenvolvimento de nanoemulsão a partir do óleo essencial de folhas de *Cymbopogon densiflorus* (Steud.) Stapf.: Avaliação da sazonalidade e atividades biológicas [dissertação]. Ouro Preto: Universidade Federal de Ouro Preto; 2015[acesso 15 jun 2026]. Disponível em: https://www.repositorio.ufop.br/bitstream/123456789/6502/1/DISSERTA%C3%87%C3%83O_DesenvolvimentoNanoemuls%C3%A3oPartir.pdf

21. Holetz FB, Pessini GL, Sanches NR, Cortez DAG, Nakamura CV, Dias Filho BP. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2002;97(7):1027-31. https://doi.org/10.1590/S0074-02762002000700017

22. Ayres MCC, Brandão MS, Vieira-Júnior GM, Menor JCAS, Silva HB, Soares MJS et al. Atividade antibacteriana de plantas úteis e constituintes químicos da raiz de *Copernicia prunifera*. Rev Bras Farmacogn. 2008;18(1):90-7. https://doi.org/10.1590/S0104-59702008000100014

23. Hulankova R. Methods for determination of antimicrobial activity of essential oils *in vitro*: a review. Plants (Basel). 2024;13(3):1-19. https://doi.org/10.3390/plants13030421

24. Balouiri M, Sadiki M, Ibnsouda SK. Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity: a review. J Pharm Anal. 2016;6(2):71-9. https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005

25. Golus J, Sawicki R, Widelski J, Ginalska G. The agar microdilution method: a new method for antimicrobial susceptibility testing for essential oils and plant extracts. J Appl Microbiol. 2016;121(5):1291-9. https://doi.org/10.1111/jam.13253

26. Alves MVD, Kleibert KRU, Beber SC, Pletsch MU, Staudt KJ, Alves IA et al. Atividade antibacteriana de óleos essenciais frente à *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*. Rev Biotecnol Cienc. 2022;11(1):32-42. https://doi.org/10.31668/rbc.v11i1.12594

27. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa. Módulo 10: detecção dos principais mecanismos de resistência bacteriana aos antimicrobianos. In: Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa. Manuais de microbiologia clínica para o controle de infecção relacionada à assistência à saúde. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária; 2013[acesso 15 jun 2026]. Disponível em: https://www.gov.br/anvisa/pt-br/centraisdeconteudo/publicacoes/servicosdesaude/publicacoes/modulo-10_manual-de-microbiologia.pdf

28. Jusvick AL, Beerbaum MKC, Pagno AR, Piana M. Análise da atividade antibacteriana do extrato bruto da espécie *Arctium minus*. Rev Interdiscip Cienc Saude Biol. 2023;6(2):3-14. https://doi.org/10.31512/ricsb.v6i2.1254

29. Sawazaki YM. Avaliação da estabilidade e atividade antimicrobiana de nanoemulsões contendo o óleo essencial de *Cinnamomum cassia* [monografia de graduação]. Brasília: Universidade de Brasília; 2023[acesso 15 jun 2026]. Disponível em: https://bdm.unb.br/bitstream/10483/37588/1/2023_YolimiMiekoSawazaki_tcc.pdf

30. Secretaria de Estado de Saúde do Distrito Federal - SES-DF. Citronela. Brasília: Secretaria de Estado de Saúde do Distrito Federal; 2017[acesso 15 jun 2026]. Disponível em: https://www.saude.df.gov.br/documents/37101/1118391/folheto-citronela.pdf/4351d5ea-b3c7-0422-bdc4-8799c4ae6c71

31. Yap PSX, Yiap BC, Ping HC, Lim SHE. Essential oils, a new horizon in combating bacterial antibiotic resistance. Open Microbiol J. 2014;8:6-14. https://doi.org/10.2174/1874285801408010006

Contribuição dos Autores

Konarzewski V, Staudt KJ, Beber SC, Colet CF- Concepção, planejamento (desenho do estudo), aquisição, análise, interpretação dos dados e redação do trabalho. Krause LS, Montagner GE, Gomes P – Produção dos óleos essenciais. Todos os autores aprovaram a versão final do trabalho.

Conflito de Interesse

Os autores informam não haver qualquer potencial conflito de interesse com pares e instituições, políticos ou financeiros deste estudo.

Licença CC BY. Com essa licença os artigos são de acesso aberto que permite o uso irrestrito, a distribuição e reprodução em qualquer meio desde que o artigo original seja devidamente citado.