



CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Citrus sinensis* (L.) OSECK.

DA SILVA¹, Vitor Hugo Neves, LOPES¹, Aniele da Silva Neves, DE SOUZA¹, Celine menezes, CORRÊA¹, Geone Maia, DO CARMO¹, Dominique Fernandes de Moura.

¹Instituto de Ciências Exatas e Tecnologia – Universidade Federal do Amazonas Rua Nossa Senhora do Rosário, 3683 – Tiradentes – Itacoatiara/AM
hugor__ns@hotmail.com, aniele.neves16@gmail.com, cmdsufam20@gmail.com, geonemaia@ufam.edu.br, dominiquefmc@ufam.edu.br

Palavras-Chaves: óleo essencial, citrus, inseticida, atividades biológicas.

INTRODUÇÃO

As plantas têm grande utilidade para fins medicinais desde o início da civilização humana com o objetivo de prevenção, tratamento e cura de diversas doenças. (OLIVEIRA, 2020). A busca pelo conhecimento sobre as plantas aromáticas é bastante milenar, sendo que antigas civilizações utilizavam partes das plantas para fins religiosos, cosméticos e medicinais, baseadas no conhecimento popular para tratar muitas doenças. (SERAFINI et al., 2002). Diferentes espécies de plantas estão sendo estudadas, bem como o isolamento de seus princípios ativos, servindo de modelo para o descobrimento de novas substâncias. Os produtos naturais estão cada vez mais em evidência, e os óleos essenciais ganham destaque por sua mistura de substâncias complexas e voláteis, conferindo às plantas seus aromas específicos. Sendo assim atuam como sistemas de defesa no reino vegetal, visto que são fontes de agentes biocidas e apresentam atividades bactericidas, inseticidas e fungicidas. (GOMES, 2015). Os óleos essenciais originam-se do metabolismo secundário das plantas, sendo constituídos por uma mistura de compostos, principalmente monoterpenos, sesquiterpenos, e derivados oxigenados (álcoois, aldeídos, ester, éteres, cetonas, fenóis e óxidos). Outros compostos voláteis incluem fenilpropanoides e substâncias contendo enxofre ou nitrogênio (Bajpai et al., 2008). Nos óleos essenciais, mesmo quando apresentam um componente majoritário, não necessariamente será o único responsável pelo seu aroma; é o caso dos óleos essenciais de cítricos, nos quais os terpenóides oxigenados contribuem com maior intensidade no aroma mesmo sendo o D-limoneno o componente majoritário (SANTOS; SERAFINI; CASSEL, 2003). Os componentes da família Rutaceae são fortemente aromáticos devido ser presente os óleos essenciais que possuem importância considerável como fonte de frutas cítricas. (LOPES et al, 2013). A qualidade e quantidade dos óleos essenciais da casca de frutos de citros dependem de muitos fatores, tais como a natureza do fruto em si, proveniência, genótipo, tipo de solo e clima, mas também do processo de extração (Palazzolo et al., 2013).

Tendo em vista o elevado consumo destes óleos essenciais associados à importância de assegurar a sua qualidade, o objetivo deste trabalho foi analisar o óleo essencial das cascas secas



e frescas de laranja doce *Citrus sinensis* (L.) Osbeck obtido através do método de extração por hidrodestilação, comparando sua composição química e rendimento, e seu potencial antimicrobiano deste modo, comprovando que o óleo obtido poderá ser utilizado futuramente em projetos na instituição incentivando o desenvolvimento de bioprodutos contendo estes óleos essenciais.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta do material botânico.

A amostra das cascas de laranja do gênero *Citrus sinensis* (L.) foram coletadas no município do Itacoatiara- na comunidade do Novo Remanso, os frutos foram coletados e levados ao laboratório de pesquisa para a retirada do mesocarpo e para a extração do óleo essencial.

Isolamento do óleo essencial dos frutos de *C. sinensis* (L.)

As cascas foram submetidas separadamente à hidrodestilação, utilizando-se o aparelho Clevenger modificado, acoplado a um balão de fundo redondo, com capacidade para 5 L, durante 3 h.

Em seguida serão submetidos à centrifugação à 3500 RPM por 10 minutos para separar o óleo essencial da água. As extrações serão realizadas em triplicatas, com aproximadamente 400 g do material triturado em cada balão. Os (OEs) obtidos serão armazenados em frascos de vidro âmbar, vedados e conservados à -4 °C. A amostra foi codificada como OE-LJ.

Os rendimentos obtidos dos óleos essenciais foram calculados baseados no peso das folhas (v/m) e em função do peso do óleo sobre as folhas. Seguindo a regra:

$$R_V(\%) = \frac{V_{oleo}}{m_{folhas}} \quad Rm(\%) = m_{oleo} * 100$$

Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/EM)

As análises de espectrometria de massas por impacto de elétrons foram desenvolvidas em um sistema de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas do tipo QP2010 da Shimadzu. Para cromatografia dos componentes foi empregada coluna DB-5MS, com 30 m x 0,25 mm, espessura do filme interno de 0,25µm. A identificação dos constituintes foi interpretada com seus respectivos espectros de massas e índice de retenção linear (Índice de Kovat's), e por comparação com dados da literatura.



Será realizado o cálculo do índice aritmético (IA) que correlaciona o tempo de retenção dos compostos analisados aos de alcanos. Nesta equação serão considerados os tempos de retenção do alcano anterior ($Tr(P_z)$) e posterior ($Tr(P_{z+1})$) ao tempo de retenção dos compostos analisados ($Tr(x)$) e o número de carbono do alcano ($C(P_z)$) com tempo de retenção anterior ao analisado.

O IA será calculado através da Equação 1, utilizando o tempo de retenção do composto analisado e dos padrões de alcanos (C8-C30) previamente injetados utilizando a mesma metodologia.

$$LA(x) = 100C(P_z) + 100\left[\frac{(T_{R(x)} - T_{R(P_z)})}{T_{R(P_{z+1})} - T_{R(P_z)}}\right] \quad (\text{EQUAÇÃO 1})$$

O IA calculado será comparado com o de compostos isolados tabelados por Adams (2007). Além disso, o IA calculado, também foi comparado com a NIST (2014), nas mesmas condições utilizadas para a análise em CG-EM.

Avaliação da atividade antimicrobiana

Para análise antimicrobiana foram utilizados a técnica de difusão em ágar (Kirby e Bauer, 1966), onde as bactérias indicadoras padronizadas foram semeadas com o auxílio de swab estéril em placa de Petri contendo meio Ágar Mueller Hinton. Discos de papel (6 mm) foram embebidos com 30 µl de cada extrato solubilizados em metanol na concentração de 2 mg/mL e deixados evaporar por 24h, como descrito na figura 2, abaixo.

Os discos foram colocados nas placas previamente semeadas com os microrganismos testes padronizados. As placas foram armazenadas em geladeira *overnight* e então incubadas a 35 °C/37 °C por 24h a 48h para bactérias e leveduras respectivamente. Após o período de incubação foi avaliado a formação do halo de inibição.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Rendimento das propriedades físicas dos óleos essenciais das cascas de *C. sinensis* (L.).

A hidrodestilação das cascas de *C. sinensis* (L.) apresentou um óleo, com uma coloração amarelo-clara com aroma agradável e denso. O óleo essencial das cascas OE-LJ, apresentou um rendimento de 2,05%, descrito na tabela 1. O rendimento do OE, foi próximo ao apresentado por Assunção (2013) com o valor de 2,47%. De acordo com Martins et al. (2006), vários fatores podem estar envolvidos quanto ao teor de um composto em OE, como local de coleta, fertilidade do solo, sazonalidade, idade do vegetal, radiação solar, pluviosidade, ataque de insetos, herbívoros, origem



geográfica e genética. As referidas variações nos rendimentos dos OEs podem ser atribuídas ao tipo de extração e às precauções relacionadas com armazenamento das cascas antes da extração, diferenças de época de colheita, tipo de solo, clima da região e umidade relativa do ar no dia da coleta da fruta (Millezi et al., 2013).

Tabela 1. Rendimento do óleo essencial das cascas de *C. sinensis* (L.)

Amostra vegetal	Mês/ano	Temperatura	Código da amostra	Massa do vegetal(g)	Rendimento
<i>C. sinensis</i> (L.)	Novembro /2019	27°C	OE-LJ	400	2,05%

Fatores abióticos como luminosidade, temperatura, pluviosidade, nutrição, época e horário de coleta, bem como técnicas de colheita e pós-colheita, podem apresentar correlações entre si, não atuando isoladamente, exercendo influência conjunta no metabolismo secundário (MORAIS, 2009). Entretanto muitos fatores podem influenciar no rendimento dos óleos tais como: Densidade de plantio e Sazonalidade. Trapp & Croteau (2001), relatam que o rendimento do óleo pode variar de acordo com os fatores ambientais, material vegetal ou método de extração.

Composição química do óleo

A análise dos constituintes do OE foi analisada na Universidade Federal do Amazonas por Cromatografia acoplada a espectrometria de massas (CG-EM) foi possível identificar 100% da composição química do óleo essencial de OE-LJ .Na tabela 2, mostra a composição química do óleo essencial juntamente com a área, tempo de retenção de cada composto, Índice de Kovats calculado e o Índice de Kovats tabelado. Um total de 33 compostos que foram detectadas por CG-EM e observadas no cromatograma, abrangendo os constituintes monoterpênicos e sesquiterpênicos tanto hidrocarbonetos como oxigenados.

O OE da laranja pode conter até 300 diferentes substâncias químicas. Os componentes majoritários são os monoterpênicos limoneno (94%), α -pineno (0,54%), sabineno (0,74%) e mirceno (1,18%) (MARRIOTT; SHELLIE; CORNWELL, 2001).

Tabela 2- Substâncias presentes no óleo essencial da de *C.sinensis* (L.)

TR	I.KCAL	I.KTAB	SUBSTÂNCIA	CLASSE	AREA %
9,18	934	942	β -Citroneleno	MH	7,33



10,8	885	884	Santeno	MH	4,09
11,54	945	945	α -Fencheno	MH	0,32
12,16	959	969	trans Pineno	MH	9,63
12,72	961	961	Verbeneno	MH	0,26
12,92	963	969	Sabineno	MH	1,87
13,37	969	974	β - Pineno	MH	1,35
13,75	974	980	trans Isolimonoeno	MH	2,56
14,07	978	982	cis-Pineno	MH	0,35
15,19	1044	1044	<(E)- β ->Ocimeno	MH	0,15
15,69	1050	1054	γ -Terpineno	MH	2,3
18,45	1087	1089	ρ Cimeneno	MH	0,29
18,95	1094	1095	Linalol	MO	0,16
22,37	1244	1244	Car-3-en-2-one	MO	8,43
24,05	1269	1271	neo -Metil acetato	SO	1,3
24,9	1301	1304	iso-Metil acetato	SO	0,17
25,28	1287	1287	Fenchol -2-ethyl-endo-	MO	3,56
25,81	1295	1293	Isomentone -2-etil	SO	1,22
26,23	1353	1356	Eugenol	MO	4,24
26,64	1283	1288	Limonen-10-ol	MO	8,26
27,7	1376	1380	Dauceno	SH	0,61
28,55	1389	1389	Elemeno< β ->	SH	2,88
29,04	1448	1452	Umuleno< α ->	SH	10,52
29,45	1455	1452	Cloveno< α -neo->	SH	4,83
30,07	1466	1470	Acoradieno< β ->	SH	12,47
30,83	1478	1478	Muroleno< γ ->	SH	3,78
31,04	1482	1489	Selineno< β ->	SH	0,49
31,51	1490	1492	Guaieno<cis- β ->	SH	1,02
32,15	1552	1554	Vetiveneno < β ->	SH	0,27
32,87	1564	1566	Maliol	SO	0,59
33,23	1571	1576	Santalenone	SO	0,86
33,57	1577	1586	Gleenol	SO	0,85
34,66	1647	1649	Eudesmol< β ->	SO	3,07

Atividade antimicrobiana

Tabela 3- Resultado das atividades antimicrobianas do OE extraídos das cascas de frutas cítricas frente aos microrganismos *Enterococcus faecalis* e a *Escherichia coli*.

Amostra	<i>E. faecalis</i>	<i>E. coli</i> .
OE-LJ	++	+

Baixa (+): diâmetro do halo de inibição entre 7 a 12 mm; **Moderada (++):** diâmetro do halo de inibição entre 13 a 16 mm; **Alta (+++):** diâmetro do halo de inibição superior a 17 mm, **Negativo (-):** ausência de halo;

Fonte: Autor, 2022.



Por meio do teste antimicrobiano verificou-se que o óleo essencial testado foi efetivos no controle do desenvolvimento dos microrganismos testados, sendo o potencial antimicrobiano diferente em função da espécie testada. Além disso estima-se que a atividade antimicrobiana de OEs das cascas de frutas cítricas estudadas está relacionada a sua constituição química que pode ser influenciada pelo método de extração e pelas condições de cultivo da planta (Costa et al., 2012).

Costa e colaboradores, (2012), verificaram a atividade antimicrobiana de OEs das cascas de frutas cítricas estudadas está relacionada a sua constituição química que pode ser influenciada pelo método de extração e pelas condições de cultivo da planta. Para a amostra testada, pôde-se comprovar uma moderada atividade antimicrobiana frente *E. faecalis*, este resultado pode indicar uma ação antimicrobiana de substâncias majoritárias como o Limonen-10-ol e o β -pineno ou o efeito sinérgico entre outros compostos.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo sobre a composição química do óleo essencial das cascas de *C. sinensis* (L.), possibilitou identificar 33 substâncias no OE--LJ, abrangendo monoterpenos e sesquiterpenos. destacando-se 6 constituintes majoritários dentre eles como monoterpenos hidrogenados β -Citroneleno (7,33%). trans Pineno (9,63%), Car-3-em-2-one (8,43%), Limonen-10-ol (8,26%), e sesquiterpenos higrongenados α -Humuleno (10,52%) e β - Acoradieno (12,47%).

Pelo método de difusão em ágar foi detectada atividade antimicrobiana para as amostras: *E. faecalis*; apresentando que houve inibição moderada, *E. coli* apresentou um halo de inibição baixa. Sendo assim o óleo essencial das cascas de laranja apresentaram indícios de inibição frente as bactérias gram-positiva e gram-negativa.

Portanto a partir dos resultados obtidos encontrados pôde-se concluir que a espécie estudada apresenta grande potencial sobre o perfil químico contribuindo em sua caracterização e futuramente podendo avaliar frente a novas atividades biológicas das substancias presentes no óleo essencial.

AGRADECIMENTOS

A Fapeam através da concessão de recursos pelos editais **N. 001/2021 – FAPEAM Mulheres na ciência** e **N. 010/2021 – CT&I Áreas Prioritárias**.



BAKKALI, F. et al. **Biological effects of essential oil: a review.** *Food and Chemical Toxicology*, v.46, n.2, p.446- 75, **2008**.

BORGES, G B, V, et al. **"Extração, caracterização e avaliação microbiológica de óleos essenciais de rejeitos de frutas cítricas comerciais."** *Research, Society and Development* 10.7: e1110716126-e1110716126. **2021**.

Costa, D. A., Oliveira, G. A. L. D., Costa, J. P., Souza, G. F. D., Sousa, D. P. D. & Freitas, R. M. **Avaliação da toxicidade aguda e do efeito ansiolítico de um derivado sintético da carvona,** *Revista Brasileira de Ciências da Saúde*, 16(3), 303-310. ID: 101292200. **2012**.

DOS SANTOS, AC Atti; ATTI-SERAFINI, L.; CASSEL, E. **Estudos de processos de extração de óleos essenciais e bioflavonóides de frutas cítricas.** *Editores da Universidade de Caxias do Sul*, Caxias do Sul, **2003**.

GOMES, M.S. **Caracterização química e atividade antifúngica dos óleos essenciais de cinco espécies do gênero Citrus.** Lavras, MG. Tese de doutorado. *Universidade Federal de Lavras*, 99p. **2015**.

IBRAHIM, M. A.; KAINULAINEN, P.; AFLATUNI, A.; IKKALA, K. T.; HOLOPAINEN, J.K. **Insecticidal, repellent, antimicrobial activity and phytotoxicity of essential oils: whit special reference to limonene and its suitability for control of insect pests.** *Agric Food Scienc Finland*, v. 10: p. 243-259, **2001**.

LOPES, L. T. A. et al. **Composição química e atividade antimicrobiana do óleo essencial e anatomia foliar e caulinar de Citrus limettioides Tanaka** (Rutaceae). *Rev Ciênc Farm Básica Apl.*, **2013**.

MARRIOTT, F. J.; SHELLIE, R.; CORNWELL, C. **Gas chromatographic technologies for the analysis of essential oils.** *Journal of chromatography A*, v. 936, n. 1, p. 1-22, **2001**.

MARTINS, F.T.; Dos Santos, M.H.; Polo, M.; Barbosa, L.Cde.A. **Variação química do óleo essencial de Hyptis suaveolens (L.) Poit., soluço Caracterização química e atividade antifúngica dos óleos essenciais de laranja-Kinkan** (Margarita Fortunella (Lour.) Swingle)197Vol. 28 (2) 2019. 185-198DOI: <https://doi.org/10.24841/fa.v28i2.482>condições de cultivo. *Nova Química*, 29(6): 1203-1209, **2006**.

MILLEZI, A. F. et al. **Caracterização e atividade antibacteriana de óleos essenciais de plantas condimentares e medicinais contra Staphylococcus aureus e Escherichia coli.** *Revista brasileira de plantas medicinais*, v. 15, p. 373-379, **2013**.

OLIVEIRA, A, C, S, D, O. **caracterização química e atividades biológicas do óleo essencial da casca da fruta citrus reticulata.** 2020. 1f (dissertação em mestre em agroquímica) - instituto federal de educação, ciência e tecnologia goiano – campus rio verde - área de concentração agroquímica. rio verde – go novembro, **2020**.

PALAZZOLO, E., Laudicina, V. A. & Germanà, M. A. **Current and Potential Use of Citrus 230 Essential Oils.** *Current Organic Chemistry*, 17(24), 3042- 3049. 10.2174/13852728113179990122, **2013**.

SERAFINI, L.A. et al. **Extrações e aplicações de óleos essenciais de plantas aromáticas e medicinais.** Caxias do Sul: EDUCS, p. 54, 2002. SIMÕES, C, M, O. (Org.). *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 4. ed. Porto Alegre: Ed. da UFSC, **2002**.

TRAPP, S.A.; CROTREAU, R.D. **Genomic organization of plant terpene synthases and molecular evolutionary implications.** *Genetic*. v.158, p.811-32, 2001. VIEGAS, C, J. Terpenos com atividade inseticida: uma alternativa para o controle químico de insetos. *Quim. Nova*, Vol. 26, No. 3, 390-400, **2003**.