

INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA DO RIO GRANDE
DO NORTE - CAMPUS APODI
CURSO DE LICENCIATURA PLENA EM QUÍMICA

KELLY MARIANA MORAIS LOPES

**VARIAÇÃO CIRCADIANA DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA E AVALIAÇÃO DA
ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ANTIMICROBIANA DO ÓLEO ESSENCIAL DAS
FOLHAS DE LIMÃO TAITI (*Citrus Latifolia Tanaka.*)**

APODI-RN

2018

KELLY MARIANA MORAIS LOPES

**VARIAÇÃO CIRCADIANA DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA E AVALIAÇÃO DA
ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ANTIMICROBIANA DO ÓLEO ESSENCIAL DAS
FOLHAS DE LIMÃO TAITI (*Citrus Latifolia Tanaka.*)**

Monografia apresentada ao Curso Superior de Licenciatura Plena em Química, do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Norte, em cumprimento às exigências legais como requisito parcial à obtenção do título de Licenciado em Química.

Orientador: Prof. Dr. Francisco Felipe Maia da Silva

APODI-RN

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

L864v Lopes, Kelly Mariana Moraes.

Variação circadiana da composição química e avaliação da atividade antioxidante e antimicrobiana do óleo essencial das folhas de limão taiti (*Citrus Latifolia Tanaka.*) / Kelly Mariana Moraes Lopes - Apodi, 2020.

39 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Francisco Felipe Maia da Silva.

Trabalho de conclusão de curso (Superior). Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Norte, Campus Apodi - Curso Superior de Licenciatura Plena em Química, Apodi, 2020.

1. Óleo essencial. 2. Composição química de óleos essenciais. 3. Composto químico – Variação circadiana. I. Silva, Francisco Felipe Maia da (orient). II. Título.

IFRN

66 CDU

KELLY MARIANA MORAIS LOPES

**VARIAÇÃO CIRCADIANA DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA E AVALIAÇÃO DA
ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ANTIMICROBIANA DO ÓLEO ESSENCIAL DAS
FOLHAS DE LIMÃO TAITI (*Citrus Latifolia Tanaka.*)**

Monografia apresentada ao Curso Superior de Licenciatura Plena em Química, do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Norte, em cumprimento às exigências legais como requisito parcial à obtenção do título de Licenciado em Química.

Monografia apresentada e aprovada em 21/12/2018, pela seguinte Banca Examinadora:

BANCA EXAMINADORA

Francisco Felipe Maia da Silva

Francisco Felipe Maia da Silva, Dr. - Presidente
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Norte.

Luciana Medeiros Bertini

Luciana Medeiros Bertini, Dra. - Examinadora
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Norte.

Marcionila de O. Ferreira

Marcionila de Oliveira Ferreira, Dra. - Examinadora
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Norte.

Dedico...

A meus pais: Mateus de Souza e Elisangela Moraes, que sempre foram meu alicerce, me incentivaram a batalhar pelos meus sonhos e me ensinaram que com humildade, paciência e fé em Deus, tudo é possível. Dedico também “In memoriam” ao meu bisavô Luzimar Gomes Pinto, que nos anos em que convivemos me transmitiu ensinamentos que carrego até hoje. Tenho certeza de que se estivesse aqui estaria orgulhoso pelas minhas vitórias.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pelo dom da vida, por ter me dado paciência e novo ânimo nos momentos em que pensei em desistir, dedicação, discernimento e acima de tudo nunca me deixar fraquejar por maior que fosse o obstáculo.

Aos meus pais Mateus de Souza e Elisangela Morais, por todas as dificuldades que enfrentaram por mim, sei que não foram poucas. Pelo carinho e dedicação que tiveram para me educar e me fazer ser uma pessoa de bem, por nunca terem medido esforços para minha educação acadêmica, por todo incentivo que sempre me deram para sempre ir mais longe, batalhar pelos meus sonhos, ter fé em Deus e não me deixar abalar pelos obstáculos. Agradeço ainda, por toda paciência que tiveram nessa etapa final da monografia.

A minha irmã Clara Morais, por sempre ter me ajudado no que podia, por ter estado ao meu lado nas noites de estudo, pelas maratonas de séries para aliviar o estresse, pela paciência nos dias em que cheguei frustrada e por todo carinho.

Ao meu cachorro Marley, por ser meu amigo e companheiro de todas as horas, por ter estado ao meu lado em todas as madrugadas que fiquei acordada estudando e por sempre me receber com um carinho que alegrava meu dia independente de qualquer coisa que tivesse me desanimado ou cansaço que eu viesse a ter.

Aos meus tios Eliziario Lopes e Maria das dores, por todas as vezes que me acolheram em sua casa durante essa rotina de IF, por sempre me cuidarem e aconselharem como filha e por todo carinho que sempre recebi de ambos.

Aos todos os meus demais familiares, que não foram citados, mas tiveram algum envolvimento nesse processo, me apoiaram e me deram o auxílio necessário para dar não desistir do meu sonho.

Aos meus amigos adquiridos nesta minha etapa acadêmica, mas que levarei por toda a vida, eles são mais que companheiros de dia a dia, de viagens, são parte da minha vida: meu muito obrigada por toda força, horas de estudo, pelas risadas, momentos no laboratório, puxões de orelha e ensinamentos: Kevin Oliveira, Kaio Costa, Adriel Torres e Paulo Tavares.

Agradeço também aos meus demais colegas de turma, apesar das nossas brigas cada um teve sua contribuição durante esses anos de convivência.

Agradeço a Iraciana Morais, não apenas pela amizade e companheirismo, mas também por sempre ter estado disposta a me ajudar no que fosse preciso desde o início do curso, até mesmo quando tinha outras mil coisas para fazer. Obrigada todo apoio, por todas as horas de conversas, pelas noites das meninas, por não me deixar desanimar quando as coisas não estavam caminhando bem e por sempre me fazer acreditar que no final tudo iria dar certo.

A todos aqueles que em todos os lugares que fui me receberam bem e acabaram doando um pouco de si em forma de ensinamentos para minha vida.

Agradeço aos professores que mais do que mediadores de conhecimentos foram meus amigos: Rosimary Bezerra, Marcionila Ferreira, Derilson de Melo e por último, mas de extrema importância meu orientador Felipe Maia, obrigada pela orientação, pela confiança depositada em mim, por toda dedicação durante esse processo, pelos seus valiosos ensinamentos e influência em minha formação.

E àqueles que não foram citados, mas estiveram presentes nessa trajetória, meu muito obrigado por todo o conhecimento doado, compartilhado e alcançado no decorrer desses anos, por todo profissionalismo com o qual presentearam-me durante a graduação.

“Sem sonhos, a vida não tem brilho. Sem metas, os sonhos não têm alicerces. Sem prioridades, os sonhos não se tornam reais. Sonhe, trace metas, estabeleça prioridades e corra riscos para executar seus sonhos. Melhor é errar por tentar que errar por se omitir! ”

Augusto Cury

RESUMO

A utilização de produtos naturais como antioxidantes e antimicrobianos ainda é um meio viável e de grande uso para estas finalidades, sendo estes produtos necessários para que a longevidade humana possa existir, de modo a evitar algumas enfermidades causadas tanto por radicais livres, quanto microrganismos. Os radicais livres podem causar o envelhecimento e morte celular e o desenvolvimento de doenças degenerativas tais como catarata, enfisema, diabetes e câncer. Já os micróbios, podem causar desde uma simples gripe até doenças que levam a óbito. O óleo essencial das folhas do limão Taiti (*Citrus Latifolia Tanaka*.) é uma substância natural de baixo valor agregado, mas com alta diversidade de utilidades e propriedades. Diante disto, o presente trabalho teve como objetivo a extração do óleo essencial de *Citrus latifolia tanaka*, limão Taiti, através do método de hidrodestilação, bem como, avaliar a variação circadiana da sua composição química e análise da capacidade antioxidante com método DPPH (2,2-Difenil-1-picril-hidrazila) e antimicrobiana do mesmo. O trabalho utilizou um sistema tipo Clevenger para extração do óleo essencial, as análises de voláteis foram feitas utilizando um Cromatógrafo Gasoso Acoplado ao Espectrômetro de Massa (CG-EM), tendo como resultados a presença de Limoneno, Citral e β -Citral como componentes majoritários dos óleos essenciais, bem como suas variações circadianas, as avaliações da atividade antioxidante foram feitas segundo os princípios de Andrade, apresentando uma baixa inibição de radicais livres em todas as concentrações analisadas e as atividades antimicrobianas foram feitas através da técnica de disco difusão frente a cepas a bactéria gram-negativa *Escherichia coli*, tendo como resultados uma baixa eficácia no combate ao crescimento da bactéria *Escherichia coli*. Com isso o presente trabalho buscou obter resultados que influenciassem em novas pesquisas sobre o óleo essencial das folhas do *Citrus Latifolia Tanaka*. Sendo este, um modo de ampliar suas possibilidades de utilização.

Palavras-Chave: Óleo Essencial, Citrus Latifolia Tanaka, Antioxidante, Antimicrobiana.

ABSTRACT

The use of natural products as antioxidants and antimicrobial drugs is still a viable way and of great use for these products, being these products necessary for the existence of the human longevity, in order to avoid some diseases caused so much for free radicals, as microorganisms. Free radicals can cause cell death and aging and the development of degenerative diseases such as cataract, emphysema, diabetes and cancer. Already the microbes, can cause from a simple flu to diseases that lead to death. The essential oil from the leaves of the Tahiti lime (*Citrus Latifolia Tanaka.*) is a natural substance of low added value, but with a high diversity of uses and properties. Therefore, the present work had as objective the extraction of essential oil from *Citrus latifolia tanaka*, Tahiti lemon, through the hydrodistillation method, as well as evaluate the circadian variation of its chemical composition and analysis of the antioxidant capacity with DPPH method (2,2-Diphenyl-1-picryl-hydrazil) and antimicrobial. The work used a lookalike Clevenger system for extraction of essential oil, volatile analyses were made using a gas chromatograph coupled to a mass spectrometer (GC/MS), having as a result the presence of Limonene, Citral and β -Citral as major components of the essential oils, as well as its circadian variations, antioxidant activity assessments were made in accordance with the principles of Andrade, showing a low inhibition of free radicals in all analyzed concentrations and antimicrobial activities were made by disk diffusion technique front of strains of gram-negative bacteria, with the results of a low effectiveness in combating the growth of the bacterium *Escherichia coli*. The present study sought to obtain results that would influence in new research on the essential oil from the leaves of *Citrus Latifolia Tanaka*. Being, a way to expand their possibilities of its use.

Keywords: Essential Oil, *Citrus Latifolia Tanaka*, Antioxidant, Antimicrobial.

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1: Valores do rendimento dos óleos essenciais extraídos em cada horário | 29 |
| Tabela 2: Variação circadiana da composição química dos óleos essenciais | 29 |
| Tabela 3: Índice de inibição pelo método DPPH | 31 |
| Tabela 4: Inibição bacteriana provocada pelos óleos essenciais do limão frente a bactéria <i>Escherichia coli</i> . | 32 |

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | |
|--|----|
| Figura 1: Árvore de <i>Citrus Latifolia Tanaka</i> | 16 |
| Figura 2: Limões Taiti em processo de amadurecimento | 17 |
| Figura 3: Exemplo de um radical livre..... | 18 |
| Figura 4: Ação do antioxidante frente ao radical livre..... | 19 |
| Figura 5: Estrutura química do limoneno..... | 21 |
| Figura 6: Estrutura química do citral..... | 21 |
| Figura 7: Estrutura química do β -Citral | 21 |
| Figura 8: Preparação da cultura bacteriana na concentração desejada..... | 25 |
| Figura 9: Inoculação da bactéria <i>Escherichia coli</i> no meio | 25 |
| Figura 10: Inserção dos discos contendo os óleos essenciais e dos antibióticos padrões | 26 |
| Figura 11: Hidrodestilação por sistema de Clevenger | 27 |
| Figura 12: Óleo essencial extraído por sistema de clevenger | 28 |
| Figura 13: Óleos essenciais extraídos das folhas do limão coletadas em diferentes horários..... | 28 |
| Figura 14: Cromatograma da análise do óleo essencial de <i>Citrus Latifolia Tanaka</i> | 29 |
| Figura 15: Amostras aplicadas nos discos para leitura dos halos de inibição..... | 31 |
| Figura 16: Leitura dos Halos de inibição frente a bactéria <i>Escherichia coli</i> | 32 |

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1 INTRODUÇÃO | 13 |
| 2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA | 15 |
| 2.1 UTILIZAÇÃO DOS PRODUTOS NATURAIS..... | 15 |
| 2.2 CONSIDERAÇÕES BOTÂNICAS DO LIMÃO TAITI (<i>CITRUS LATIFOLIA</i> <i>TANAKA.</i>)..... | 16 |
| 2.3 RADICAIS LIVRES E SEUS EFEITOS NO ORGANISMO | 17 |
| 2.4 ANTIOXIDANTES X RADICAIS LIVRES | 18 |
| 2.5 A IMPORTÂNCIA DOS AGENTES ANTIMICROBIANOS..... | 19 |
| 2.6 ÓLEO ESSENCIAL DO LIMÃO TAITI (<i>CITRUS LATIFOLIA</i> <i>TANAKA</i>) COMO ANTIOXIDANTE E ANTIMICROBIANO NATURAL | 20 |
| 3 MATERIAIS E MÉTODOS | 22 |
| 3.1 EXTRAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>CITRUS LATIFOLIA</i> <i>TANAKA.</i> | 22 |
| 3.2 ANÁLISE DOS VOLÁTEIS POR CG-EM. | 22 |
| 3.3 AVALIAÇÃO DA VARIAÇÃO CIRCADIANA..... | 23 |
| 3.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE..... | 23 |
| 3.5 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIMICROBIANA ATRAVÉS DA TÉCNICA DE DISCO DIFUSÃO..... | 24 |
| 3.5.1 Preparação do meio de cultura | 24 |
| 3.5.2 Preparação da atividade antimicrobiana | 24 |
| 4 RESULTADOS E DISCUSSÕES | 27 |
| 5 CONCLUSÃO | 34 |
| REFERÊNCIAS | 35 |

1 INTRODUÇÃO

A descoberta dos fármacos foi de grande relevância para a população mundial, tendo sido de grande importância para amenizar os óbitos na segunda guerra mundial. No Brasil, o desenvolvimento inicial da indústria farmacêutica guarda forte relação com a instituição da saúde pública, das práticas sanitárias de prevenção e combate às doenças infecciosas e, em especial, com as instituições de pesquisa básica e aplicada (RIBEIRO, E; TAKAGUI, 2000).

Entretanto, desde muito antes de tais descobertas da medicina avançada, o homem já buscava na natureza maneiras de aliviar dores e curar doenças. Segundo Sousa *et al.* (2011), e Geary *et al.* (2012) as práticas terapêuticas envolvendo produtos naturais servem para o tratamento de diversas enfermidades, tendo sido enfatizadas com a descoberta de novos medicamentos pela indústria farmacêutica. A busca por essas substâncias capazes de combater radicais livres e microrganismos se tornou alvo de diversas pesquisas, tendo em vista que os mesmos podem causar diversas doenças.

Detendo da mais rica biodiversidade mundial, o Brasil apresenta diversas plantas tropicais que servem como matéria prima para a produção de analgésicos, antitérmicos, tranquilizantes, antissépticos e antibióticos, entre outros produtos de origem natural. Parte desta diversidade de espécies ainda não foi investigada em relação as suas potencialidades terapêuticas, embora este seja um processo que vem evoluindo significativamente (SIMÕES *et al.*, 2003; OLIVEIRA *et al.*, 2009; CARTAXO *et al.*, 2010).

Dentre as diversas plantas medicinais brasileiras, pode ser citada a lima ácida Taiti (*Citrus latifolia Tanaka*), conhecida como limão Taiti. Segundo Coelho (1993, apud JUNQUEIRA, 2009), essa espécie de limão tem origem tropical e exploração econômica relativamente recente, admite-se, que a planta tenha recebido esse nome por ter tido origem de sementes importadas do Taiti.

De acordo com Viana (2010), o limão Taiti destaca-se no Brasil como uma das frutas cítricas de maior importância comercial. Segundo dados do IBGE, a produção de limão Taiti está em ascensão no país: de 2011 para 2016, o volume de limões e limas produzido se elevou em 12%, totalizando 1,26 milhão de toneladas, dando ao país o título de maior exportador da fruta à União Europeia. Além do uso da fruta em si, desse limão pode-se obter um óleo

essencial, que segundo Pires *et al.* (2012) é comumente utilizado por indústrias de bebidas, refrigerantes, cosméticos, essências aromáticas e culinária, entre outras.

Para Steffens (2010), o Brasil aparece entre os principais países fornecedores dos óleos essenciais de laranja, limão, lima e outros cítricos, contribuindo com 5% do total de óleos importados e encontra-se entre os grandes exportadores internacionais. Esses óleos essenciais também estão diretamente relacionados a diversas funções pertinentes a sobrevivência das plantas, exercendo papéis como defesa contra microrganismo (LIMA, *et al.*, 2006).

A composição química do óleo essencial extraído de uma planta pode variar, de acordo com a parte da planta de que foi extraído, período do ano, horário e condições climáticas. Segundo Lourenço (2012), apenas em algumas espécies de plantas tiveram estudos detalhados sobre a influência da variação circadiana na composição química de seus óleos essenciais. Essas informações são de fundamental importância para a determinação do potencial medicinal, já que a constituição química de uma planta medicinal está intimamente ligada à sua atividade biológica (CALIXTO, 2000; SAKAMOTO *et al.*, 2005).

Assim, pensando nas diversas propriedades apresentadas pelo limão, e no óleo essencial extraído das folhas dessa planta, tal estudo tem por objetivo, refletir sobre a variação circadiana da composição química do óleo essencial extraído das folhas do limão Taiti, bem como sua utilização no combate a radicais livres e microrganismos que podem causar inúmeros problemas para a saúde. Podendo assim, gerar um melhor aproveitamento desta fonte natural, de baixo custo e de utilidade reduzida, com a finalidade de entendê-lo como considerável substituinte na indústria farmacêutica, tendo em vista que as folhas das podas de plantas acabam indo parar no lixo.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 UTILIZAÇÃO DOS PRODUTOS NATURAIS

O uso dos produtos naturais desempenhou desde tempos remotos um importante papel na cura de doenças, sendo relatados seus benefícios e aplicações em diversas civilizações. Segundo Rezende e Cocco (2002), seus usos pelas populações datam de mais de sessenta mil anos, sendo as primeiras descobertas feitas por estudos arqueológicos em ruínas do Irã.

No Egito antigo já se utilizavam espécies como a anis (*Illicium verum*), alcaravia (*Carum carvi*), cardamomo (*Elletaria cardamomum*), açafrão (*Cúrcuma longa*), sementes de papoula (*Papaver rhoeas*) e extrato obtido da casca do salgueiro (*Salix*), no tratamento de problemas respiratórios e gases, problemas digestivos, mal hálito, dores estomacais, sedativos e anestésicos e no combate a inflamações respectivamente.

Segundo Cunha (2005), Garcia *et al.* (1995) e Pelt (2004), registros cuneiformes sumérios e babilônicos, escritos por ordem do Rei Assurbanipal, descrevem detalhadamente os usos e aplicações de espécies vegetais ou produtos derivados como o ópio (*Papaver somniferum L.*), galbano (*Ferula galbaniflua Boiss & Buhse*), assafetida (*Ferula assafoetida L.*), meimendro (*Hyoscyamus niger L.*) e mandrágora (*Mandragora officinalis L.*)

No Brasil também é muito comum o uso de produtos naturais como agentes terapêuticos pela medicina popular, prática essa que teve início nas tribos indígenas com os pajés e se intensificou com os comércios marítimos que importavam e exportavam especiarias. Na carta de Caminha, por exemplo, são citadas espécies vegetais e seus usos, dentre estas o urucum (*Bixa orellana L.*) (FILGUEIRA; PEIXOTO, 2002), sendo utilizado pelos índios por possuir propriedades digestivas e cicatrizantes. O urucum também era utilizado para produção de uma tinta vermelha com a qual os indígenas pintam seus corpos, esta tinta possui propriedades contra os raios UVA e UVB. Tal propriedade tem sido atribuída aos tocotrienóis presentes no urucum, que protegem os queratinócitos dos danos causados pelos raios UVB ao DNA (GLÓRIA, 2006).

Ao longo dos anos o conhecimento sobre plantas medicinais foi sendo repassado pelas gerações, que começaram a utilizar cada vez mais plantas para diversos fins terapêuticos. São comuns o uso da infusão da casca do limão (*Citrus Limonium*) para regular a pressão arterial e combater resfriados, bem como do chá da semente de sucupira (*Pterodon Emarginatus*) e das cascas de romã (*Punica Granatum*) no combate de amigdalites. Segundo Simões *et al* (1988), é importante ressaltar que:

“O saber popular pode fornecer dados importantes para novas descobertas científicas e as pesquisas acadêmicas podem originar novos conhecimentos sobre as propriedades terapêuticas das plantas. “

Em 2006, o Ministério da Saúde aprovou, pela Portaria nº 648, a Política Nacional de Atenção Básica que inclui as plantas medicinais no Sistema Único de Saúde (SUS) (Brasil 2006a). Com essa aprovação o número de pesquisas envolvendo plantas medicinais vem crescendo nos últimos anos, o que tem ocasionado em uma produção de fármacos naturais, que são menos agressivos tanto para a saúde humana quanto para o meio ambiente.

2.2 CONSIDERAÇÕES BOTÂNICAS DO LIMÃO TAITI (*CITRUS LATIFOLIA TANAKA*.)

O gênero o gênero *Citrus*, pertencente à família *Rutaceae*. Segundo Kaewsuksaeng *et al.* (2011), esse gênero conta com 16 espécies, é abundante em regiões tropicais e bastante conhecido pelas suas propriedades medicamentosas, devido à presença de compostos fenólicos, incluindo os flavonóides, que podem ser obtidos a partir das frutas e folhas da planta.

Dentre essas espécies podemos destacar a lima ácida *Citrus latifolia*, comumente chamada de limão Taiti. De acordo com Lorenzi *et al.* (2006), a árvore dessa espécie de limão tem altura variável de 4 a 6 metros, possui folhas simples, com textura semelhante a couro, sem pelos e brilhantes, de 3 a 7 cm de comprimento, apresenta também flores solitárias e botões levemente tingidos de púrpura, seus frutos são ovóides, de casca com vesículas de óleo, polpa suculenta, firme e muito ácida. A árvore de limão Taiti pode ser observada na Figura 1 a seguir:

Figura 1: Árvore de *Citrus Latifolia Tanaka*



Fonte: Autoria própria, 2018.

Ainda para Lorenzi *et al.* (2006), o crescimento e desenvolvimento dessa planta não exige qualidade diferenciada de solo, produzindo tanto em terras de areia como em argila. A mesma também é muito sensível ao frio, às geadas e às altas temperaturas, mais do que a

laranjeira, a toranjeira e a tangerineira. Os frutos da planta podem ser observados na Figura 2 a seguir:

Figura 2: Limões Taiti em processo de amadurecimento



Fonte: Autoria própria, 2018.

O *Citrus latifolia* é comumente usado *in natura* ou sob a forma de suco (FAO, 2008). O suco de lima tem diferentes aplicações, se destacando como condimento, aromatizante para saladas, acidulante e na fabricação de limonadas. Segundo Viana (2010), essa lima é utilizada, ainda, para prevenir o escurecimento em frutas frescas utilizadas em xaropes e em conservas vegetais pela presença de ácido cítrico.

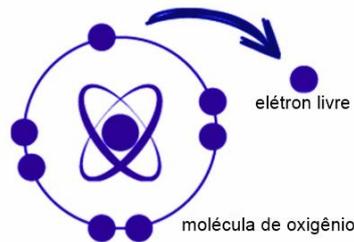
Do limão Taiti pode ser extraído um óleo essencial que segundo Cassini (2010), possui várias aplicações nas indústrias alimentícia, farmacêutica e cosmética, além de apresentar uma fragrância altamente estimada em composições para aromas e sabores. Conseqüentemente esse óleo tem um maior valor comercial quando comparado a outros óleos obtidos de cítricos, por exemplo, ao óleo de laranja. O valor elevado do óleo essencial de limão Taiti justifica investimentos na utilização de tecnologias que possam aumentar os rendimentos de extração sem a perda de qualidade do óleo (GRINGS, 2004).

2.3 RADICAIS LIVRES E SEUS EFEITOS NO ORGANISMO

Segundo Halliwell (1994), os radicais livres, também denominados de substâncias reativas, são moléculas orgânicas e inorgânicas e os átomos que contêm um ou mais elétrons não pareados, com existência independente. Em geral, esses radicais podem ainda ser chamados de ERO (espécies reativas de oxigênio) (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999; DAMASCENO *et al.*, 2002). Pois, em organismos aeróbicos são derivados do metabolismo natural do oxigênio (O₂), da própria respiração. O que os torna parte da bioquímica normal do organismo apresentando funções benéficas de defesa contra invasores como fungos, vírus e

bactérias. Entretanto, em altas concentrações, danificar organelas celulares, ácidos nucleicos, lipídeos e proteínas (VALKO *et al.*, 2007). A figura 3 a seguir, exemplifica como é um radical livre.

Figura 3: Exemplo de um radical livre



Fonte: Autoria própria, 2018.

Em decorrência aos danos causados pelos radicais livres citados anteriormente, quando suas quantidades estão elevadas no organismo, estas moléculas e átomos iniciam ataques contra o corpo humano podendo acarretar em diversos efeitos prejudiciais, entre eles, doenças como aterosclerose, inflamação, câncer, entre outras, podendo ser por fontes endógenas ou exógenas (ARUOMA, 2003).

De acordo com Bagchi (*et al.*, 2000), um fator bastante relevante para esse aumento nos radicais livres do organismo é a constante exposição humana a diversos poluentes ambientais, incluindo pesticidas agrícolas, resíduos químicos tóxicos, cigarro, poluentes do ar nas zonas urbanas, radiação e estresse, devido às enormes quantidades de radicais livres deles resultantes.

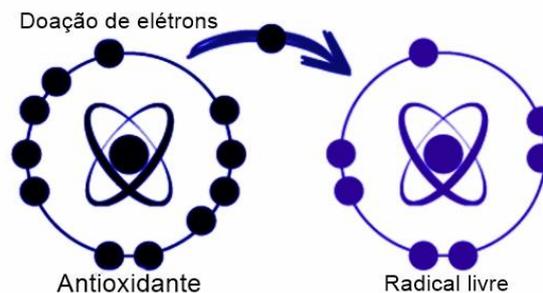
Segundo Anderson (1996) e Yu e Anderson (1997), os radicais livres podem ser gerados no citoplasma, nas mitocôndrias ou na membrana e o seu alvo celular (proteínas, lipídeos, carboidratos e DNA) está relacionado com o seu sítio de formação seu potencial de dano e a capacidade do organismo de combater seus efeitos.

2.4 ANTIOXIDANTES X RADICAIS LIVRES

Na tentativa de combater os efeitos nocivos causados pelos altos índices de radicais livres no organismo, se iniciaram as pesquisas em busca de substâncias antioxidantes. Podendo estes, segundo Haliwell (2001) *et al.* Sousa (2007), ser definidos como substâncias capazes de retardar ou inibir a oxidação de substratos oxidáveis, sendo os mesmos enzimáticos ou não enzimáticos, tais como: α -tocoferol (vitamina E), β -caroteno, ácido ascórbico (vitamina C) e os compostos fenólicos.

Sabendo dessa capacidade inibitória frente aos radicais livres foram desenvolvidos os antioxidantes em capsulas contendo as vitaminas e flavonoides necessários para evitar ou auxiliar no tratamento de doenças ocasionadas pelos radicais livres, os mesmos são comercializados em farmácias e devem ser consumidos na dosagem indicada por um médico ou nutricionista, de acordo com as necessidades de cada paciente. Um exemplo de como o antioxidante age contra os radicais livres pode ser visto na figura 4 a seguir:

Figura 4: Ação do antioxidante frente ao radical livre



Fonte: Autoria própria, 2018.

Os benefícios de uma alimentação com forte presença de frutas, vegetais e seus derivados sempre foram evidentes para a sociedade. Pois, além de não possuírem conservantes ou corantes químicos, estes alimentos são ricos em diversas vitaminas, minerais e até mesmo substâncias antioxidantes. Várias evidências indicam que diversos componentes antioxidantes, que não apenas vitaminas e minerais, contribuem na proteção oferecida por frutas e vegetais ao dano oxidativo (BUTERA *et al.* 2002; KUBOLA *et al.* 2011).

Existem ainda, vários estudos que relatam a presença de antioxidantes em diversos derivados de produtos naturais. Segundo Shahidi *et al.* (2010), os frutos, legumes, cereais, chás, café e cacau são fontes ricas em antioxidantes (vitaminas, compostos fenólicos e carotenoides) os tornando assim, ótimos aliados naturais contra os efeitos nocivos provocados por radicais livres no organismo humano.

2.5 A IMPORTÂNCIA DOS AGENTES ANTIMICROBIANOS

Os agentes antimicrobianos são de suma importância para a saúde humana, visto que, os mesmos são utilizados para prevenir e/ou tratar infecções causadas por microrganismos que são responsáveis por elevados índices de mortalidade.

Após a segunda metade do século XIX, cientistas como Robert Koch identificaram micro-organismos responsáveis por doenças como tuberculose, cólera e febre tifoide. Segundo Grohmann *et al.* (2003), os antimicrobianos foram introduzidos na década de 50 para o tratamento de doenças bacterianas e até os dias atuais combatem diversos tipos de infecções. O

consumo indiscriminado de antibióticos o tornou um dos fármacos mais vendidos em todo o mundo (VAN BOECKEL *et al.*, 2014). Esse consumo tão elevado de tal fármaco fez com que surgissem bactérias resistentes a esses compostos, o que pode acabar acarretando em uma segunda era pré-antibiótico.

Diante disso, se faz necessário a busca por antimicrobianos de origem natural e seus derivados semissintéticos, que podem ser classificados em β -lactâmicos (penicilinas, cefalosporinas, carbapeninas, oxapeninas e monobactamas), tetraciclina, aminoglicosídeos, macrolídeos, peptídicos cíclicos (glicopeptídeos, lipodepsipeptídeos) (GUIMARAES; MOMESSO e PUPO; 2010.).

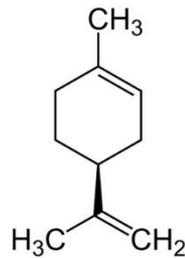
2.6 ÓLEO ESSENCIAL DO LIMÃO TAITI (*CITRUS LATIFOLIA TANAKA*) COMO ANTIOXIDANTE E ANTIMICROBIANO NATURAL

Na flora brasileira podemos encontrar inúmeras plantas com propriedades antioxidantes, neste cenário podemos destacar o *Citrus Latifolia Tanaka*, comumente chamado de limão Taiti, é originária de sementes vindas do Taiti e possui propriedades que auxiliam no tratamento de gripes e deficiência de vitamina C. De acordo com Ramos *et al.* (2003), pode ainda, ser utilizado para curar e prevenir resfriados, obesidade, gota, reumatismo, náuseas, escorbuto, como vermífugo e na cura de aftas e frieiras (devido à sua ação cicatrizante).

O óleo essencial obtido a partir do limão Taiti é uma mistura complexa de D-limoneno, γ -terpineol, citral, linalol e β -cariofileno, entre outros. (GAMARRA; SAKANAKA; TAMBOURGI e CABRAL, 2006).

Dentre os diversos produtos que tem como matéria prima essa espécie de limão, seu óleo essencial se mostra bastante significativo. Segundo Garcia (1998), o óleo essencial de *Citrus latifolia tanaka* tem sido utilizado desde os tempos antigos, por seu anti-séptico, efeitos carminativos, diuréticos e eupépticos. De acordo com Bento, Marcon e Dutra *et al.* (2011), alguns de seus compostos, incluindo cariofileno, limoneno e linalol, têm efeitos anti-inflamatórios, enquanto que α -pineno e β -pineno inibem a síntese de óxido nítrico (NO), sugerindo efeito antioxidante e relatos recentes mostraram que o pineno exerce um efeito antiespasmódico. Sendo que o principal constituinte do óleo essencial de *Citrus Latifolia Tanaka* é o Limoneno, apresentado na Figura 5 a seguir:

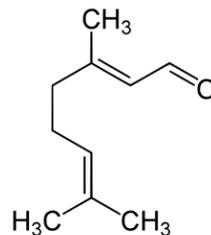
Figura 5: Estrutura química do limoneno.



Fonte: Própria autora, 2018.

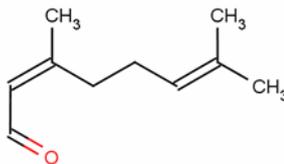
Entretanto, quando esse óleo essencial é extraído das folhas, os componentes majoritários passam a ser três o Limoneno, já citado anteriormente, citral e β -Citral. Os componentes citral e β -Citral podem ser observados nas figuras 6 e 7 a seguir:

Figura 6: Estrutura química do citral.



Fonte: Autoria própria, 2018.

Figura 7: Estrutura química do β -Citral



Fonte: Autoria própria, 2018.

O uso de óleos essenciais de cítricos como o limão Taiti tem ganhado importância devido ao fato de apresentarem componentes naturais e evitarem o uso de aditivos sintéticos, para combater oxidações e o ataque de microrganismos. Sendo assim, segundo Pereira (2006), demonstram eficiência nas funções antioxidantes e antimicrobianas.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 EXTRAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *CITRUS LATIFOLIA TANAKA*.

As extrações dos óleos essenciais foram realizadas a partir de folhas coletadas em quatro horários de dias distintos, sendo eles: 7:00h, 9:00h, 11:00h e 18:00h, utilizando um sistema tipo Clevenger. Para cada extração, 200 g das folhas frescas de *Citrus Latifolia* foram pesados e adicionadas em balão de fundo redondo com capacidade de 2,0 litros. Foi utilizado um volume de água destilada suficiente, para submergir o material vegetal. Este procedimento foi realizado em triplicata.

O tempo de extração dos óleos essenciais durou 2,0 horas, os quais foram separados, secos com sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4), filtrados e armazenados em freezer ao abrigo da luz. Cada frasco de óleo essencial foi identificado por uma etiqueta com sigla O.E.L.T (óleo essencial de limão Taiti), seguido pelo horário de coleta das folhas. Para avaliar o rendimento do óleo essencial extraído, foi obtida a porcentagem de rendimento em massa, de acordo com a equação:

Eq 1

$$R(\%) = \left(\frac{MO}{MV} \right) \cdot 100$$

Onde:

MO = Massa do óleo extraída, g;

MV = Massa do material vegetal, g;

3.2 ANÁLISE DOS VOLÁTEIS POR CG-EM.

Após o processo de extração, os óleos essenciais foram analisados, por um Cromatógrafo Gasoso Acoplado ao Espectrômetro de Massa (CG-EM). Para isso, foram preparadas uma solução de cada amostra contendo 10 μL de óleo essencial em 1 mL de diclorometano. As análises foram realizadas em um CG-EM da marca Shimadzu® (modelo GCMS - QP 2010) utilizando uma coluna capilar Rtx®-MS, fase estacionária 5% difenildimetilsiloxano de 20 metros de comprimento, diâmetro interno de 0,18 mm e com espessura de filme de 0,40 μm (J&W Scientific®).

A programação de aquecimento do forno cromatográfico estabelecida, foi de 40 °C (3 minutos) → 3°C/minuto até 290 °C (4 minutos). Os parâmetros instrumentais utilizados foram: temperatura do injetor de 250 °C; modo de injeção split de 1:10; vazão volumétrica da fase móvel de 0,59 mL/minuto; temperatura da interface de 300 °C; análises realizadas no modo SCAN em uma faixa de 18 a 400 m/z (em intervalos de 0,5s e com energia de ionização de 70 eV); temperatura do detector de 250 °C.

3.3 AVALIAÇÃO DA VARIAÇÃO CIRCADIANA

A avaliação da variação circadiana, que consistiu em avaliar as substâncias presentes na composição química dos óleos essenciais de *Citrus Latifolia Tanaka* extraídos de folhas coletadas em diferentes dias e horários (7:00h, 9:00h, 11:00h e 18:00h) do mês de novembro e se há ou não variação dessa composição, ou seja, se ao longo do dia a composição tem variação significativa de seus constituintes. Se deu através do estudo dos Cromatogramas obtidos através da análise dos voláteis por CG-EM.

Posteriormente, os resultados comparativos obtidos foram organizados em tabela para uma melhor compreensão da variação observada no decorrer do dia.

3.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

A avaliação da atividade antioxidante dos óleos essencial de *Citrus Latifolia Tanaka*. Foi desenvolvida de acordo com a metodologia de Andrade et al. (2007).

As amostras de óleos essenciais de limão Taiti, foram diluídas em metanol nas concentrações de 1000ppm, 900ppm, 800ppm, 700ppm, 600ppm, 500ppm, 400ppm, 300ppm, 200ppm e 100ppm. A cada 1 mL de cada amostra devem ser acrescentados 3 mL de solução 1,1-difenil-2-picril-hidrazina (DPPH) 1 MMol. Após 30 min de incubação à temperatura ambiente e ao abrigo da luz, a redução do radical livre DPPH foi medida pela leitura da absorbância em 517 nm, contra um branco específico (solução da amostra em suas respectivas diluições, sem adição de DPPH) em cada avaliação. Como controle se utilizou 3 mL de solução DPPH 1 MMol em 1 mL de metanol.

Para avaliar a atividade captadora do radical, foi obtida a porcentagem de inibição, de acordo com a equação:

Eq. 2

$$I(\%) = 100. \left(1 - \frac{Abs(amostra)}{Abs(DPPH)}\right)$$

Em que: Abs. (amostra) = Absorvância da amostra com o DPPH.

Abs. (DPPH) = Absorvância da solução de DPPH sem a amostra.

A determinação da concentração de amostra ou padrão que causa 50% de inibição da concentração (CI₅₀) inicial de DPPH foi obtida por regressão linear dos pontos plotados graficamente. Para a plotagem dos pontos, foram utilizados os valores das médias obtidas de triplicatas realizadas para cada uma das substâncias.

3.5 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIMICROBIANA ATRAVÉS DA TÉCNICA DE DISCO DIFUSÃO

A atividade antimicrobiana do óleo essencial do limão Taiti foi realizada inicialmente pela técnica de disco difusão que consiste em medir a zona de inibição formada em torno da substância avaliada.

3.5.1 Preparação do meio de cultura

O meio Ágar Mueller- Hinton é um meio sólido padronizado, recomendado para a realização de testes antimicrobianos. O mesmo foi preparado seguindo a metodologia de padronização Kirby e Bauer, 1996, e pelo NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards).

Foi medido a massa de 35 g de meio de cultura para 1 L de água destilada, em seguida adicionado em um erlenmeyer de 1L. Para a homogeneização do meio de cultura, colocou-se o mesmo em banho maria até a diluição do sólido e ao término do procedimento, o meio foi autoclavado. Em seguida, foi colocado em placa de petri (50 mL do meio) e posto na geladeira envolto de papel filme para conservação.

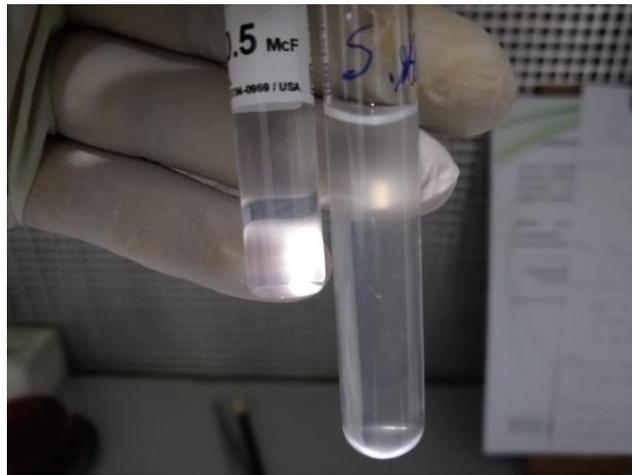
3.5.2 Preparação da atividade antimicrobiana

Foi utilizada a bactéria Gram-negativa *Escherichia coli*, para o experimento. A mesma foi preparada seguindo o manual para atividade antibiograma de Kirby; Bauer, 1996. Para a replicação da bactéria o meio de cultura já preparado, foi retirado da geladeira 20 minutos antes para obter temperatura ambiente e evitar qualquer dano na bactéria. Com o auxílio de um swab,

a bactéria foi retirada da cepa e aplicada suavemente sobre o meio de cultura, logo após, levada à estufa de modelo 502 FANEM por um período de 24 horas a uma temperatura de 35°C.

Ao passar o período de 24 horas iniciou-se o teste bacteriológico, em que a mesma foi retirada da placa com auxílio de uma alça em platina devidamente flambada e resfriada. Em seguida, transferida para um tubo de ensaio (Figura 8) contendo solução salina (NaCl 0,85%) para diluição até atingir entre 0,08 e 1 em espectrofotômetro à 625 nm.

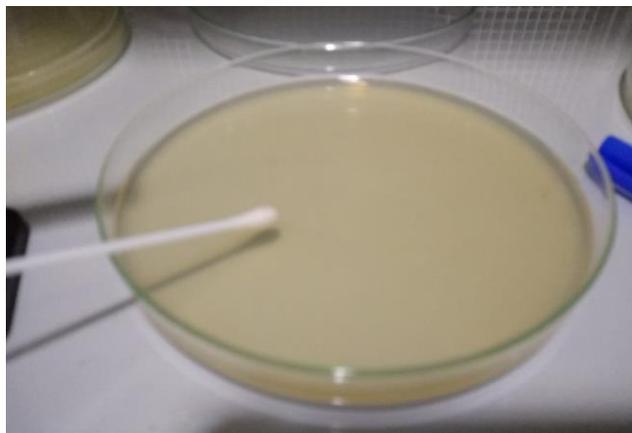
Figura 8: Preparação da cultura bacteriana na concentração desejada.



Fonte: Autoria própria, 2018

Ao fim deste processo, embebeu-se um swab na suspensão bacteriana comprimindo-a no próprio tubo de ensaio para evitar o excesso de material, aplicou-se em movimentos uniformes sobre o meio de cultura (Figura 9) até que toda superfície fosse preenchida.

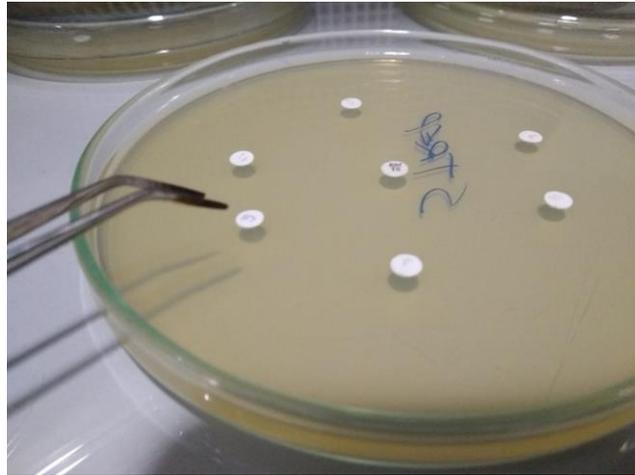
Figura 9: Inoculação da bactéria *Escherichia coli* no meio



Fonte: Autoria própria, 2018

Após a secagem do meio, foram aplicados discos contendo amostras do óleo essencial de limão Taiti em concentrações de 2000ppm, juntamente com o controle positivo (Eritromicina e tetraciclina-30mcg) (figura 10), e como solvente o DMSO em concentração de (100mg/mL).

Figura 10: Inserção dos discos contendo os óleos essenciais e dos antibióticos padrões



Fonte: Autoria própria, 2018

As placas com os discos já aplicados, foram levadas à estufa bacteriológica por 24 e 48 horas para posterior análise dos resultados (NCCLS, 2003).

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

As folhas de limão Taiti utilizadas na extração do óleo essencial vieram de uma cultivar familiar da cidade de Apodi-RN.

O processo de extração dos óleos essenciais foi realizado em triplicata através de hidrodestilação por sistema de Clevenger (Figuras 11 e 12), no qual obteve-se um rendimento entre 0,45% e 1,05 %, muito próximo da literatura descrita por Barros, Assis e Mendes (2014), na extração de óleo essencial de manjeriçã (*Ocimum basilicum L.*), na qual os autores explicam que o rendimento de óleo essencial por hidrodestilação não tem um rendimento tão alto quando comparado a outros métodos.

Figura 11: Hidrodestilação por sistema de Clevenger



Fonte: Autoria própria, 2018

Figura 12: Óleo essencial extraído por sistema de clevenger



Fonte: Autoria própria, 2018

Os óleos essenciais extraídos de folhas de *Citrus Latifolia* (Figura 13) coletadas em quatro horários de dias distintos, sendo eles: 7:00h, 9:00h, 11:00h e 18:00h foram secos com sulfato de sódio anidro e armazenados em frascos etiquetados com a sigla O.E.L.T (Óleo essencial de limão Taiti) no freezer.

Figura 13: Óleos essenciais extraídos das folhas do limão coletadas em diferentes horários.



Fonte: Autoria própria, 2018

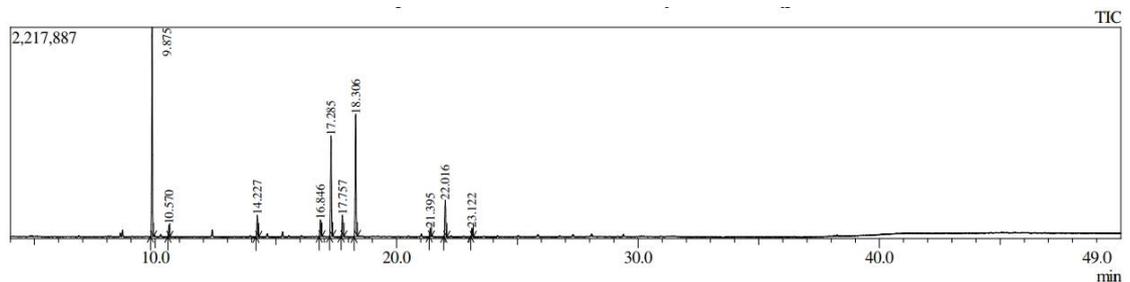
Os rendimentos obtidos em cada horário de extração (Tabela 1) demonstram que o horário que proporcionou melhor resultado foi o horário das 7:00h da manhã, tendo 1,05% de rendimento, seguido pelo horário das 9:00h da manhã, que apresentou rendimento de 1,03%.

Tabela 1: Valores do rendimento dos óleos essenciais extraídos em cada horário.

| Horário da coleta | (%) em massa do óleo |
|-------------------|----------------------|
| 7:00h da manhã | 1,05% |
| 9:00h da manhã | 1,03% |
| 11:00h da manhã | 0,47% |
| 18:00h da tarde | 0,88% |

Fonte: Autoria própria, 2018

Os óleos essenciais foram analisados em cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG-EM), cujo cromatograma pode ser visualizado na figura 14.

Figura 14: Cromatograma da análise do óleo essencial de *Citrus Latifolia Tanaka*.

Fonte: Autoria própria, 2018

Como resultado, foi possível observar a variação circadiana dos componentes presentes no óleo essencial estudado. Tais resultados podem ser observados na Tabela 2 a seguir:

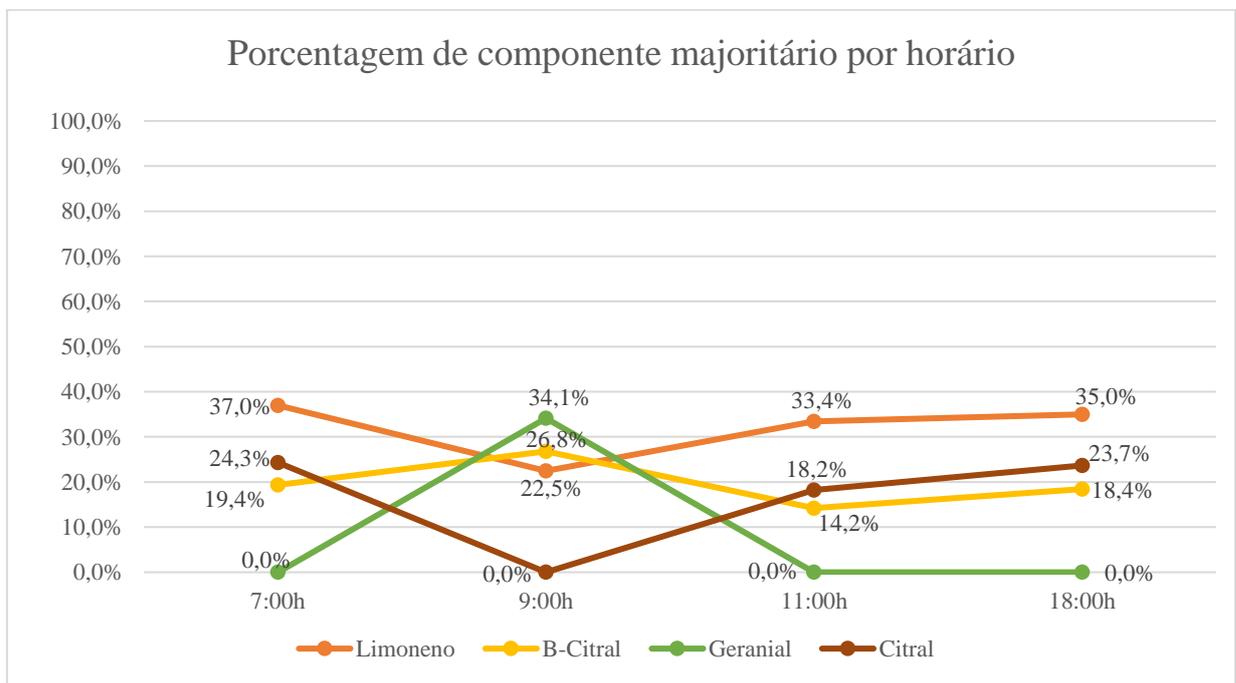
Tabela 2: Variação circadiana da composição química dos óleos essenciais

| Constituintes do óleo essencial | Horários de coleta/ Teor | | | |
|--|--------------------------|-------|--------|--------|
| | 7:00h | 9:00h | 11:00h | 18:00h |
| D- Limoneno | 37% | 22,5% | 33,4% | 35% |
| β -Ocymene- (Z) | 2,07% | 0,9% | 1,5% | 1,9% |
| Linalol | 1,5% | 1,5% | 0% | 0% |
| Citronelal- (R) | 2,4% | 3,5% | 2,8% | 3,9% |
| Cis-Geraniol | 3,6% | 2,4% | 6,7% | 3,3% |
| β -Citral | 19,4% | 26,8% | 14,2% | 18,4% |
| Acetato de 3,7-dimetil-trans-2,6-octadien-1-il | 0% | 0% | 0% | 1,46% |
| citral | 24,3% | 0% | 18,2% | 23,7% |
| Geraniol | 3,6% | 2,5% | 8,0% | 3,9% |
| Acetato de geraniol | 4,3% | 4,0% | 6,0% | 6,9% |
| cariofileno | 0% | 0% | 7,3 | 1,7% |
| Geraniol | 0% | 34,1% | 0% | 0% |
| 4-hidroxi-4-metilpentan-2-ona | 2,0% | 1,8% | 1,8% | 0% |

Fonte: Autoria própria, 2018

Como demonstrado na tabela 2, pode-se observar que houve uma variação circadiana significativa dos componentes presentes nos óleos essenciais estudados. Quando comparamos o limoneno presente no óleo essencial extraído de folhas coletadas às 7:00h e 9:00h da manhã, podemos perceber uma variação de 14,51% na composição, outro fator interessante em relação a esses dois horários de coleta é que no horário das 7:00h da manhã, o limoneno se mostra como componente majoritário, estando presente em 36,97% da composição do óleo, entretanto, no horário das 9:00h da manhã o componente majoritário passa a ser o geranial, estando presente em 34,12% da composição do óleo. Essas variações estão de acordo com a literatura descrita Leal (2001) e Moraes (2009), onde segundo os mesmos, as flutuações climáticas no decorrer do dia podem tornar o aroma característico de cada planta torna mais acentuado, implicando na alteração da proporção relativa entre os componentes dos óleos essenciais. O gráfico 1, a seguir, demonstra a variação em porcentagem dos componentes majoritários em diferentes horários de coleta.

Gráfico 1: Porcentagem de variação dos componentes majoritários em diferentes horários



Fonte: Autoria própria, 2018

Em relação aos testes realizados para avaliar a atividade antioxidante do óleo essencial de *Citrus Latifolia Tanaka* pelo método do DPPH não foram favoráveis em nenhuma concentração, ficando com um valor muito próximo ao do branco preparado com a solução de

DPPH, isso se deu devido ao óleo essencial não apresentar compostos fenólicos. Os resultados obtidos estão descritos na Tabela 3 a seguir:

Tabela 3: índice de inibição pelo método DPPH do óleo essencial.

| Concentração da amostra | I (%) |
|-------------------------|-------|
| Branco (DDP) | 0,294 |
| 1000ppm | 1,8% |
| 900ppm | 6,5% |
| 800ppm | 3,1% |
| 700ppm | 3,8% |
| 600ppm | -0,6% |
| 500ppm | -0,2% |
| 400ppm | -0,3% |
| 300ppm | 2,8% |
| 200ppm | 4,8% |
| 100ppm | 5,2% |

Fonte: Autoria própria, 2018

Para a avaliação antimicrobiana, foram aplicados ao meio de cultura contendo *Escherichia coli*, discos contendo amostras em volumes de 20µL dos óleos essenciais de folhas coletadas às 7:00h da manhã, 9:00h da manhã, 11:00h da manhã e 18:00h da tarde, juntamente antibióticos padrões (Figura 15) que serviriam como controle (Tetraciclina e Eritromicina), e como solvente o DMSO em concentração de (100mg/ml).

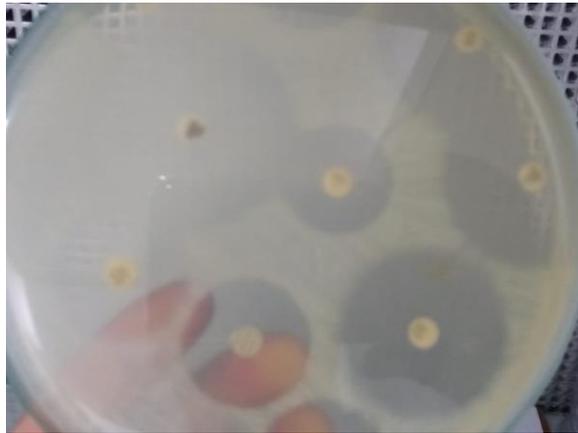
Figura 15: Amostras dos óleos essenciais e antibióticos aplicadas nos discos para leitura dos halos de inibição.



Fonte: Autoria própria, 2018

Logo após, a placa com os discos já aplicados, foi levada à estufa bacteriológica por 24 e 48 horas para posterior análise dos resultados. A placa retirada da estufa bacteriológica pode ser observada na figura 16 a seguir.

Figura 16: Leitura dos Halos de inibição dos óleos essenciais de limão Taiti frente a bactéria *Escherichia coli*.



Fonte: Autoria própria, 2018

Tal resultado mostrou que as variações circadianas do óleo essencial de limão Taiti apresentaram pequenos halos de inibição. Porém nenhum deles se aproximou do diâmetro dos halos de inibição apresentados pelos antibióticos padrões. Os resultados com os respectivos halos de inibição estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4: Inibição bacteriana provocada pelos óleos essenciais do limão frente a bactéria *Escherichia coli*.

| Material | Halo de inibição (mm) |
|-----------------|------------------------------|
| O.E.L.T | >7 mm à 9mm |
| Tetraciclina | 30mm |
| Eritromicina | 15mm |

Fonte: Autoria própria, 2018

Os dados da Tabela 4 mostram que os óleos essenciais avaliados não apresentaram eficácia considerável no combate ao crescimento da bactéria *Escherichia coli*, sendo que para ser um antibiótico com efeito moderado é esperado halo de inibição maior que 16mm. O halo de inibição demonstra o quanto determinada substância tem potencial de inibir o crescimento microbiano, sendo que de forma geral a literatura considera como substância com potencial antibacteriano moderado aquelas que exibem halos de inibição maior que 7mm e menor que

16. Já as substâncias que exibem halos superiores a 16mm são consideradas potenciais antibacterianos e as que apresentam halo menor que 7mm consideradas inativas (HAMED, MEHDAWI, *et al.*, 2013); (STILTS, BEZOTTE e FONTAINE, 2015).

Destaca-se também que a cepa em estudo demonstrou resistência inclusive a antibióticos comerciais, como a eritromicina, demonstrando que apesar do óleo essencial não ter apresentado resultado satisfatório para essa cepa no presente estudo pode ser útil no combate a outros microrganismos patogênicos.

5 CONCLUSÃO

Os óleos essenciais de *Citrus Latifolia Tanaka* evidenciaram variação circadiana em sua composição e uma baixa atividade oxidante e antimicrobiana frente a cepas de *Escherichia coli* pelos métodos analisados. Com o presente trabalho foi possível mostrar que o óleo essencial obtido de uma mesma planta pode ter composições variáveis dependendo do horário em que o material botânico é coletado, bem como seus possíveis usos na indústria farmacêutica, visto que a baixa inibição frente a uma bactéria como a *Escherichia coli*, não implica dizer que o óleo essencial de limão Taiti não seria eficaz frente a outras bactérias. Em resumo, conclui-se que devem haver mais estudos relacionados com a composição das plantas presentes em nosso bioma e sua inserção no mercado farmacológico, visando um melhor aproveitamento do que pode se tornar matéria prima de origem natural.

REFERÊNCIAS

- ANDERSON, D. **Antioxidant defences against reactive oxygen species causing genetic and other damage.** Mutation Research, Amsterdam, v.350, n.1, p.103-108, 1996.
- ANDRADE, CA; COSTA, CK; BORA, K; MIGUEL, MD; MIGUEL, OG; KERBER, VA **Determinação do mercado fenólico e avaliação da atividade antioxidante de Acácia podalyriifolia A. Cunn. ex. G. Don Leguminosae-Mimosoidea.** Rev. Bras. Farmacogn., v.17, n.2, p.231-235, 2007.
- ARUOMA, O.I. **Methodological considerations for characterizing potential antioxidant action of bioactive components in plant foods.** Mutation Research, v. 523, p. 9-20, 2003.
- BAGCHI D., BAGCHI M., STOHS S. J., DAS D. K., RAY S. D., KUSZYNSKY C. A., JOSHI S. S. E PRUESS H. G. **Free radicals and graped seed proanthocyanidin extract: importance in human health and disease prevention.** Toxicology n.148, p.187-197, 2000.
- BAUER AW, KIRBY WMM, SHERRIS JC, TURCK M. **Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method.** Am J Clin Pathol. 1966;45:493-496.
- BARROS, Nídia Alves de; ASSIS, André von Randow de and MENDES, Marisa Fernandes. **Extração do óleo de manjeriço usando fluido supercrítico: análise experimental e matemática.** Cienc. Rural, vol.44, n.8, pp.1499-1505,2014.
- BENTO, Allisson Freire ; MARCON, Rodrigo ; DUTRA, Rafael Cypriano et al. **β -caryophyllene inhibits dextran sulfate sodium-induced colitis in mice through CB2 receptor activation and PPAR γ pathway.** American Journal of Pathology, vol. 178, no. 3, pp. 1153–1166, 2011.
- BUTERA, D, TESORIERE, L, DI GAUDIO, F, BONGIORNO, A, ALLEGRA, M, PINTAUDI, AM, KOHEN, R, LIVREA, MA. **Antioxidant activities of Sicilian prickly pear (*Opuntia ficus indica*) fruit extracts and reducing properties of its betalains: Betanin and indicaxanthin.** Journal of Agricultural and Food Chemistry. (50), 6895-901. 2002.
- CALIXTO, J.B.; **Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents).** Braz. J. Med. Biol. Res., 33, 179, 2000.
- CARTAXO, S.L.; SOUZA, M.M.A.; ALBUQUERQUE, U.P. **Medicinal plants with bioprospecting potential used in semi-arid northeastern Brazil.** Journal of Ethnopharmacology. v.131, p. 326-342, 2010.
- CASSINI, Juliane. **Utilização de enzimas para a obtenção de óleos essenciais e cumarinas da casca de citrus latifolia tanaka.** Dissertação (Mestrado) – Universidade de Caxias do Sul, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2010. 2010.
- CUNHA, A. P. **Aspectos históricos sobre plantas medicinais, seus constituintes ativos e fitoterapia.** ESALQ/USP, 2005.

DAMASCENO, D.C. et al. **Radicais livres, estresse oxidativo e diabete.** Diabetes Clínica, v.5, n.5, p.355-361, 2002.

FAO - **FOOD AGRICULTURE ORGANIZATION.** FAOSTAT Statistics database, Agriculture, Rome, Italy, p. 52-58, 2008.

FILGUEIRA T. S.; PEIXOTO, A. L. **Flora e vegetação do Brasil na carta de caminha.** Acta Botanica Brasilica, v. 16, n. 3, p. 263-272, 2002.

GARCIA, E. S. **Biodiversidade, Biotecnologia e Saúde.** Cadernos de Saúde Pública, v. 11, n. 3, p. 491-494, 1995.

GAMARRA, FMC ; SAKANAKA, LS ; TAMBOURGI, EB e CABRAL, FA . **Influência na qualidade do óleo essencial de limão (*Citrus aurantifolia*) por processo de destilação .** Braz. J. Chem. Eng. [conectados]. vol.23, n.1, pp.147-151, 2006.

GEARY, T.G.; CHIBALE, K.; ABEGAZ, B.; MAROBELA, K.A.; UBALIJORO, E. **A new approach for anthelmintic discovery for humans.** Trends in Parasitology, v. 28, n. 5, p. 176-181, 2012.

GLÓRIA, M.B.A. **Potencial de utilização do urucum.** In: SIMBRAU-Simpósio Brasileiro do Urucum. 2006, João Pessoa. Anais. Palestras. Disponível em CD Room. João Pessoa, 2006.

GRINGS, Marcelo. Boer. **Estudo do comportamento de fases dos óleos essenciais de limão Taiti e bergamota e CO2 supercrítico.** Tese de Mestrado, Universidade Regional Integrado Alto Uruguai e das Missões, Erechim. 2004.

GROHMANN E, MUTH G, ESPINOSA M. **Conjugative Plasmid Transfer In Gram-Positive. Bacteria microbiology and molecular biology.** Microbiology and Molecular Biology Reviews, v. 67, n. 2, p. 277-301, 2003.

GUIMARAES, Denise Oliveira; MOMESSO, Luciano da Silva e PUPO, Mônica Tallarico . **Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes .** Quim. Nova, vol.33, n.3, pp.667-679, 2010.

HALLIWELL, B. **Free radicals and antioxidants: a personal view.** Nutrition Reviews, New York, v.52, n.8, p.253-265, 1994.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Lipid peroxidation: a radical chain reaction.** In: _____. Free radical in biology an medicine. New York: Oxford University, p.189- 276, 1999.

HAMED, O. A. et al. **Synthesis and Antibacterial Activity of Novel Curcumin Derivatives Containing Heterocyclic Moiety.** Iranian Journal of Pharmaceutical Research, v 12, 47-56. 2013.

JUNQUEIRA, Livia Pereira. **FENOLOGIA E CARACTERÍSTICAS FÍSICAS DA LIMA ÁCIDA 'TAHITI' CULTIVADA SOB IRRIGAÇÃO NO DISTRITO FEDERAL.** 2009. 105 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Mestrado em Ciências Agrárias, Universidade de Brasília Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Brasília, 2009.

KAWSUKSAENG, S.; URANO, Y.; AIAMLA-OR, S.; SHIGYO, M.; YAMAUCHI, N. **Effect of UV-B irradiation on chlorophyll degrading enzyme activities and postharvest quality in stored lime (*Citrus latifolia* Tan.) fruit.** *Postharvest Biology and Technology*, v. 61, p. 124–130, 2011.

KUBOLA, J., SIRIAMORNUN, S., MEESO, N. **Phytochemicals, vitamin C and sugar content of Thai wild fruits.** *Food Chemistry*, v. 126, n. 3, p.972-981. 2011.

LEAL, T. C. A. B.; FREITAS, S. P.; SILVA, J. F. S.; CARVALHO, A. J. C. **Avaliação do efeito da variação estacional e horário de colheita sobre o teor foliar de óleo essencial de capim cidreira (*Cymbopogon citratus* (DC) Stapf.).** *Revista Ceres*, v.48, n.455, p.445-54, 2001.

LIMA, V.L.A.G, MELO, E.A, LIMA, D.E.S.L. **Teor de compostos fenólicos totais em chás brasileiros.** *Braz J Food Technol*, v.7, p.187-190. 2004.

LIMA, I.O. et al. Atividade antifúngica e óleos essenciais sobre espécies de *Candida*. **Revista Brasileira Farmacognosia**, v.16, n.2, p.197-201, 2006.

LOURENÇO, Henrique Antonio de Oliveira. **Teor e composição química do óleo essencial de aristolochia cymbifera mart. & zucc. E byrsonima verbascifolia (L.) Rich. Ex juss: influência da variação sazonal e circadiana.** 2012. 80 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Mestrado em Ciências Agrárias, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – Câmpus Rio Verde, Rio Verde, 2012

LORENZI, H.; SARTORI, S.; BACHER, L.B.; LACERDA, M. **Frutas brasileiras e exóticas cultivadas.** São Paulo, Brasil, 581p, 2006.

MORAIS, L.A.S. **Influência dos fatores abióticos na composição química dos óleos essenciais.** *Horticultura Brasileira*, v. 27, n. 2, 4050-4063,2009.

NCCLS. **Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard.** NCCLS document M2-A8. Pennsylvania: NCCLS, 2003

OLIVEIRA, F.C., ALBUQUERQUE, U.P., FONSECAKRUDEL, V.S., HANAZAKI, N. **Avanços nas pesquisas etnobotânicas no Brasil.** *Acta Botanica Brasilica*, v.23, p.590–605, 2009.

PIRES, T.C.; PICOLLI, R. **Efeito inibitório de óleos essenciais do gênero Citrus sobre o crescimento de micro-organismos.** *Rev. Inst Adolfo Lutz.* v.71, n.02, p. 378-385, 2012.

PELT, J. **Especiarias e ervas aromáticas: história, botânica e culinária.** Rio de Janeiro: Jorge Zahar Editor, 2004.

PEREIRA, AA. **Efeito inibitório de óleos essenciais sobre o crescimento de bactérias e fungos.** 2006. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, 2006.

RAMOS, J. D. ; PIO, R. ; RUFINI, J. C. M. ; VALE, M. R.. **Recomendações básicas para o cultivo de lima ácida 'Tahiti'.** Lavras-MG.: UFLA, 2003 (Boletim de Extensão).

REZENDE, H.A., COCCO, M.I.M. **A utilização de fitoterapia no cotidiano de uma população rural.** Revista Escola Enfermagem USP, São Paulo, v. 36, n. 3, p. 282-8, 2002.

RIBEIRO, E; TAKAGUI, A. **Seleção de Medicamentos.** 2000.

SAKAMOTO, H. T.; GOBBO-NETO, L.; CAVALHEIRO, A. J.; LOPES. N. P.; LOPES, J. L. C.; J. **Braz. Chem. Soc.** 16, 1396. 2005.

SHAHIDI F, ZHONG Y. **Novel antioxidants in food quality preservation and health promotion.** European Journal of Lipid Science and Technology, P. 930–940. 2010.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** 5ª ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS / Editora UFSC, 2003.

SOUSA, L.C.F.S.; SOUSA, J. E. S.; SOUSA, J. S.; WANDERLAY, J. A. C.; BORGES, M. G. B. **Ethnobotany knowledge of public school students in the city of Pombal-PB.** Revista Verde, v. 6, p. 139- 145, 2011.

SOUSA CMM, SILVA HR, VIEIRA-JR GM, AYRES MCC, COSTA CLS, ARAÚJO DS, CAVALCANTE LCD, BARROS EDS, ARAÚJO PBM, BRANDÃO MS, CHAVES MH. **Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais.** Quim Nova, v.30, p.351-355,2007.

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

STILTS, C.; BEZOTTE, C.; FONTAINE, S. **Synthesis of Sulfanilamide Derivatives and Their Effects on E. coli and B. subtilis: A Collaborative Experiment between Undergraduate Organic and Microbiology Laboratories.** Journal of Laboratory Chemical Education, v 3, 76-80. 2015.

VALKO M. et al. **Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease.** International Journal of Biochemistry & Cell Biology, v.39, p.44-84, 2007.

VAN BOECKELTP, GANDRA S, ASHOK A, CAUDRON Q, GRENFELL BT, LEVIN SA, & LAXMINARAYAN R. **Global antibiotic consumption 2000 to 2010: an analysis of national pharmaceutical sales data.** The Lancet Infectious Diseases, v.14, n.8, 2014.

VIANA, Daniela Soares. **Lima ácida (Citrus latifolia, Tanaka), cv. Tahiti, de cultivos convencional e orgânico biodinâmico: avaliação da capacidade antioxidante dos sucos in natura e clarificados por membranas de microfiltração.** 2010. 100 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio de Janeiro,, Rio de Janeiro, 2010.

YU, T-W., ANDERSON, D. **Reactive oxygen species-- induced DNA damage and its modification: a chemical investigation.** Mutation Research, Amsterdam, v.379, n.2, p.201-210, 1997.