

UNILEÃO
CENTRO UNIVERSITÁRIO DOUTOR LEÃO SAMPAIO
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

MARIA APARECIDA GOMES VIEIRA

**PERFIL QUÍMICO, TOXICIDADE, ATIVIDADE ANTIBACTERIANA,
E MODULAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DAS CASCAS DOS FRUTOS *Citrus*
latifolia (RUTACEAE).**

Juazeiro do Norte – CE

2019

UNILEÃO
CENTRO UNIVERSITÁRIO DOUTOR LEÃO SAMPAIO
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

MARIA APARECIDA GOMES VIEIRA

**PERFIL QUÍMICO, ATIVIDADE ANTIBACTERIANA,
TOXICIDADE E MODULAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DAS CASCAS DOS
FRUTOS *Citrus latifolia* (RUTACEAE).**

Artigo Científico apresentado à
Coordenação do Curso de Graduação em
Biomedicina do Centro Universitário
Doutor Leão Sampaio, em cumprimento às
exigências para a obtenção do grau de
bacharel em Biomedicina.

Orientadora: Dra. Fabiola Fernandes
Galvão Rodrigues

Co-orientadora: Ma. Rakel Olinda
Macedo da Silva

Juazeiro do Norte- CE

2019

MARIA APARECIDA GOMES VIEIRA

**PERFIL QUÍMICO, TOXICIDADE, ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E
MODULAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DAS CASCAS DOS FRUTOS *Citrus*
latifolia (RUTACEAE).**

Artigo Científico apresentado à
Coordenação do Curso de Graduação em
Biomedicina do Centro Universitário
Doutor Leão Sampaio, em cumprimento às
exigências para a obtenção do grau de
bacharel em Biomedicina.

Orientadora: Dra. Fabiola Fernandes
Galvão Rodrigues

Co – orientadora: Ma. Rakel Olinda
Macedo da silva

Data de aprovação: ___/___/___

BANCA EXAMINADORA

Professora: Dra. Fabiola Fernandes Galvão Rodrigues
(Orientadora)

Professora: Ma. Maria Karollyna do Nascimento Silva Leandro
(Examinadora 1)

Professor: Me. Cicero Roberto Nascimento Saraiva
(Examinador 2)

DEDICATORIA

Dedico este trabalho primeiramente à Deus pois sem ele eu nada seria, a minha família ao meu esposo, e aos amigos que acreditaram e me fizeram acreditar que seria capaz.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus pelo o dom da vida e pela oportunidade da realização desse sonho, só ele sabe quantas vezes passava em frente ao campus e me perguntava será que um dia serei aluna dessa instituição, concluir um curso superior após 08 anos de terminar o ensino médio foi uma batalha árdua, mas com sua divina graça e apoio dos amigos, esposo Humberto e professores consegui chegar até aqui, agradeço a Deus também pela vida das pessoas incríveis que ele colocou em meu caminho, pessoas que sempre me apoiou, quando pensei em parar me deram forças, me ensinaram a confiar mais em mim. Agradeço a minha mãe e ao meu esposo por todo amor e compreensão, por passar mais tempo na faculdade do que mesmo em casa. Aos meus irmãos que mesmo distante torcem por mim. As amigas Mara e Nara, por todo o apoio nessa jornada. A Francisco Ermesson, amigo de verdade, parceiro que praticamente morávamos na universidade, para mim é como um irmão, você é exemplo de superação, a Andreia pelo incentivo e amizade de vocês obrigada.

Ao longo dessa jornada Deus colocou diversas pessoas que fez toda diferença e que vão ficar por toda vida, pessoas que adotei como filhos queridos, amor à primeira vista, Thais, Marina, Hirla, Welington, em seguida, Maria Daniele, Paulo, a amizade de vocês foi um presente e faz toda diferença, minhas bonecas de porcelana Lara, Dionara e Marina vocês tem um coração enorme, nem sabe quantas vezes uma simples conversa com vocês contribuiu muito, aos parceiros de projetos Paulo, Ermesson, Jainne, Israel, sempre um apoiando o outro amo vocês e muito obrigada.

A minha orientadora Dra. Fabíola Fernandes Galvão Rodrigues a quem tenho grande admiração, pela simplicidade, mesmo com grande experiência e capacidade acadêmica, tem me acompanhado desde o segundo semestre, és uma inspiração. A minha co-orientadora, Ma. Rakel Olinda Macedo da silva, a qual tenho grande admiração desde primeiro semestre, sua contribuição foi essencial. A todos os professores da grade do curso de biomedicina, tenho maior respeito e admiração por todos, graças a dedicação e apoio de vocês, ajudou chegar até aqui. As colegas e técnicas do laboratório de microbiologia da universidade leão Sampaio, por sempre está disponível, karol, Paula, Bruna e Edilania, vocês também foram essenciais. A Ma. Debora Odília e a Fabio Galvão por todo apoio durante os testes no laboratório de Microbiologia da URCA a contribuição de vocês foi mais que essencial. A parceria do Laboratório de Microbiologia e Pesquisa de Produtos Naturais da Universidade Regional do Cariri-URCA, não tenho palavras para agradecer a todos vocês meu muito obrigada.

PERFIL QUÍMICO, ATIVIDADE ANTIBACTERIANA, TOXICIDADE E MODULAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DAS CASCAS DOS FRUTOS *Citrus latifolia* (RUTACEAE).

Maria Aparecida Gomes Vieira¹

Fabiola Fernandes Galvão Rodrigues²

Rakel Olinda Macedo da Silva³

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o perfil químico, atividade antibacteriana, potencial modulador, ação toxicológica do óleo essencial das cascas de *Citrus latifolia*. Para obtenção do óleo essencial as cascas foram submetidas a processo de hidrodestilação, por 2h. As análises químicas foram realizadas por meio da Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massa (CG/MS). A atividade antibacteriana foi realizada através da microdiluição e micro-organismos das linhagens padrão de bactérias Gram positivas e Gram negativas. Para modulação foram utilizados CIM/ 8 do óleo frente aos antibióticos aminoglicosídeos e β -lactâmico. A toxicidade foi testada com *Artemia salina*. O óleo apresentou rendimento 0,93%. Foi possível identificar presença de diversos componentes químicos, o principal constituinte majoritário encontrado foi o D-limoneno (65,32%). A atividade antibacteriana foi realizada através da microdiluição utilizando os micro-organismos das linhagens padrão de bactérias Gram positivas e Gram negativas. O óleo essencial de *Citrus latifolia* mostrou melhor atividade contra as bactérias Gram negativas que obteve CIM 256 μ g/mL respectivamente, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*. Ao associar o óleo essencial de *Citrus latifolia* com o antibiótico Gentamicina apresentou sinergismo frente a bactéria *S.Aureus*, já ao associar com o antibiótico Amicacina apresentou antagonismo frente a *Pseudomonas aeruginosa*. O óleo apresentou toxicidade com CL₅₀ de 8,8 μ g/mL. Conclui-se que os resultados obtidos no presente estudo são de suma importância, devido ao uso de plantas medicinais pela população, pois apresentou alta toxicidade, e possivelmente terá a atividade anticancerígena, concentração inibitória frente as cepas testadas *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*, atividade moduladora com antagonismos e sinergismos associado as classes de antibióticos.

Palavra-chave: Aminoglicosídeos. Antibacteriano. *Artemia salina*. *Citrus latifolia*. Modulação. Toxicidade.

EVALUATION OF CHEMICAL PROFILE, ANTIBACTERIAL ACTIVITY, TOXICITY AND MODULATION OF ESSENTIAL OIL FROM FRUIT PEELS *Citrus latifolia* (RUTACEAE).

1-Discente do curso de Biomedicina do Centro Universitário Doutor Leão Sampaio-UNILEÃO, nininha.jua@hotmail.com, Juazeiro do Norte-CE.

2-Docente do curso de Biomedicina do Centro Universitário Doutor Leão Sampaio-UNILEÃO, fabiola@leaosampaio.edu.br, Juazeiro do Norte-CE.

3- Docente do curso de Biomedicina do Centro Universitário Doutor Leão Sampaio-UNILEÃO, rakelolinda@leaosampaio.edu.br, Juazeiro do Norte-CE.

Maria Aparecida Gomes Vieira¹
Fabiola Fernandes Galvão Rodrigues²
Rakel Olinda Macedo da Silva³

ABSTRACT

The present work aimed to evaluate the chemical profile, antibacterial activity, modulating potential, toxicological action of the essential oil of *Citrus latifolia* bark. To obtain the essential oil, the peels were subjected to a hydrodistillation process for 2 hours. Chemical analyzes were performed by Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry (GC / MS). Antibacterial activity was performed by microdilution and microorganisms of standard strains of Gram positive and Gram negative bacteria. Oil CIM / 8 was used for modulation against aminoglycoside and β -lactam antibiotics. Toxicity was tested with brine shrimp. The oil yielded 0.93%. It was possible to identify the presence of several chemical components, the main major constituent found was D-limonene (65.32%). Antibacterial activity was performed by microdilution using the microorganisms of standard Gram positive and Gram negative bacterial strains. *Citrus latifolia* essential oil showed better activity against Gram negative bacteria used MIC 256 μ g / mL, respectively, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*. By associating the essential oil of *Citrus latifolia* with the antibiotic Gentamycin shows synergism against the bacterium *S. Aureus*, already associating with the antibiotic Amikacin shows antagonism to *Pseudomonas aeruginosa*. The oil tested with LC50 toxicity of 8.8 μ g / mL. It is concluded that the results obtained in the present study are very important, due to the use of medicinal plants by the population, as it presented high toxicity, and possibly have anticancer activity, inhibitory concentration against the tested strains *Staphylococcus aureus* and *pseudomonas aeruginosa*, modulating activity. with antagonisms and synergisms associated with antibiotic classes.

Keyword: Aminoglycosides. Anti-bacterial. *Saline artemia*. *Citrus latifo*. Modulation. Toxicity

1-Discente do curso de Biomedicina do Centro Universitário Doutor Leão Sampaio-UNILEÃO, nininha.jua@hotmail.com, Juazeiro do Norte-CE.

2-Docente do curso de Biomedicina do Centro Universitário Doutor Leão Sampaio-UNILEÃO, fabiola@leaosampaio.edu.br, Juazeiro do Norte-CE.

3- Docente do curso de Biomedicina do Centro Universitário Doutor Leão Sampaio-UNILEÃO, rakelolinda@leaosampaio.edu.br, Juazeiro do Norte-CE

1 INTRODUÇÃO

Compostos naturais extraídos de plantas medicinais têm potencial relevante sócio econômico em comunidades de baixa renda desde a antiguidade. Devido ao baixo custo, fácil acesso, baixa toxicidade e baixos riscos de efeitos colaterais quando comparado aos medicamentos tradicionais. Os óleos essenciais naturais extraídos destas plantas possuem papel fundamental na defesa contra micro-organismo, e possuem grande potencial no controle aos patógenos (DA SILVA; DE OLIVEIRA; NETO, 2018).

Estas plantas podem apresentar atividades antimicrobianas como uma alternativa de tratamento devido aos problemas associados a resistência de antibióticos, sendo necessário o desenvolvimento de novos fármacos, assim, em função de suas inúmeras propriedades biológicas, os óleos essenciais e compostos isolados como os terpenos podem resultar no desenvolvimento de fármacos e contribuir para avanços nessa área da pesquisa científica (FURTADO, 2018).

Os constituintes químicos encontrados nos óleos essenciais interagem nas moléculas e funções das células bacterianas, inibindo a síntese de ácidos nucleicos. Combinações de óleos com diferente composição química, apresenta uma interação positiva em que mais de dois agentes juntos exercem um efeito inibitório. Dessa forma esses compostos são utilizados como agente antimicrobiano em produtos alimentícios aumentando a segurança e vida de prateleira desses alimentos (POMBO et al., 2018)

Um exemplo de produto natural que apresentam óleos essenciais é *Citrus latifolia* conhecido popularmente como limão Taiti, seu consumo *in natura* possui ação antimicrobiana, sendo amplamente utilizado na culinária, na limpeza e preparo de alimentos (carne, massas, bolos, confeitaria). Popularmente a fruta é usada para auxiliar em tratamento de resfriados e até mesmo na deficiência de vitamina C (GOBATO; GOBATO; FEDRIGO, 2015).

Essa espécie pertence à família das Rutáceas do gênero *Citrus*, sendo assim uma fruta cítrica, lima acida que possui um grande diferencial, a ausência de sementes ou poucas sementes, seus frutos possuem uma quantidade de suco com elevado teor de ácido cítrico. Possui vitamina c, pectina na entre casca e óleos essenciais constituídos dos monoterpenos na casca, o qual confere propriedades terapêuticas (SILVA, 2015).

Embora os óleos essenciais das espécies do gênero *Citrus* representem uma possibilidade para a preservação de alimentos, é necessário conhecer suas propriedades antibacterianas, antioxidantes e toxicidade, já que estas são fontes natural promissora de diversas atividades biológicas por apresentar em sua composição química, terpenos metabólitos secundários

validado por várias pesquisas científicas, dessa forma o objetivo desse estudo foi avaliar o perfil químico, atividade antibacteriana, potencial modulador e ação toxicológica do óleo essencial das casca de *Citrus latifolia*.

2.MATERIAL E MÉTODO

2.1 TIPO E LOCAL DE ESTUDO

Trata se de um estudo do tipo experimental e quantitativo, experimentos foram realizados no Laboratório de Microbiologia e Bromatologia do Centro Universitário Dr. Leão Sampaio e em parceria ao Laboratório de Pesquisas de Produtos Naturais da Universidade Regional do Cariri –URCA.

2.2 MATERIAL VEGETAL E IDENTIFICAÇÃO BOTÂNICA

Os frutos de (*Citrus latifolia*), foram coletados em setembro de 2019, as 17h sob as coordenadas, (Latitude) S7° 16'58,15956", (Longitude) W39°17'34,61748" no Sítio Lagoa no município de Barbalha -CE. Uma exsiccata do material vegetal foi preparada e submetida a identificação pelo Herbário Dárdano Andrade Lima da Universidade Regional do cariri – URCA.

2.3 OBTENÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL.

Para obtenção do óleo essencial as cascas do limão Tahiti foram trituradas, pesadas e submetidas ao processo de hidrodestilação, em aparelho do tipo Clevenger por 2 horas, assim obtendo o óleo essencial. O rendimento em porcentagem foi calculado de acordo com o valor inicial e final. Após obtido o óleo essencial foi tratado com sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4) e mantido sob refrigeração para realização das análises cromatográficas (ALENCAR; CRAVEIRO; MACHADO, 1990; ADAMS, 2007).

2.2.1 Análise da Composição Química do Óleo Essencial

A análise do óleo essencial foi realizada por meio da cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG/MS). Análise realizada em espectrômetro Shimadzu GCMS – QP2010S, operando com energia de ionização de 70 eV. Utilizando-se coluna capilar de sílica fundida RTx – 5MS (30 m x 0,25 mm d.i., 0,25 µm de espessura do filme) e carreador de gás hélio com fluxo de 1 mL/min com split. As temperaturas do injetor e detector foram programadas de 250°C e 200°C, respectivamente. A temperatura da coluna foi determinada de 35°C a 180°C a 4°C/min e, em seguida de 180°C a 280°C a 10°C/min. Os espectros de massa serão obtidos de 30 a 450 m/z. Componentes individuais serão identificados por correspondências de seus espectros de massa com os da base de dados, bem como através de comparação visual da fragmentação padrão com aqueles relatados na literatura (ALENCAR; CRAVEIRO; MACHADO, 1990; ADAMS, 2007).

2.4 MATERIAL BACTERIANO

Os micro-organismos utilizados nos testes foram obtidos em parceria com o Laboratório de Pesquisa de Produtos Naturais (LPPN) da Universidade Regional do Cariri (URCA). Foram utilizadas linhagens padrão de bactérias Gram negativas: *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 10031) Gram positivas: *Staphylococcus aureus* (ATCC 12624), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) *Bacillus cereus* (ATCC 33018).

2.5 AVALIAÇÃO ANTIBACTERIANA E CONCENTRAÇÃO INIBITORIA MÍNIMA (CIM)

A concentração inibitória mínima (CIM) e atividade antibacteriana foram avaliadas em ensaio de microdiluição em caldo com base no CLSI (2012). Ao anteceder o teste, as linhagens bacterianas foram ativadas em meio *Brain Heart Infusion* (BHI 3,8 %) e mantidas na estufa por 24 horas. Após o primeiro cultivo o inóculo bacteriano foi padronizado a partir de uma suspensão com concentração de aproximadamente de 1×10^8 UFC/mL (turbidez da escala de McFarland). Em seguida, essa suspensão foi diluída em caldo BHI a 10, então os volumes de 100 µL adicionados e homogeneizados nos poços de uma placa de microdiluição com diluições em série. Foi pesado 0,1g do óleo essencial de *Citrus latifolia* e diluído em 1 mL DMSO, e acrescentado 9 mL de água destilada estéril. Em cada poço foi adicionado 100µL de solução do

óleo essencial e as concentrações finais do óleo varia entre 512 - 8 µg/mL. As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas (CLSI, 2012).

Após 24 h na estufa a 37 °C, a atividade antibacteriana foi detectada através do método colorimétrico, utilizando uma solução indicadora de resazurina sódica (Sigma) em água destilada estéril na concentração de 0,01 % (p/v), 25 µL desta solução foi adicionada em cada cavidade as placas as quais ficaram em um período de incubação por 1h em temperatura ambiente. A mudança de coloração azul para rosa, ocorre devido à redução da resazurina, indica o crescimento bacteriano, auxiliando a visualização da CIM, definida como a menor concentração capaz de inibir o crescimento microbiano, evidenciado pela cor azul inalterada. Os experimentos foram realizados em triplicata (CLSI, 2012).

2.5.1 Atividade Moduladora Frente aos antibióticos

O teste de modulação foi realizado na presença e na ausência do óleo essencial através de microdiluição em triplicata, foram utilizados os CIM/ 8 do óleo frente aos antibióticos aminoglicosídeos (amicacina e gentamicina) e antibióticos β-lactâmicos (cefalotina e benzilpenicilina). As linhagens bacterianas utilizadas foram inoculadas em BHI a 10% e armazenadas em estufa bacteriológica a 37° por 24 horas. O teste foi monitorado com um controle positivo contendo apenas antibióticos e os microrganismos. As concentrações adicionadas das drogas antibacterianas usadas no ensaio variaram de 1024-0,5µg/mL (RODRIGUES et al., 2013).

2.6 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE FRENTE *Artemia salina*

A toxicidade foi testada contra o microcrustáceo *Artemia salina* através do método proposto por Meyer et al., (1982). O Teste realizado em triplicata, com diferentes concentrações, acompanhado de um controle positivo preparado com água marinha e dicromato de potássio (K₂Cr₂O₇), e outro controle negativo com água marinha e DMSO (Dimetilsufóxido). Após 24 horas foi realizado a leitura das larvas sobreviventes. O cálculo da CL₅₀ foi realizado por regressão linear, sendo considerado significativo quando CL₅₀ < 1000 µg/mL (DA COSTA et al., 2010).

2.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os testes microbiológicos e toxicológicos foram analisados pelo ANOVA bidirecional seguido pelo teste de Bonferroni utilizando software Graphpad Prism 6.0. Os resultados em $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O óleo essencial obtido das cascas de *Citrus latifolia* (limão tahiti) apresentou rendimento de 0,93%, em estudos similar realizado por Simas et al., (2017) com *Citrus limettioides* e *Citrus sinensis*, os frutos foram colhidas aleatórias em feira livre na cidade do Rio de Janeiro as mesma obteveram rendimento diferentes, *Citrus limettioides* de 0,28% e *Citrus sinensis* 2,87%. Todas as espécies de *Citrus* apresentaram variações de rendimento diferente, isso pode ser devido as características sazonais e morfológicas, data da colheita de cada amostra bem como ao seu tempo de prateleira (Simas et al, 2017).

3.1 COMPONENTES QUÍMICOS

Através da realização da identificação química do óleo essencial das cascas de *Citrus latifolia* foi possível identificar a presença de diversos constituintes químicos como mostra a Tabela 1, como principal constituinte majoritário, foi encontrado o Limoneno (65,32%) seguido de β -pineno (15,54%), γ -terpineno (10,95%).

Tabela 1: Componentes identificados no óleo essencial da casca de *Citrus latifolia* por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de massas (CG/MS).

	%
Citral	0,33
Geranial	2,57
Limoneno	65,32
Linalol	0,44
Neral	1,48
Octanal	0,30
α -terpineol	0,25
β -mirceno	2,82
β -pineno	15,54
γ -terpineno	10,95
Total	100%

Fonte: Própria

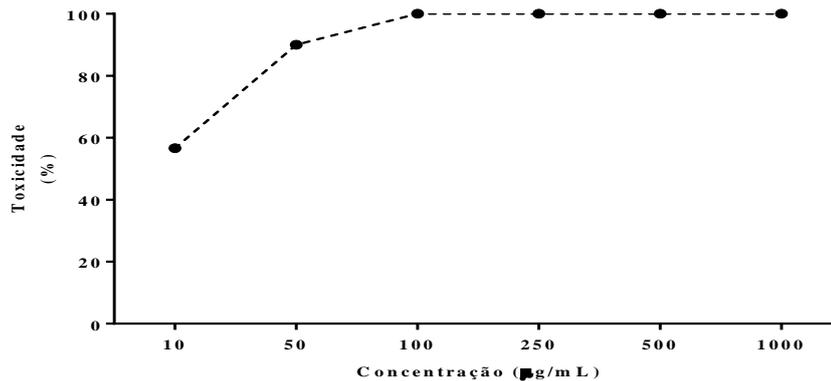
Em estudo similar realizado com o óleo da casca da laranja *Citrus sinensis*, por Ferronato e Rossi (2018), foram identificados os principais constituintes do óleo essencial da casca da laranja, sendo D-limoneno como componente majoritário (91,4%). Os demais constituintes beta-mirceno (2,46%), β -Linalool (1,52%) e octanal (1,05%). Com isso é possível detectar que o gênero em estudo possui componentes semelhantes como o limoneno encontrados em espécies diferentes, mas pertencentes ao mesmo gênero *Citrus*. Essa variação de rendimento ocorre por diversos interferentes, como as características sazonais e morfológicas da planta, mês da colheita, condições ambientais e como seu tempo de prateleira por (Ferronato e Rossi, 2018).

3.2 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE FRENTE *Artemia salina*.

As análises da toxicidade foram realizadas em triplicata com diferentes concentrações com o óleo essencial das cascas do fruto de *Citrus latifolia* que obteve $CL_{50} < 1000 \mu g/mL$ sendo considerada elevada toxicidade frente *Artemia salina*, com CL_{50} de $8,8 \mu g/mL$ obtido por regressão linear conforme mostra no Gráfico 1. Meyer et al. (1982) estabeleceu uma relação entre o grau de toxicidade e a dose letal mínima, sendo considerado significativo quando CL_{50} for $< 1000 \mu g/mL$ considera -se que quando são verificados valores acima $1.000 \mu g/mL$ estes,

são considerados atóxicos. Dessa forma o óleo essencial de *Citrus latifolia*, é considerado tóxico (Meyer et al 1982).

Gráfico 1: Resultado da toxicidade do óleo essencial das cascas do fruto de *Citrus latifolia* frente à *Artemia salina*.



Fonte: Própria

Nos resultados de toxicidade, a concentração de 10 µg/mL, matou 56,6% da morte dos microcrustáceos, as demais concentrações apresentaram morte de 90 e 100% da *Artemia salina*, maior do que a concentração de 10 µg/mL, dessa forma quanto maior a concentração do óleo maior a mortalidade do microcrustáceo.

Em estudos similares realizados por Leite Junior et al., (2018) o qual, avaliou a toxicidade de *Citrus sinensis* frente *A. salina* em diferentes concentrações, 1000/ 70%, 500/ 60% , 250/40% e 100/20% da morte do microcrustaceo, seu estudo corrobora com os resultados encontrados onde quanto maior a concentração do óleo mais ocorre a morte dos microcrustáceos, entretanto a discrepância encontrada nos testes acontece na CL₅₀ de 511,602 µg/mL, dessa forma sua amostra testada apresentou uma leve toxicidade, o que se justifica pelo fato de ser uma espécie diferente mesmo sendo pertencente ao mesmo gênero.

Em estudos similares Da Costa et al., (2010) avaliou a , *Piper aduncum* , da família *Piperaceae*, obteve CL₅₀, de 8,29 µg/mL, uma elevada toxicidade, seu trabalho é o primeiro relato de atividade larvicida de *P. aduncum*.

3.3 CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA DE *Citrus Latifolia*.

O óleo de *Citrus latifolia* mostrou atividade inibitória significativa frente as cepas testadas, tanto para as Gram negativa como as Gram positivas, exceto para *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) que apresentou CIM $\geq 1024 \mu\text{g/mL}$, sendo considerada clinicamente irrelevante como mostrado na Tabela

Tabela 2. Resultado da concentração inibitória mínima ($\mu\text{g/mL}$) do OECL frente a bactérias Gram positivas e Gram negativas.

MICRO-ORGANISMOS	CIM ($\mu\text{g/mL}$)
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922),	256
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 15442)	256
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (ATCC 10031)	256
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 12624)	512
<i>Bacillus cereus</i> (ATCC 33018)	256
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923)	≥ 1024

Fonte: Própria

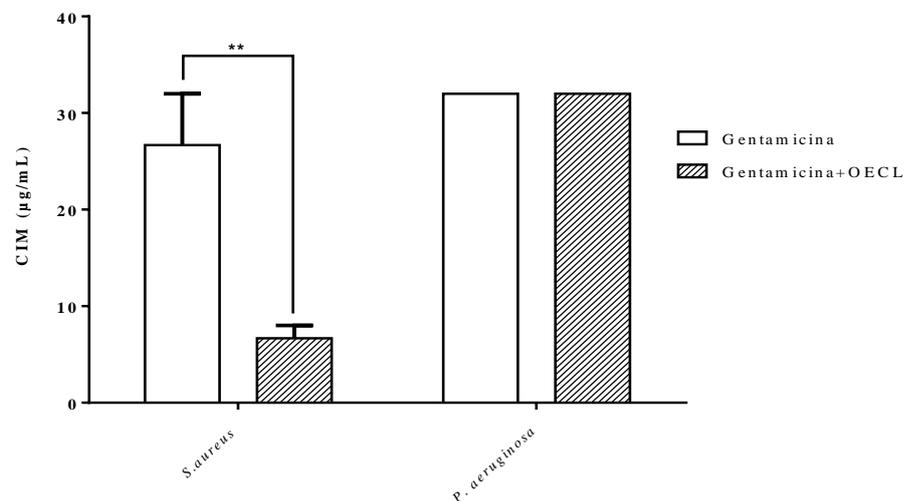
Em um estudo realizado por Pires e Piccoli (2012), avaliaram o óleo essencial de várias espécies do gênero *Citrus*, entre eles o óleo essencial das cascas de *Citrus latifolia* frente a diversas bactérias como a *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, e *Salmonella sp*, onde apresentou CIM variando de $500 \mu\text{g/mL}$, e $250 \mu\text{g/mL}$. Com base nos resultados obtidos os óleos analisados mostraram atividade frente as bactérias Gram positivas e Gram negativa corroborando assim com o presente trabalho.

Em estudos realizados por Heberle (2016) também avaliou o óleo essencial *citrus sínesis* da laranja frente a bactéria Gram positiva *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* e *Bacillus cereus*, e Gram negativas *Escherichia coli* e *Salmonella enteritidis* que também mostrou atividade similar em todas as cepas testadas. Esse efeito ocorre pela penetração do óleo que ocorreu em ambas, mas houve melhor resultado nas Gram negativas por possuírem apenas uma camada de peptidoglicano, deixando-a mais permeável ao óleo por outro lado as Gram positivas possuem uma camada mais espessa de peptidoglicanos o que a torna menos permeável (Edilberto A.S.O, 2011).

3.4 ATIVIDADE MODULADORA

Foi avaliada ação do OECL com os antibióticos das classes aminoglicosídeos, amicacina e gentamicina, e antibióticos β -lactâmicos cefazolina e bencilpenicilina frente as cepas *S. aureus* e *Pseudomomas aeruginosa*. Segue os resultados, nos gráficos abaixo.

Gráficos 2. Resultado do efeito modulador do OECL e o antibiótico gentamicina das classes aminoglicosídeos , frente *S. aureus* e *Pseudomomas aeruginosa*



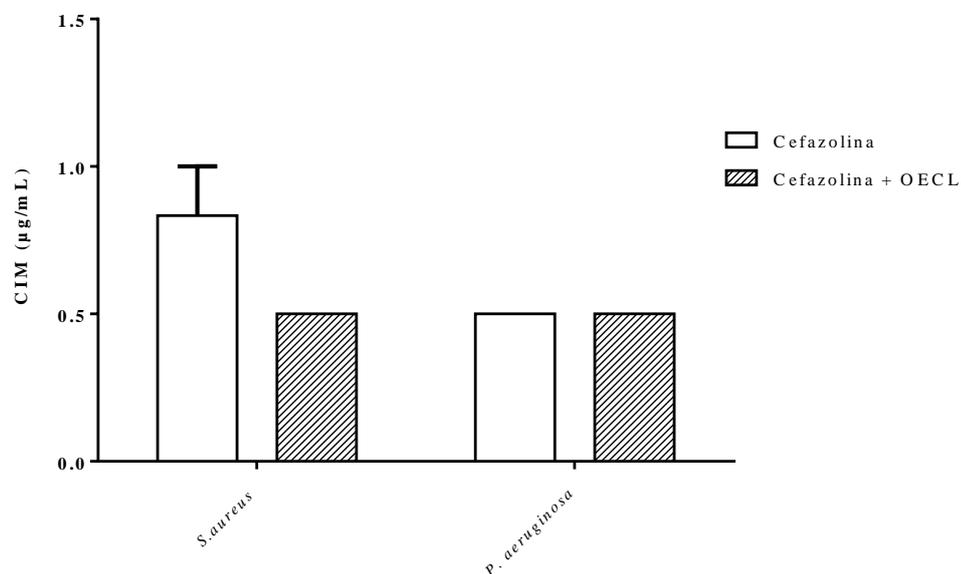
Fonte: Própria

Foi observado que o óleo essencial de *Citrus latifolia* em associação ao antibiótico gentamicina, pertencente a classe dos aminoglicosídeos, frente a bactéria Gram positiva *Staphylococcus aureus*, apresentou a capacidade de desenvolver atividade sinérgica, que ocorre quando uma substância consegue potencializar a ação de outra, quando colocadas em associação, onde o óleo essencial de *Citrus latifolia* reduziu a concentração inibitória mínima CIM, potencializando o antibiótico, enquanto testado frente a bactéria *pseudomonas aeruginosa* o antibiótico não causou nenhum efeito.

Estudo realizados por Dos Santos Aguiar et al., (2014) na presença e na ausência de óleo essencial de *Plectranthus amboinicus* Lamiaceae e seu potencial modulatório sobre aminoglicosídeos frente a algumas bactérias Gram positivas e Gram negativas, entre elas *Staphylococcus aureus*, ocorreu sinergismo quando associou ao antibiótico Gentamicina frente

a bactéria Gram positiva *Staphylococcus aureus*. De acordo com várias pesquisas na literatura esse resultado pode ser devido os compostos majoritários encontrados nos óleos essenciais e aos terpenos, dessa forma esse estudo corrobora com o presente trabalho (Dos Santos Sales et al, 2017)

Gráfico 3. Resultado do efeito modulador do OECL na ação dos antibióticos Cefazolina (β -lactâmicos)

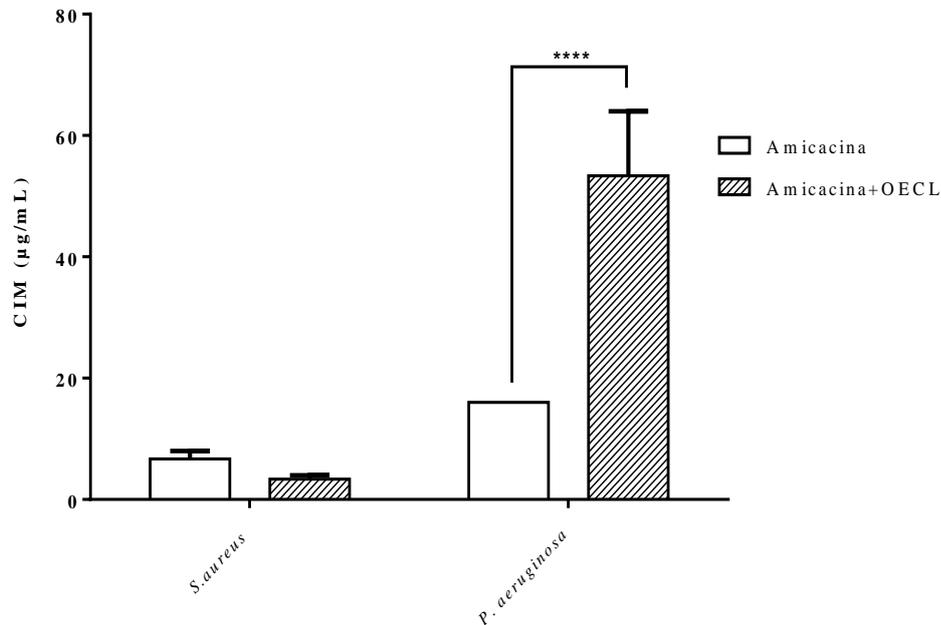


Fonte: Própria

O antibiótico cefazolina quando associado ao óleo essencial de *Citrus latifolia*, frente a bactéria *Staphylococcus aureus* também foi observado uma atividade sinérgica, já com a bactéria *Pseudomonas aeruginosa* não apresentou efeito significativo.

Em estudos similares realizados por De Souza et al., (2018) ao associar o antibiótico imipenem pertencente a classe β -lactâmicos apresentou um efeito sinérgico frente a bactéria *Staphylococcus aureus* o qual corrobora com o presente estudo.

Gráfico 4: resultado do efeito modulador do OECL na ação do antibiótico Amicacina (aminoglicosídeos).



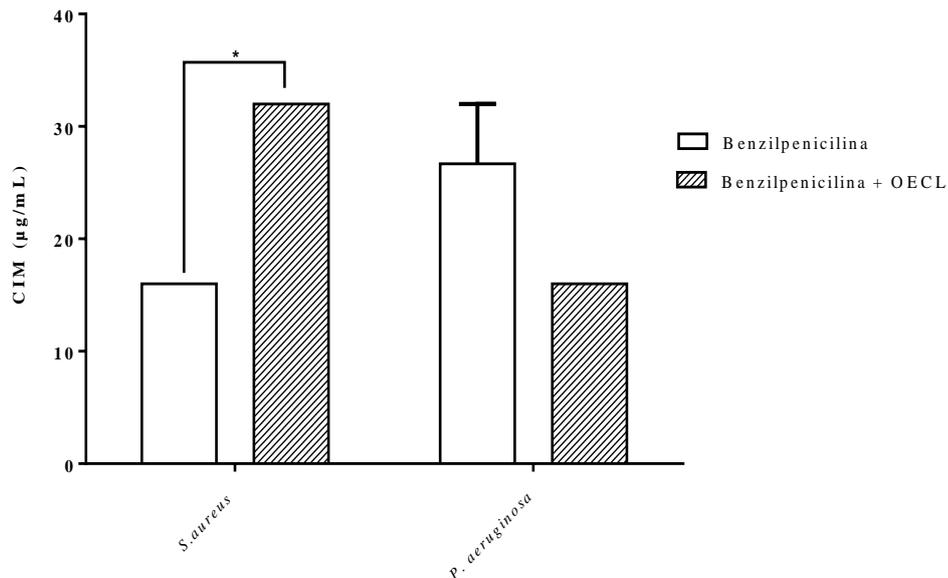
Fonte: Própria

Quando o óleo essencial foi associado ao antibiótico Amicacina, frente a espécie Gram negativa de *Pseudomonas aeruginosa* apresentou um antagonismo como mostra o gráfico 4, esse resultado pode estar associado a interação da polaridade do antibiótico com o óleo pois o antibiótico foi diluído em água destilada estéril.

Testes realizados por De Souza et al., (2018) o qual avaliou o potencial modulador do composto D-limoneno, mesmo constituinte majoritário encontrado neste estudo, quando associado ao antibiótico norfloxacina o mesmo apresentou efeito antagônico frente a bactéria Gram negativa *Pseudomonas aeruginosa*, corroborando com os resultados encontrado no presente estudo.

As atividades antagônicas observadas no presente estudo se devem possíveis interações dos constituintes químicos do óleo com os antibióticos, dessa forma e ressaltado que novos estudos devem ser realizados para elucidar essas interações e assim, possivelmente, explicar a diminuição da atividade desses fármacos (Dos Santos Sales et al, 2017).

Gráfico 5. Resultado do efeito modulador OECL na ação dos antibióticos β -lactâmicos.



Fonte: Própria

A associação do antibiótico benzilpenicilina com o óleo essencial de *citrus latifolia* frente a cepa *S. aureus*, foi observado um antagonismo, por outro lado houve sinergismo quando associado com a espécie Gram negativa de *pseudomonas aeruginosa*.

Nos estudos similares realizados por De Souza et al., (2018), avaliou o composto Limoneno, esse citado por diversos estudo com espécies *Citrus* como composto majoritário, os resultados encontrados quando associado o antibiótico da classe β -lactâmicos ao composto D-limoneno frente a bactéria *S. aureus* também *apresentou* efeito antagônico o que corrobora com o presente trabalho.

Nos estudos realizados por Caldas (2011) ao utilizar o óleo essencial de inflorescência *O. gratissimum* frente as bactérias Gram negativa *Pseudomonas aeruginosa* e a bactéria Gram positivas *S. aureus*, onde a mesma ocorreu sinergismo em ambas quando associado o composto

D-limoneno com o antibiótico benzilpenicilina, ocorre uma discordância com a e essa diferença está associada a espécie , composição química dos óleos essenciais e ao composto majoritário.

4. CONCLUSÃO

Conclui-se que os resultados obtidos no presente estudo são de suma importância, devido ao uso de plantas medicinais pela população, pois apresentou alta toxicidade, e futuramente possa apresentar atividade anticancerígena, concentração inibitória frente as cepas testadas *Staphylococcus aureus* e *pseudomonas aeruginosa* , atividade moduladora com antagonismos e sinergismos associado as classes de antibióticos β -lactâmicos e aminoglicosídeos ao OECL, sendo necessário estudos mais aprofundados para confirmação da sua eficácia frente às espécies bacterianas, pois na literatura encontra poucos trabalhos com óleo essencial das cascas de *Citrus latifolia*.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, Robert P., et al. *Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry*. Carol Stream, IL: Allured publishing corporation, 2007.
- ALENCAR J.W, Craveiro A.A, Matos FJ, Machado M. I. L . Kovats índices simulation essential oils analysis. **Química Nova**, v.13.n.4, 1990.
- CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for bacteria that grow aerobically**. 6. ed. Wayne, PA: NCCLS Approved Standard M7-A6, 2012.
- CALDAS, F. L. **avaliação das atividades antimicrobiana e antioxidante de *Ocimum gratissimum* L. (LAMIACEAE)**, 2011. Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Bioprospecção Molecular da Universidade Regional do Cariri - URCA, 2011.
- DA COSTA, J. G. M., et al. Biological screening of araripe basin medicinal plants using *Artemia salina* Leach and pathogenic bacteria. *Pharmacognosy magazine*, v.6, n.24, 2010.
- DA SILVA, L; DE OLIVEIRA, G. M. G; NETO, M. J. Atividade fungicida de plantas do serrado contra micoses superficiais e cutâneas. **Revista Saúde e Meio Ambiente – RESMA**, v.6, n.1, 2018.

DE SOUZA, L. S et al. Atividade antibacteriana do d-limoneno simples e complexado com a b-ciclodextrina e em avaliação potencial e modulador associado com diferentes classes de antibióticos, 2018 v.1, n.25, 2018.

DOS SANTOS AGUIAR, J. J., et al. Avaliação da atividade antibacteriana do óleo essencial de *Plectranthus amboinicus Lamiaceae*. e seu potencial modulatório sobre aminoglicosídeos. *Revista Interfaces: Saúde, Humanas e Tecnologia*, , v.2, n.4, 2014.

DOS SANTOS SALES. S.V. et al. Modulación in vitro de la actividad antibiótica por el aceite esencial de frutos de *Piper tuberculatum* Jacq. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v. 22, n. 1, 2017.

FERRONATTO, A. N.; ROSSI, R.C. Extraction and application of orange peel essential oil as a natural ingredient. **Estudos Tecnológicos em Engenharia**, v. 12, n. 2, 2018.

EDILBERTO A.S.O. Resumo dos Antibióticos que atuam como Antibacterianos. **Apostila Farmacologia**, v.1,n.5, 2011.

FURTADO, F. B. **Caracterização química e atividades biológicas dos óleos essenciais de *Protium heptaphyllum*, *Hedyosmum brasiliense*, *Blepharocalyx salicifolius*, *Baccharis dracunculifolia* e *Nectandra megapotamica***. 2018. Tese (doutorado em Biologia Geral e Aplicada) - Área de concentração Biomoléculas, Instituto de Biociências, Câmpus de Botucatu, UNESP. Botucatu-SP, 2018.

GOBATO, R; GOBATO, A; FEDRIGO, D.F.G. Molecular electrostatic potential of the main monoterpenoids compounds found in oil lemon Tahit-(*Citrus Latifolia Var Tahiti*). **Parana Journal of Science and Education**, v.1,n.1,2015.

HEBERLE, T., et al. Atividade antimicrobiana de óleo essencial de laranja. In: *Embrapa Clima Temperado-Artigo em anais de congresso (ALICE)*. In: Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, v.25. n.6 international technical symposium, 10, 2016, Gramado. Alimentação: árvore que sustenta a vida. Anais, 2016.

LEITE J.J. de D. et al. **Avaliação da atividade moluscicida do óleo essencial de *Citrus sinensis* (L.) osbeck frente aos caramujos transmissores da esquistossomose**. 2018. Dissertação(Programa de Pós-Graduação em Saúde e Ambiente/ccbs) - Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2018.

MEYER, B.N. et al. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plants constituents. **Planta Medica**, v.45, n.4, 1982.

PIRES, T. C.; PICCOLI, R. H.. Efeito inibitório de óleos essenciais do gênero *Citrus* sobre o crescimento de micro-organismos. **Revista do Instituto Adolfo Lutz** v.71,n.2, 2012.

POMBO, J. C. P. et al. Efeito antimicrobiano e sinérgico de óleos essenciais sobre bactérias contaminantes de alimentos. **Segurança Alimentar e Nutricional**, v.25, n.2, 2018.

RODRIGUES, G. et al. Study of the interference between *Plectranthus* species essential oils from Brazil and aminoglycosides. **Evidence-based complementary and alternative medicine**, v.1. n.1, 2013.

SILVA. Análise da secagem de limão tahiti (*Citrus latifolia* – **Tanaka em fatias e de suas frações: epicarpo, mesocarpo e endocarpo**, 2015. Dissertação (mestrado em engenharia química) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos – SP, 2015.

SIMAS, D. L.R et al. Characterization of essential oils of citrus fruits. **Citrus Research & Technology**, v. 36, n. 1, 2017.