

Artigo

Composição Química e Atividades Biológicas dos Óleos Essenciais das Folhas Frescas de *Citrus limonia* Osbeck e *Citrus latifolia* Tanaka (Rutaceae)

Estevam, E. B. B.; Miranda, M. L. D.;* Alves, J. M.; Egea, M. B.; Pereira, P. S.; Martins, C. H. G.; Esperandim, V. R.; Magalhães, L. G.; Bolela, A. C.; Cazal, C. M.; Souza, A. F.; Alves, C. C. F.

Rev. Virtual Quim., 2016, 8 (6), no prelo. Data de publicação na Web: 29 de novembro de 2016

<http://rvq.sbgq.org.br>

Chemical Composition and Biological Activities of the Essential Oils from the Fresh Leaves of *Citrus limonia* Osbeck and *Citrus latifolia* Tanaka (Rutaceae)

Abstract: This study aimed at determining, for the first time, the chemical composition of the essential oils from fresh leaves of *Citrus limonia* and *Citrus latifolia* and evaluating its *in vitro* antibacterial, trypanocidal, leishmanicidal and cytotoxic effects. The essential oils from fresh leaves of *C. latifolia* and *C. limonia* were extracted by hydro distillation and analyzed by GC-MS. The oil yield was 0.8% for *C. latifolia* and 0.5% for *C. limonia*, whereas 17 and 18 chemical components were identified for *C. latifolia* and for *C. limonia*, respectively. Major components were limonene (46.3 %), nerol (10.0 %) and 1,8-cineole (13.4 %). *In vitro* antibacterial activity was evaluated against the bacteria *Streptococcus mitis*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus sobrinus* and *Bacteroides fragilis* by the broth dilution method. Protozoa of the Trypanosomatidae family cause neglected tropical diseases, such as trypanosomiasis, whose treatment has depended on few available drugs. Therefore, the essential oils from fresh leaves of *C. limonia* and *C. latifolia* were also evaluated against the Y strain of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes, resulting in $IC_{50} = 88.2 \mu\text{g/mL}$ and $51.7 \mu\text{g/mL}$, respectively. Regarding the evaluation of the cytotoxic activity against fibroblasts LLCMK₂ line, the essential oil from *C. limonia* ($CC_{50} = 422.9 \mu\text{g/mL}$) and *C. latifolia* ($CC_{50} = 502.9 \mu\text{g/mL}$) showed moderate cytotoxicity. The leishmanicidal activity of the essential oils from fresh leaves of *C. limonia* and *C. latifolia* were evaluated against promastigote forms of *Leishmania amazonensis*, resulting in $IC_{50} = 2.63 \mu\text{g/mL}$ and $2.03 \mu\text{g/mL}$, respectively. Thus, the essential oils from fresh leaves of *Citrus limonia* and *Citrus latifolia* had moderate antibacterial and trypanocidal activities and significant leishmanicidal activity.

Keywords: *Citrus limonia*; *Citrus latifolia*; sesquiterpenes; antibacterial activity; *Trypanosoma cruzi*; *Leishmania amazonensis*; cytotoxicity.

Resumo

O objetivo deste estudo foi determinar pela primeira vez a composição química dos óleos essenciais das folhas frescas de *Citrus limonia* e *Citrus latifolia* e avaliar seus efeitos: antibacteriano, tripanocida, leishmanicida e citotóxico *in vitro*. Os óleos essenciais das folhas frescas de *C. latifolia* e *C. limonia* foram obtidos por hidrodestilação e analisados por CG-EM. O rendimento do óleo foi de 0,8% para *C. latifolia* e 0,5% para *C. limonia*, sendo identificados 17 constituintes químicos para *C. latifolia* e 18 constituintes químicos para *C. limonia*. Os componentes principais foram limoneno (46,3%), nerol (10,0%) e 1,8-cineole (13,4%). Foi avaliada a atividade antibacteriana *in vitro* frente às bactérias *Streptococcus mitis*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus sobrinus* e *Bacteroides fragilis* pelo método de diluição em caldo. Protozoários da família tripanossomatídea causam doenças tropicais negligenciadas como a tripanossomíase, para as quais estão disponíveis poucos medicamentos. Neste contexto, os óleos essenciais das folhas frescas de *C. limonia* e *C. latifolia* foram avaliados frente às formas tripomastigotas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi*, apresentando valores de $CI_{50} = 88,2 \mu\text{g/mL}$ e $51,7 \mu\text{g/mL}$, respectivamente. Quando avaliada a atividade citotóxica frente a fibroblastos da linhagem LLCMK₂, os óleos essenciais de *C. limonia* ($CC_{50} = 422,9 \mu\text{g/mL}$) e *C. latifolia* ($CC_{50} = 502,9 \mu\text{g/mL}$) apresentaram moderada citotoxicidade. A atividade leishmanicida dos óleos essenciais das folhas frescas de *C. limonia* e *C. latifolia* foi avaliada frente às formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*, apresentando valores de $CI_{50} = 2,63 \mu\text{g/mL}$ e $2,03 \mu\text{g/mL}$, respectivamente. Estes resultados demonstram que os óleos essenciais das folhas frescas de *Citrus limonia* e *Citrus latifolia* apresentaram moderada atividade antibacteriana e tripanocida e expressiva atividade leishmanicida.

Palavras-chave: *Citrus limonia*; *Citrus latifolia*; sesquiterpenos; atividade antibacteriana; *Trypanosoma cruzi*; *Leishmania amazonensis*; citotoxicidade.

* Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sul de Minas Gerais, Campus Pouso Alegre, CEP 37550-000, Pouso Alegre-MG, Brasil.

✉ mayker.miranda@ifsuldeminas.edu.br

DOI:

Composição Química e Atividades Biológicas dos Óleos Essenciais das Folhas Frescas de *Citrus limonia* Osbeck e *Citrus latifolia* Tanaka (Rutaceae)

Elisângela B. B. Estevam,^a Mayker L. D. Miranda,^{b,*} José Milton Alves,^a Mariana B. Egea,^a Paulo Sérgio Pereira,^a Carlos Henrique G. Martins,^c Viviane R. Esperandim,^c Lizandra G. Magalhães,^c Ana Carolina Bolela,^c Cristiane M. Casal,^d Alex F. Souza,^e Cassia Cristina F. Alves^a

^a Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano, *Campus* Rio Verde, CEP 75901-970, Rio Verde-GO, Brasil.

^b Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sul de Minas Gerais, *Campus* Pouso Alegre, CEP 37550-000, Pouso Alegre-MG, Brasil.

^c Centro de Pesquisa em Ciências Exatas e Tecnologia, CEP 14404-600, Franca – SP, Brasil.

^d Universidade de Franca, Instituto Federal do Sudeste de Minas, *Campus* Barbacena, CEP 36205-018, Barbacena-MG, Brasil.

^e Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Mato Grosso do Sul, *Campus* Coxim, CEP 79400-000, Coxim-MS, Brasil.

* mayker.miranda@ifsuldeminas.edu.br

Recebido em 20 de novembro de 2015. Aceito para publicação em 28 de novembro de 2016

1. Introdução

2. Parte Experimental

2.1. Materiais vegetais

2.2. Extrações dos óleos essenciais

2.3. Análises dos óleos essenciais

2.4. Identificação dos constituintes químicos dos óleos essenciais

2.5. Atividade antibacteriana

2.6. Atividade tripanocida

2.7. Atividade citotóxica

2.8. Atividade leishmanicida

3. Resultados e Discussão

4. Conclusão

1. Introdução

A família Rutaceae apresenta 150 gêneros e 1.500 espécies, distribuídas em regiões tropicais, subtropicais e temperadas do mundo, sendo mais abundante na América tropical, Sul da África e Austrália. No Brasil, a família está representada por aproximadamente 29 gêneros e 182 espécies, com algumas de importância medicinal, ecológica e econômica.¹

As espécies do gênero *Citrus* são ricas em flavonoides, óleos voláteis, cumarinas e pectinas. Estudos anteriores demonstraram que o óleo volátil da casca do fruto de *Citrus aurantium* apresenta atividade sedativa e hipnótica, ao contrário do extrato etanólico das folhas, que não apresenta estas atividades. O suco dos frutos de *C. aurantium* exibiu também atividade antimicrobiana *in vitro* e, devido à presença da *p*-sinefrina (Figura 1), produziu redução do consumo de alimento e do ganho de massa corporal e reduziu a pressão portal em ratos.²

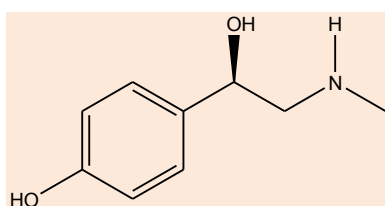


Figura 1. Estrutura da *p*-sinefrina

O presente trabalho aborda o estudo de óleos essenciais (OEs) que podem ser extraídos de plantas através da técnica de arraste a vapor, por hidrodestilação utilizando o aparato clevenger e também pela prensagem do pericarpo de frutos cítricos, que no Brasil dominam o mercado de exportação. Estes óleos são compostos principalmente de mono e sesquiterpenos e de fenilpropanoides, metabólitos que conferem suas características organolépticas.³

Em especial, os óleos cítricos são muito versáteis e são principalmente utilizados como aromatizantes em bebidas, sabonetes, cosméticos, produtos domésticos entre outros. Esses óleos são também bastante usados em tratamentos médicos e são conhecidos por exibir propriedades antimicrobianas, como antifúngica, antibacteriana, antiviral e antiparasitária.⁴

A espécie *Citrus latifolia* Tanaka (limão tahiti) é um fruto de origem tropical, de exploração econômica relevante. Os principais produtores são o México, EUA (Flórida), Egito, Índia, Peru e Brasil. No Brasil destaca-se o Estado de São Paulo que é o

maior produtor deste fruto, tendo participação em 81,3% da produção, seguido por Rio de Janeiro e Bahia, com 3,9% e 2,7%, respectivamente.⁵

A espécie *Citrus limonia* Osbeck, é conhecida como limão china ou limão rosa sendo extensamente cultivado em pomares e viveiros, pois induz a maturação precoce das frutas, proporcionando melhores preços no início da safra, além de ser utilizado como porta-enxerto.⁶

Derivados de plantas como extratos vegetais, óleos essenciais, e compostos puros, já foram avaliados em relação aos seus efeitos antimicrobianos contra agentes patogênicos orais como *Streptococcus mitis*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus sobrinus* e *Bacteroides fragilis*. Estes derivados têm atraído o interesse de grupos de pesquisa, uma vez que podem ser empregados no desenvolvimento de novas soluções para enxague bucal utilizado na higiene oral. No entanto, relatos sobre a atividade antimicrobiana de produtos naturais contra patógenos bucais ainda são escassos.⁷

As doenças tropicais negligenciadas são um grupo de 17 doenças consideradas infecções crônicas comuns em pessoas mais carentes, de países menos desenvolvidos.⁸ Neste cenário, destaca-se a doença de Chagas, que é causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* e que atualmente, conta apenas com, a quimioterapia como forma de tratamento específico disponível para esta doença, sendo benzonidazol o medicamento utilizado.⁹

A leishmaniose é outra doença infecciosa não contagiosa, causada por protozoários do gênero *Leishmania* e que afeta mais de 12

milhões de pessoas mundialmente. O tratamento é feito à base de antimoniais pentavalentes, anfotericina B e pentamidinas, as quais são tóxicas, de custo elevado, difícil administração e podem gerar resistência do parasito.¹⁰

O objetivo deste trabalho foi determinar pela primeira vez a composição química dos óleos essenciais das folhas frescas de duas espécies de *Citrus* ocorrentes no sudoeste goiano, *Citrus latifolia* e *Citrus limonia* (Figura 2), e avaliar seu efeito antibacteriano, tripanocida, leishmanicida e citotóxico *in vitro*.



Figura 2. Folhas, flor e frutos de *Citrus latifolia* (A). Folhas, flores e frutos de *Citrus limonia* (B)

2. Parte Experimental

2.1. Materiais vegetais

As folhas frescas de *C. latifolia* e *C. limonia* foram coletadas na região de Rio Verde-GO em agosto de 2015. Os materiais vegetais foram identificados e uma amostra depositada no Herbário Jataiense Professor Germano Guarin Neto sob os registros n° HJ 7521 e HJ 7522, respectivamente.

2.2. Extrações dos óleos essenciais

As folhas frescas foram reduzidas em moinho de facas e submetidas às extrações dos óleos essenciais pelo método de hidrodestilação em aparelho do tipo clewenger, por um período de 2 horas a partir da ebulição.¹¹ Em seguida, o hidrolato foi submetido à partição líquido-líquido em funil de separação. Foram realizadas três lavagens do hidrolato com três porções de 10 mL de diclorometano. Os óleos essenciais extraídos foram secos com sulfato de sódio anidro, acondicionados em pequenos frascos de vidro âmbar e mantidos sob refrigeração até a realização dos ensaios biológicos.

2.3. Análises dos óleos essenciais

Os óleos essenciais foram diluídos em hexano e submetidos à análise em cromatógrafo em fase gasosa modelo QP-5000 da Shimadzu® com detector por espectrometria de massas (CG-EM). A análise foi realizada com coluna capilar de sílica fundida, modelo DB-5 (30 m de comprimento x 0,25 mm de diâmetro interno x 0,25 µm de espessura de filme) da Shimadzu®, sendo utilizado como gás de arraste hélio (He) em fluxo de 1,0 mL/min. A injeção em modo Split 1:20 foi realizada com injetor a 240 °C. A temperatura do detector foi de 270 °C e o forno de 60 a 180 °C a 3 °C/min. Para a detecção foi aplicada a técnica de impacto eletrônico a 70 eV. Foram realizadas três repetições para os óleos essenciais analisados.

2.4. Identificação dos constituintes dos óleos essenciais

A determinação da composição química dos óleos essenciais foi realizada através dos espectros de massas, obtidos por CG-EM. Os compostos voláteis foram identificados por comparação dos tempos de retenção obtidos com os tempos de retenção de hidrocarbonetos lineares (série homóloga de C₁₀-C₂₉) que foram coinjetados com a amostra. Os índices de retenção e os espectros de massas foram comparados com dados das espectrotecas Wiley e Nist e da literatura.¹²

2.5. Atividade antibacteriana

As cepas testadas foram obtidas junto a American Type Culture Collection (ATCC, RockvilleMD, EUA). Os micro-organismos usados na avaliação da atividade antibacteriana do óleo essencial das folhas frescas de *C. latifolia* e *C. limonia* foram: *Streptococcus mitis* (ATCC 49456), *Streptococcus mutans* (ATCC 25175),

Streptococcus sanguinis (ATCC 10556), *Streptococcus sobrinus* (ATCC 33478) e *Bacteroides fragilis* (ATCC 25285).

Os valores de concentração inibitória mínima (CIM) do óleo essencial foram determinados em triplicata pelo método de microdiluição, em microplacas com 96 poços (TPP, EUA).¹³ As amostras foram dissolvidas em dimetilsulfóxido (DMSO, Synth, São Paulo, Brasil; 8000 µg/mL), diluídas em caldo de soja triptica (Difco, Detroit, MI, EUA) para bactérias aeróbias e Schaedler Caldo (Difco), suplementado com hemina (5,0 µg/mL) e vitamina K (10,0 µg/mL) para as bactérias anaeróbias, com a finalidade de atingir concentrações variando de 400 a 12,5 µg/mL. A concentração de DMSO final foi de 4% (v/v), e esta solução foi usada como um controle negativo. O inóculo foi ajustado para cada organismo a fim de se obter uma concentração de células de 5×10^5 unidades formadoras de colônias por mL, de acordo com o *National Committee for Clinical Laboratory Standard* (NCCLS).¹⁴ O dicloridrato de clorexidina (DCC, Sigma, Poole, Dorset, Reino Unido) foi utilizado como controle positivo, e as concentrações variaram de 0,0115 µg/mL a 5,9 µg/mL. Foram realizados os controles de esterilidade dos caldos TSB e SCHAEDLER, esterilidade do dicloridrato de clorexidina, esterilidade da amostra, controle da cultura (inóculo) e o controle do DMSO. As microplacas (96 poços) com os micro-organismos aeróbios foram fechadas com um vedante de placa estéril e incubadas aerobicamente a 37 °C durante 24 h. Os micro-organismos anaeróbios foram fechados com um vedante de placa estéril e incubados de 48 a 72 horas numa câmara anaeróbia (Don Whitley Scientific, Bradford, Reino Unido), a 37 °C, com 5 % a 10 % de H₂, 10 % de CO₂ e 80 % a 85 % de N₂. Logo depois, resazurina (Sigma, 30 µL) em solução aquosa (0,01 %) foi adicionada para indicar viabilidade de micro-organismos. Os valores de CIM foram determinados a partir da concentração mais baixa de óleo essencial, capaz de inibir o crescimento de micro-organismos.

2.6. Atividade tripanocida

Foi utilizada a cepa Y de *Trypanosoma cruzi*, constituída por formas tripomastigotas delgadas.¹⁵ Esta cepa vem sendo mantida no Biotério da Universidade de Franca, através de repiques sucessivos em camundongos Swiss, por punção cardíaca no dia do pico parasitêmico (7º dia da infecção). Procedimento aprovado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal do Comitê de Ética da Universidade de Franca sob o protocolo número 010/14.

O ensaio foi realizado utilizando-se sangue de camundongos albinos infectados, obtido por punção cardíaca no pico parasitêmico (7º dia da infecção). O sangue infectado foi diluído com solução fisiológica de forma a se obter uma concentração final de sangue com 10^6 formas tripomastigotas/mL.

As amostras dos óleos essenciais foram diluídas em DMSO e alíquotas desta solução estoque foram adicionadas ao sangue infectado na placa de microtitulação (96 poços), totalizando um volume de 200 μ L.

Para a realização do ensaio tripanocida, as amostras foram avaliadas em triplicata nas concentrações de 200, 100, 50, 25 e 12,5 μ g/mL. Como controles foram utilizados: (1) Controle positivo: benzonidazol; (2) Controle negativo: 0,5% de DMSO.

A microplaca foi incubada a 4°C por 24 horas, sendo que após este período, a atividade foi verificada quantitativamente, através da contagem das formas tripomastigotas, de acordo com a técnica já descrita na literatura¹⁶ e a determinação da porcentagem de lise parasitária foi realizada através da comparação com o grupo de controle sem tratamento.

2.7. Atividade citotóxica

Fibroblastos da linhagem LLCMK₂ foram cultivados em meio Roswell Park Memorial Institute (RPMI-Gibco) 1640, suplementado

com 10% de soro bovino fetal inativado (100 mL de soro) com 2,5 mL de estreptomicina e 2,5 mL de penicilina, em garrafas de cultura a 37°C em ambiente a 5% de CO₂, com umidade de 95%. O meio de cultura com as células foi transferido para um tubo fálcon estéril e centrifugado (1500 rpm a 4°C por 15 minutos). Após a centrifugação o sobrenadante foi descartado e 1 mL de RPMI foi acrescentado para atingir a concentração final de 10^6 fibroblastos da linhagem LLCMK₂/mL. Foi realizado um novo cultivo por 24 horas em estufa de CO₂, e em seguida foi feita a leitura das placas em leitor de ELISA a 517 nm, através da técnica colorimétrica pelo MTT. Para a realização do ensaio de citotoxicidade, as amostras foram avaliadas nas concentrações de 400, 200, 100, 50, 25, 12,5 e 6,25 μ g/mL em triplicata. Como controle positivo foi utilizado DMSO 25% (Sigma®) e controle negativo DMSO (Sigma®) a 0,5%. Os ensaios foram realizados em triplicata, e os resultados foram expressos como concentração citotóxica 50% (CC₅₀), calculada pela estatística sigmoide, método de curva de concentração-resposta utilizando o *GraphPad Prism* (GraphPad Software Corporation, versão 5.0).

2.8. Atividade leishmanicida

Para avaliação da atividade leishmanicida, as formas promastigotas de *L. amazonensis* (MHOM/BR/PH8) foram mantidas em meio de cultura RPMI 164 (Gibco) suplementado com 10% de soro fetal bovino. Posteriormente, cerca de 1×10^6 parasitos foram distribuídos em placas de 96 poços e os óleos essenciais foram previamente dissolvidos em DMSO (Synth) e adicionados às culturas nas concentrações de 3,12 a 50 μ g/mL. Anfotericina B foi adicionada nas culturas nas concentrações de 0,19 a 3,12 μ g/mL. As culturas foram incubadas a 25°C em estufa BOD (Quimis) por 24h e a atividade leishmanicida foi determinada pela inibição do crescimento das formas promastigotas pela contagem em câmara de Neubauer

(Global Glass – Porto Alegre, BR) do número total de promastigotas vivas, levando-se em consideração a motilidade flagelar. Como controle negativo foi utilizado meio RPMI 1640 (Gibco) contendo 0,1 % de DMSO (Synth) e como controle positivo foi utilizado Anfotericina B (Eurofarma – São Paulo, BR) na concentração de 1 µg/mL. Os resultados foram expressos como a média da porcentagem de lise em relação ao controle negativo (0,1% DMSO). Foram realizados dois experimentos em triplicata. Os valores de concentração inibitória 50% (CI₅₀) foram determinados por meio de curvas de regressão não-linear utilizando o software *GraphPad Prism* versão 5.0 para Windows (*GraphPad* software, USA).

3. Resultados e Discussão

As extrações dos óleos essenciais das folhas frescas de *Citrus latifolia* e *Citrus limonia* forneceram rendimentos de 0,8% e 0,5%, respectivamente. Por CG-EM foram identificados 17 constituintes químicos no óleo essencial de *C. latifolia* (total de 82,2%) e 18 constituintes químicos para *C. limonia* (total de 91,9%). Os componentes identificados, índices de retenção e porcentagem relativa (%) estão apresentados na Tabela 1. Os componentes majoritários foram limoneno (**1**) (46,3%), nerol (**2**) (10,0%) e 1,8-cineol (**3**) (13,4%) (Figura 3).

A atividade antibacteriana dos óleos essenciais das folhas frescas de *C. latifolia* e

C. limonia foi determinada com a finalidade de se verificar sua atividade frente a alguns micro-organismos anaeróbicos e aeróbicos orais (Tabela 2).

Os óleos essenciais estudados apresentaram moderada atividade inibitória frente a todas as bactérias testadas. É reportado na literatura¹⁷ que amostras que exibiram valores de CIM inferiores a 100 µg/mL tiveram atividade antibacteriana considerada boa; de 100 a 500 µg/mL moderada; de 500 a 1000 µg/mL fraca e acima de 1000 µg/mL inativa.

Vários mecanismos são propostos para explicar a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais. Entende-se que a inibição do crescimento microbiano pela ação de óleos essenciais é devida ao dano direto causado à integridade da membrana celular pelos componentes lipofílicos do óleo essencial, o que afeta diretamente a manutenção do pH celular e o equilíbrio de íons inorgânicos. De acordo com a literatura, os efeitos inibitórios dos óleos essenciais são consistentes com a ação dos constituintes monoterpênicos e sesquiterpênicos na membrana celular, e que o dano causado à membrana produz diferentes efeitos em diferentes micro-organismos.¹⁸⁻²⁰

De acordo com a tabela 2, verificou-se atividade inibitória em menores concentrações contra as bactérias *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Streptococcus mitis* ATCC 49456 e *Streptococcus sanguinis* ATCC 10556.

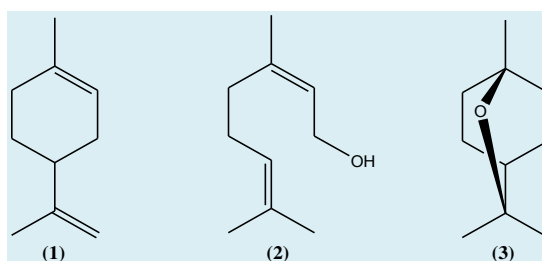


Figura 3. Estruturas químicas dos três constituintes majoritários identificados no óleo essencial das folhas frescas de *Citrus limonia* e *Citrus latifolia*. **(1)** Limoneno, **(2)** Nerol e **(3)** 1,8-Cineol

Tabela 1. Composição química dos óleos essenciais das folhas frescas de *Citrus latifolia* e *Citrus limonia*

Compostos	IR		Área (%)	
	Literatura	Calculado	<i>C. latifolia</i>	<i>C. limonia</i>
Hex-3-en-1-ol	859	852	0,8	-
Mirceno	990	977	-	0,8
Limoneno	1029	1028	46,3	40,0
Nerol	1361	1367	10,0	6,8
1,8-Cineol	1031	1030	4,1	13,4
(<i>trans</i>)-Óxido de limoneno	1142	1137	2,8	3,0
Óxido de cariofileno	1583	1586	2,4	6,9
Geraniol	1267	1274	2,2	3,4
Acetato de geranila	1381	1385	2,2	-
Carvona	1243	1246	1,9	-
Neral	1238	1243	1,9	3,9
β -Citronellol	1225	1230	1,8	-
Lonalool	1096	1100	1,2	2,9
(<i>cis</i>)-Óxido de limoneno	1136	1133	1,2	-
Citronellal	1153	1153	1,2	-
(<i>trans</i>)-Óxido de Linalool	1086	1088	0,7	-
(<i>cis</i>)-Óxido de Linalool (piranoide)	1074	1071	0,8	-
(<i>cis</i>)-Óxido de Linalool (furanoide)	1072	1073	-	1,2
α -Terpineol	1188	1191	0,7	-
<i>p</i> -Cimeno	1024	1024	-	0,7
Sabineno	1070	1067	-	0,3
Isopulegol	1159	1156	-	1,7
Pinocarvona	1164	1163	-	0,7
α -Terpineol	1188	1192	-	2,3
(<i>trans</i>)-Carveol	1216	1220	-	1,7
(4 <i>E</i>)-Decen-1-ol	1262	1260	-	1,0
Citronelal	1273	1276	-	1,2
Total (%)			82,2	91,9

IR: índice de retenção determinado em coluna DB-5

Tabela 2. Efeito inibidor dos óleos essenciais das folhas frescas de *C. latifolia* e *C. limonia* frente a bactérias aeróbias e anaeróbias

Micro-organismos	CIM	CIM	CIM
	<i>C. latifolia</i>	<i>C. limonia</i>	DCC
<i>Streptococcus mutans</i> ^a (ATCC 25175)	100	200	0,922
<i>S. mitis</i> ^a (ATCC 49456)	200	100	1,844
Aeróbios <i>S. sanguinis</i> ^a (ATCC 10556)	100	400	0,922
<i>S. sobrinus</i> ^a (ATCC 33478)	400	400	0,922
Anaeróbio <i>Bacteroides fragilis</i> ^b (ATCC 25285)	400	400	0,737

^aBactéria gram-positiva; ^bBactéria gram-negativa; **CIM:** Concentração Inibitória Mínima (CIM) – $\mu\text{g/mL}$; **DCC:** Dicloridrato de clorexidina (controle positivo).

Os óleos essenciais estudados apresentaram moderada atividade inibitória frente a todas as bactérias testadas. É reportado na literatura¹⁷ que amostras que exibiram valores de CIM inferiores a 100 µg/mL tiveram atividade antibacteriana considerada boa; de 100 a 500 µg/mL moderada; de 500 a 1000 µg/mL fraca e acima de 1000 µg/mL inativa.

Vários mecanismos são propostos para explicar a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais. Entende-se que a inibição do crescimento microbiano pela ação de óleos essenciais é devida ao dano direto causado à integridade da membrana celular pelos componentes lipofílicos do óleo essencial, o que afeta diretamente a manutenção do pH celular e o equilíbrio de íons inorgânicos. De acordo com a literatura, os efeitos inibitórios dos óleos essenciais são consistentes com a ação dos constituintes monoterpênicos e sesquiterpênicos na membrana celular, e que o dano causado à membrana produz diferentes efeitos em diferentes micro-organismos.¹⁸⁻²⁰

De acordo com a tabela 2, verificou-se atividade inibitória em menores concentrações contra as bactérias *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Streptococcus mitis* ATCC 49456 e *Streptococcus sanguinis* ATCC 10556.

Streptococcus mitis, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguinis* e *Streptococcus sobrinus* são bactérias que apresentam patogenicidade frente ao

esmalte dos dentes e tecido gengival estando diretamente ligadas a cárie e doenças periodontais. A placa bacteriana é definida como um biofilme de micro-organismos, contidos em matriz orgânica formada por substâncias da saliva e da dieta do hospedeiro e por polímeros bacterianos.²¹

Os óleos essenciais avaliados apresentaram também moderada atividade frente a *Bacteroides fragilis*, um gênero bacteriano composto por bastonetes Gram negativos, não esporulados, anaeróbios estritos. *B. fragilis* é considerado patógeno oportunista em humanos, com a capacidade de causar infecções na cavidade peritoneal e levar à formação de abscessos quando ocorre um trauma, por exemplo, no sítio de colonização. Em suma, é frequentemente associado a processos infecciosos, tais como bacteremias, infecções intra-abdominais, abscessos e infecções em tecidos moles.²²

Os óleos essenciais das folhas de *C. limonia* e *C. latifolia* apresentaram ainda moderada atividade tripanocida quando testados frente às formas tripomastigotas de *T. cruzi*. Observou-se o aumento da lise das formas tripomastigota com o aumento da concentração dos óleos essenciais, com valores de CI₅₀ de 88,2 µg/mL para o óleo essencial de *C. limonia* e 51,7 µg/mL para o óleo essencial de *C. latifolia* em 24 horas. No entanto, o controle positivo benzonidazol apresentou valor de CI₅₀ = 9,8 µg/mL em 24 horas (Tabela 3).

Tabela 3. Atividade tripanocida dos óleos essenciais das folhas frescas de *C. latifolia* e *C. limonia* frente à forma tripomastigota de *T. cruzi*

OEs	% de lise±D.P./concentração (µg/mL)					CI ₅₀ (µg/mL)
	200,0	100,0	50,0	25,0	12,5	
<i>C. latifolia</i>	44,8±4,1	45,5±3,1	12,9±3,5	4,7±5,1	1,3±5,0	51,7
<i>C. limonia</i>	53,0±6,1	34,6±2,0	49,6±5,1	0,6±1,1	0±0	88,2

OEs: óleos essenciais; D.P: desvio padrão

É reportado na literatura que amostras que exibiram ($CI_{50} < 10 \mu\text{g/mL}$) tiveram atividade tripanocida considerada altamente ativa, ativa ($CI_{50} > 10 < 50 \mu\text{g/mL}$), moderadamente ativa ($CI_{50} > 50 < 100 \mu\text{g/mL}$) e inativa ($CI_{50} > 100 \mu\text{g/mL}$).²³

A moderada atividade tripanocida observada para os óleos essenciais de *C. latifolia* e *C. limonia* pode ser atribuída aos componentes geranial e neral, que apesar de não serem os constituintes majoritários nos óleos essenciais avaliados é provável que eles estejam relacionados com os outros componentes através do comportamento sinérgico.²⁴

Este é o primeiro relato sobre a atividade tripanocida dos óleos essenciais das folhas de *C. latifolia* e *C. limonia* e apesar dos grandes

avanços alcançados pela medicina moderna nas últimas décadas, as plantas ainda são consideradas muito importantes no que diz respeito aos cuidados com a saúde.²⁵

A avaliação da citotoxicidade em fibroblastos, pelo método colorimétrico do MTT mostrou que os óleos essenciais das folhas de *C. limonia* e *C. latifolia* apresentaram moderada citotoxicidade, com $CC_{50} = 422,9 \mu\text{g/mL}$ observado para o óleo essencial de *C. limonia* e $CC_{50} = 502,9 \mu\text{g/mL}$ para o óleo essencial de *C. latifolia* (Tabela 4), valores maiores que o controle positivo utilizado, o benzonidazol ($CC_{50} = 147,3 \mu\text{g/mL}$). É descrito na literatura²⁴ que quanto menor o valor do CC_{50} , mais citotóxico é o composto avaliado frente à linhagem celular utilizada.

Tabela 4. Atividade citotóxica dos óleos essenciais das folhas frescas de *C. latifolia* e *C. limonia* sobre fibroblastos

OEs	% células viáveis±D.P./concentração ($\mu\text{g/mL}$)							
	6,25	12,5	25,0	50,0	100,0	200,0	400,0	CC_{50}
<i>C. limonia</i>	95,9±4,0	94,3±5,6	90,3±5,5	73,0±2,6	71,0±2,0	65,8±2,7	58,8±1,8	422,9
<i>C. latifolia</i>	100±0	100±0	100±0	100±0	85,5±4,6	74,8±2,8	62,9±3,4	502,9
Benzonidazol	147,3							

OEs: óleos essenciais; CC_{50} ($\mu\text{g/mL}$); D.P: desvio padrão

Os óleos essenciais das folhas frescas de *C. limonia* e *C. latifolia* foram classificados como moderadamente citotóxicos ($CC_{50} > 100 < 1000 \mu\text{g/mL}$) em comparação com dados já descritos na literatura.²³ Esta moderada citotoxicidade dos óleos é um indicador de que a planta pode ser bem tolerada frente ao sistema biológico. Entretanto, estudos mais detalhados para a avaliação da toxicidade destes óleos bioativos empregando-se outros modelos (*in vivo*) se fazem necessários.

Os óleos essenciais das folhas de *C. limonia* e *C. latifolia* apresentaram promissora atividade leishmanicida quando testados frente às formas promastigotas de *L. amazonensis*. Observou-se um aumento da lise dos parasitos também com o aumento da concentração dos óleos essenciais, apresentando valores de CI_{50} de $2,63 \mu\text{g/mL}$ para o óleo essencial de *C. limonia* e CI_{50} de $2,03 \mu\text{g/mL}$ para o óleo essencial de *C. latifolia*, utilizando como padrão o anfotericina B ($CI_{50} = 0,60 \mu\text{g/mL}$) (Tabela 5).

Tabela 5. Atividade leishmanicida dos óleos essenciais das folhas frescas de *C. latifolia* e *C. limonia* frente às formas promastigotas de *L. amazonensis*

OEs	Concentrações (µg/mL) ± Desvio Padrão					
	50,00	25,00	12,50	6,25	3,12	CI ₅₀
<i>C. latifolia</i>	87,17±3,60	78,67±1,51	75,21±8,11	64,26±2,60	55,46±3,02	2,03
<i>C. limonia</i>	100,00	85,15±7,13	70,16±1,55	62,53±2,13	58,06±1,29	2,63

OEs: óleos essenciais; CI₅₀ (µg/mL)

O potencial leishmanicida de óleos essenciais tem sido bastante estudado²⁶ e os óleos essenciais das duas espécies de *Citrus* apresentaram satisfatório efeito leishmanicida e esta atividade pode estar relacionada à presença do componente químico geraniol, que já foi avaliado frente a *L. infantum* apresentando atividade antiparasitária significativa.²⁷ O limoneno, constituinte majoritário no óleo essencial das folhas de *C. latifolia* (46,3%) e *C. limonia* (40,0%), também é digno de menção, visto que suas atividades antitumoral, antibiótica e principalmente antileishmania já foram comprovadas biologicamente.²⁸

4. Conclusão

Os resultados do presente trabalho demonstraram que os óleos essenciais das folhas frescas de *Citrus limonia* e *Citrus latifolia* apresentaram em sua composição química uma mistura de mono e sesquiterpenos, sendo que os constituintes majoritários foram o limoneno (46,3 %), nerol (10,0 %) e 1,8-cineol (13,4 %). Em adição, quando os óleos essenciais foram testados biologicamente, estes demonstraram moderada atividade antibacteriana e tripanocida e promissora atividade leishmanicida, além de apresentarem-se moderadamente tóxico para as células LLCMK₂. Esses resultados indicam que moléculas bioativas presentes nos óleos essenciais das folhas frescas destas duas espécies de *Citrus* ocorrentes no sudoeste goiano podem ser utilizadas como protótipos

para o desenvolvimento de novos fármacos e/ou como fonte de matérias-primas farmacêuticas com atividade antimicrobiana, tripanocida e leishmanicida.

Agradecimentos

À CAPES, CNPq, FAPEG e IF goiano pelo apoio financeiro.

Referências Bibliográficas

- Severino, V. G. P.; Monteiro, A. F.; da Silva, M. F. G.; Lucarini, R.; Martins, C. H. G. Chemical study of *Hortia superba* (Rutaceae) and investigation of the antimycobacterial activity of crude extracts and constituents isolated from *Hortia* species. *Química Nova* **2015**, *38*, 42. [CrossRef]
- Campelo, L. M. L.; Sá, C. G.; Feitosa, C. M.; Sousa, G. F.; Freitas, R. M. Constituintes químicos e estudos toxicológicos do óleo essencial extraído das folhas de *Citrus limon* Burn (Rutaceae). *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais* **2013**, *15*, 708. [CrossRef]
- Bizzo, H. R.; Hovell, A. M. C.; Rezende, C. M. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. *Química Nova* **2009**, *32*, 588. [CrossRef]
- Rehman, S-U.; Hussain, S.; Nawaz, H.; Mushtaq, A. M.; Murtaza, M. A.; Rizvi, A. J. Inhibitory effect of citrus peel essential oils on the microbial growth of bread. *Pakistan Journal of Nutrition* **2007**, *6*, 558. [CrossRef]

- ⁵ Mendonça, L. M. V. L.; Conceição, A.; Piedade, J.; Carvalho, V. D.; Theodoro, V. C. A. Caracterização da composição química e do rendimento dos resíduos industriais do limão tahiti (*Citrus latifolia* Tanaka). *Ciência e Tecnologia de Alimentos* **2006**, *26*, 870. [CrossRef]
- ⁶ Reda, S. Y.; Leal, E. S.; Batista, E. A. C.; Barana, A. C.; Schnitzel, E.; Carneiro, P. I. B. Caracterização dos óleos das sementes de limão rosa (*Citrus limonia* Osbeck) e limão siciliano (*Citrus limon*), um resíduo agroindustrial. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* **2005**, *25*, 672. [CrossRef]
- ⁷ Sousa, R. M. F.; de Moraes, S. A. L.; Vieira, R. B. K.; Napolitano, D. R.; Guzman, V. B.; Moraes, T. S.; Cunha, L. C. S.; Martins, C. H. G.; Chang, R.; Aquino, F. J. T.; Nascimento, E. A.; Oliveira, A. Chemical composition, cytotoxic, and antibacterial activity of the essential oil from *Eugenia calycina* Cambess. Leaves against oral bacteria. *Industrial Crops and Products* **2015**, *65*, 71. [CrossRef]
- ⁸ Hotez, P. J.; Pecoult, B.; Rijal, S.; Boehme, C.; Aksoy, S.; Malecela, M.; Tapia-Conyer, R.; Reeder, J. C. Eliminating the neglected tropical diseases: translational science and new technologies. *PLoS Neglected Tropical Diseases* **2016**, *10*, e0003895. [CrossRef]
- ⁹ Ferreira, E. I. Planejamento de fármacos na área de doença de chagas: avanços e desafios. *Revista Virtual de Química* **2012**, *4*, 225. [CrossRef]
- ¹⁰ Bezerra, J. L.; Costa, G. C.; Lopes, T. C.; Carvalho, I. C. D. S.; Patrício, F. J.; Sousa, S. M.; Amaral, F. M. M.; Rebelo, J. M. M.; Guerra, R. N. M.; Ribeiro, M. N. S.; Nascimento, F. R. F. Avaliação da atividade leishmanicida *in vitro* de plantas medicinais. *Revista Brasileira de Farmacognosia* **2006**, *16*, 631. [CrossRef]
- ¹¹ Siqueira, C. A. T.; Oliani, J.; Sartoratto, A.; Queiroga, C. L.; Moreno, P. R. H.; Reimão, J. Q.; Tempone, A. G.; Fischer, D. C. H. Chemical constituents of the volatil oil from leaves of *Annona coriácea* and *in vitro* antiprotozoal activity. *Revista Brasileira de Farmacognosia* **2011**, *21*, 33. [CrossRef]
- ¹² Adams, R. P.; *Identification of essential oil components by gas chromatography quadrupole mass spectroscopy*, Allured: Card Stream I L, 2001.
- ¹³ Rios, J. L.; Recio, M. C. Medicinal plants and antimicrobial activity. *Journal Ethnopharmacology* **2005**, *100*, 80. [CrossRef] [PubMed]
- ¹⁴ NCCLS. The National Committee for Clinical Laboratory Standards. The Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically; Approved Standard. 6^a ed. NCCLS document M7-A6. Wayne (PA): NCCLS; 2003.
- ¹⁵ Nussenzweig, V.; Klotzel, J. K.; Sonntag, R.; Biancalana, A.; Freitas, J. L. P.; A Neto, V.; Kloetzel, J. K. Ação de corantes trifenilmetânicos sobre o *Trypanosoma Cruzi in vitro*. Emprego da violeta de genciana na profilaxia da transmissão da moléstia de chagas por transfusão de sangue. *Hospital* **1953**, *44*, 731. [PubMed]
- ¹⁶ Brenner, Z. Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* **1962**, *4*, 389. [PubMed]
- ¹⁷ Holetz, F. B.; Pessini, G. L.; Sanches, N. R.; Cortez, D. A. G.; Nakamura, C. V.; Dias, F. B. P. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **2002**, *97*, 1027. [CrossRef] [PubMed]
- ¹⁸ Ayres, M. C. C.; Brandão, M. S.; Vieira-Júnior, G. M.; Menor, J. C. A. S.; Silva, H. B.; Soares, M. J. S.; Chaves, M. H. Atividade antibacteriana de plantas úteis e constituintes químicos da raiz de *Copernicia prunifera*. *Revista Brasileira de Farmacognosia* **2008**, *18*, 90. [CrossRef]
- ¹⁹ Oyedemi, S. O.; Okoh, A. I.; Mabinya, L. V.; Pirochenva, G.; Afolayan, A. J. The proposed mechanism of bactericidal action of eugenol, α -terpineol and γ -terpinene against *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus*

- pyogenes*, *Proteus vulgaris* and *Escherichia coli*. *African Journal of Biotechnology* **2009**, *8*, 1280. [[CrossRef](#)]
- ²⁰ Rahman, A.; Kang, S. C. Inhibition of foodborne pathogens and spoiling bacteria by essential oil extracts of *Erigeron ramosus* (WALT.). *Journal Food Safety* **2009**, *29*, 176. [[CrossRef](#)]
- ²¹ Pereira, J. V.; Pereira, M. S. V.; Sampaio, F. C.; Sampaio, M. C. C.; Alves, P. M.; Araújo, C. R. F.; Higino, J. S. Efeito antibacteriano e antiaderente *in vitro* do extrato da *Punica granatum* Linn. sobre microrganismos do biofilme dental. *Revista Brasileira de Farmacognosia* **2006**, *16*, 88. [[CrossRef](#)]
- ²² Nakano, V.; Avila-Campus, M. J. Virulence Markers and Antimicrobial Susceptibility of Bacteria of the *Bacteroides fragilis* Group Isolated from Stool of Children with Diarrhea in São Paulo, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **2004**, *99*, 307. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ²³ Alves, R. T.; Regasini, L. O.; Funari, C. S.; Young, M. C. M.; Rimoldi, A.; Bolzani, V. S.; Silva, D. H. S.; Albuquerque, S.; Rosa, J. A. Trypanocidal activity of Brazilian plants against epimastigote forms from Y and Bolivia strains of *Trypanosoma cruzi*. *Revista Brasileira de Farmacognosia* **2012**, *22*, 528. [[CrossRef](#)]
- ²⁴ Andrade, M. A.; *Tese de doutorado*, Universidade Federal de Lavras, 2013. [[Link](#)]
- ²⁵ Calixto, J.B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* **2000**, *33*, 179. [[CrossRef](#)]
- ²⁶ Micheletti, A. C.; Beatriz, A. Progressos Recentes na Pesquisa de Compostos Orgânicos com Potencial Atividade Leishmanicida. *Revista Virtual de Química* **2012**, *4*, 268. [[CrossRef](#)]
- ²⁷ Carneiro, J. N. P.; Albuquerque, R. S.; Leite, N. F.; Machado, A. J. T.; Brito, D. I. V.; Rolón, M.; Veja, C.; Coronel, C.; Coutinho, H. D. M.; Moraes-Braga, M. F. B. Avaliação da atividade tripanocida, leishmanicida e citotóxica do geraniol e citronelal. *Cadernos de Cultura e Ciência* **2015**, *13*, 29. [[CrossRef](#)]
- ²⁸ Arruda, D. C.; Miguel, D. C.; Yokoyama-Yasunaka, J. K.; Katzin, A. M.; Uliana, S. R. Inhibitory activity of limonene against *Leishmania* parasites *in vitro* and *in vivo*. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **2009**, *63*, 643. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]