

# CONIC SEMESP

## 17º Congresso Nacional de Iniciação Científica

**TÍTULO:** ESTUDO DO PODER ANTIMICROBIANO DA CASCA DO LIMÃO TIPO SICILIANO FRENTE A BACTÉRIA STAPHYLOCOCCUS AUREUS

**CATEGORIA:** CONCLUÍDO

**ÁREA:** CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E SAÚDE

**SUBÁREA:** CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**INSTITUIÇÃO:** FACULDADE DE TECNOLOGIA TERMOMECÂNICA

**AUTOR(ES):** JULIANA MIYAGUI PIOTTO

**ORIENTADOR(ES):** ILANA RACOWSKI

**COLABORADOR(ES):** MIRELA INÊS DE SAIRRE, VANESSA PROCÓPIO

Realização:

SEMESP 

Apoio:

  
CENTRO UNIVERSITÁRIO ÍTALO BRASILEIRO

## 1. RESUMO

O limão é um fruto produzido durante o ano todo e a grande variedade de limões leva a múltiplas aplicações industriais, tendo esta forte importância econômica no Brasil. Uma das variedades mais conhecidas no Brasil é o limão Siciliano, este, é muito utilizado para a produção de óleos essenciais e são aproveitados em indústrias alimentícias, farmacêuticas e de cosméticos. O objetivo deste trabalho foi estudar a possibilidade do extrato alcoólico da casca do limão Siciliano nas proporções de 0, 5, 10, 15, 20, 25 e 100% exercerem ação antimicrobiana frente ao crescimento da bactéria *Staphylococcus aureus*. Para chegar tal objetivo, os ensaios de inibição microbiana empregaram o método de difusão em Agar utilizando o meio de cultura MH (Mueller Hinton). O extrato alcoólico foi obtido por rotaevaporação de uma solução que manteve, por dois dias, as cascas de limão em contato com álcool 96%. Como resultado foi possível verificar, após 24 horas, que o extrato estudado apresentou poder inibitório sobre a bactéria *Staphylococcus aureus*, obtendo halos de inibição de  $1,2 \pm 0,5$ mm.

## 2. INTRODUÇÃO

O limão é um fruto facilmente encontrado, produzido durante o ano todo e que tem grande importância econômica para o Brasil, pois o Brasil é um dos maiores produtores mundiais (TRUCOM, 2004). Este fruto é rico em ácido cítrico e vitamina C e é muito utilizado nas indústrias alimentícias, de cosméticos e farmacêuticas devido ao óleo essencial presente em sua casca (TRUCOM, 2004; OJEDA DE RODRIGUEZ, G. et al, 1998 apud REDA et. al, 2005).

Conhecido como limão-siciliano, o *Citrus lemon Burm. f.*, pertencente à família Rutaceae, é um dos principais limões consumidos no Brasil. Este, por ter uma casca grossa, tem o seu óleo essencial extraído da mesma e este óleo é utilizado para conferir alterações sensoriais em produtos alimentícios (ALOISI et. al, 2002; CECCARELLI et. al, 2004; SANTOS, 2010). Os seus principais componentes são: limoneno, p-cimeno, terpenenol e citral (KUNICKA-STYCZYN et al., 2009), sendo o primeiro, o principal constituinte dos óleos essenciais de cítrus (ROZZA et. al, 2011).

Em estudos de Caccioni et al. (1998) , foi possível verificar que o limoneno apresenta maior poder inibitório que os outros componentes presentes no óleo essencial, como o p-cimeno, terpenenol e citral a partir da atividade antifúngica. Tamblyn et al. (1993), também verificou que o efeito bactericida dos ácidos presentes nos óleos essenciais é diretamente proporcional ao aumento da sua concentração.

### 3. OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi estudar a possibilidade da casca do limão tipo Siciliano exercer ação antibacteriana frente ao crescimento da *Staphylococcus aureus*.

### 4. METODOLOGIA E DESENVOLVIMENTO

**Amostra:** Casca do limão tipo Siciliano

**Preparo da amostra:** As cascas do limão foram secas em estufa com circulação forçada de ar na temperatura de 30°C por 48h, depois, estas foram trituradas em almofariz, com ajuda de um pistilo até a obtenção de um pó. O pó obtido foi, então, colocado na em contato com uma solução de álcool 96% em uma proporção 1:10 em um frasco de vidro encapado com papel alumínio por 48h. Após este tempo, a solução foi filtrada e o filtrado resultante foi processado em um rotaevaporador. A solução resultante do rotaevaporador foi utilizada para verificar o efeito antimicrobiano.

**Microrganismo de estudo:** O microrganismo de estudo foi a bactéria *Staphylococcus aureus*. Esta bactéria foi adquirida já isolada e selecionada em tubo em ensaio contendo Agar Mueller-Hinton (fabricado pela empresa Merck©). Após crescimento, o tubo de ensaio foi armazenado sob refrigeração (10 °C) na micoteca do Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Tecnologia Termomecanica (FTT).

**Ensaio para verificar o poder antimicrobiano (ensaio de difusão em agar):** A bactéria foi cultivada em agar Mueller-Hinton, em duplicata, para assegurar pureza e

viabilidade da cultura jovem de 24 e 48 horas à 37°C. Para o preparo do inóculo foram selecionadas 5 colônias da bactéria, com aproximadamente 1 mm de diâmetro cada, as quais foram suspensas em 5 mL de NaCl 0,85% estéril e homogeneizadas em agitador de tubos por 15 segundos. A densidade do inóculo foi ajustada com solução salina 0,85% estéril e determinada por espectrofotometria a 520 nm para a obtenção de transmitância equivalente à 95%, obtendo-se uma concentração final entre 1-5x 10<sup>6</sup> células/mL (NCCLS, 1997, DURU et al., 2004).

A análise de inibição foi realizada de acordo com a metodologia de Olivares et al (2006) utilizando o método difusão em ágar com algumas modificações. Para preparar as placas, foram vertidos 15 mL do ágar estéril e sem inoculação em placas de 100 mm e depois da solidificação, adicionou-se 5 mL do ágar-inóculo, sendo que o meio utilizado foi o Agar Mueller-Hinton. Com as duas camadas de meio uniformemente sobrepostas e já solidificadas, foi realizado três furos de 6mm cada sobre estas placas e em cada furo, foi adicionado uma alíquota de 150 µL dos extratos e do óleo em diferentes concentrações (0%, 5%, 10%, 15%, 20, 25% e 100%) (HUSSAIN et al., 2015) e também amostras de água destilada acidificada através da adição de ácido cítrico 0,01M de modo a resultar em um pH igual ao das soluções. Isto foi realizado para verificar se o poder inibitório seria referente à acidez dos extratos ou às substâncias presentes nestes. Assim, depois que as placas foram devidamente inoculadas, estas foram armazenadas em estufa de acordo com a temperatura ótima da bactéria, que é 37°C e observadas em 24h para a realização da medição de halos. A medição do diâmetro dos halos ao redor de cada poço foi realizada com o auxílio de um paquímetro digital, sendo cada halo medido em triplicata e estes foram submetidos à análise de variância Kruskal Wallis e teve suas médias comparadas pelo teste Mann Whitney, ambos com 5% de significância utilizando o software Action Stat.

## 5. RESULTADOS

A tabela 1 demonstra a susceptibilidade da bactéria *S. aureus* às concentrações das soluções da casca do limão Siciliano. Como se nota, além do controle, apenas a concentração de 5% não foi capaz de inibir a bactéria e as concentrações de 20 e 25% não apresentaram diferença significativa entre si.

Tabela 1: Halos (mm) de inibição formados pelas soluções de cascas do limão Siciliano frente à *Staphylococcus aureus*.

Extrato (%)	0	5	10	15	20	25	100
Halo (mm)	0,0 ± 0,0 <sup>e</sup>	0,0 ± 0,00 <sup>e</sup>	1,2 ± 0,5 <sup>d</sup>	2,1 ± 0,7 <sup>c</sup>	3,3 ± 0,4 <sup>b</sup>	3,3 ± 0,8 <sup>b</sup>	6,2 ± 0,3 <sup>a</sup>

\* Valores com letras iguais indicam que não há diferença significativa entre si em 5% de significância.

Pelo fato da bactéria *Staphylococcus aureus* ter um pH ótimo de crescimento na faixa de 5,0 a 7,0 (VIEIRA; FERNANDES, 2012; SANTOS et al, 2007), ela não foi inibida apenas pela composição das cascas dos limões, mas também pelo pH da soluções aquosas resultantes. Foram medidos inicialmente, como mencionado em métodos, o pH de todos os extratos, resultando em todas as amostras um pH igual a 3,0. Para a comprovação que este pH não estava interferindo na ação antimicrobiana frente o microrganismo estudado, foi realizada uma análise onde a amostra (150µL) colocada nos poços das placas era constituído por água acidificada com pH igual a 3,0. Neste experimento a água acidificada mostrou interferência no crescimento da bactéria *S.aureus*, resultando em um halo médio na placa de Petri de 14,8mm). Desta forma, ao realizar todos os experimentos posteriores para este microrganismo, substituindo a amostra de água acidificada pelos extratos (alcoólicos e aquosos), houve o desconto de 14,8mm nos halos resultantes formado nas placas de Petri.

Na literatura, não foram encontrados estudos do Limão Siciliano frente à bactéria estudada, porém, Pires (2007) verificou que os óleos essenciais de limão Rosa e Taiti, a partir do método de hidrodestilação, obtiveram poder de inibição em todas as concentrações estudadas (10, 20, 40, 80 e 160 µL/mL) frente ao microrganismo *Staphylococcus aureus*.

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados evidenciaram que a solução alcoólica da casca do limão Siciliano à partir de uma concentração de 10% foi capaz de inibir in vitro *S. aureus*

## 7. FONTES CONSULTADAS

ALOISI, A.M.; CECCARELLI, I.; MASI, F.; SCARAMUZZINO, A. Effects of the essential oil from Citrus lemon in male and female rats exposed to a persistent painful stimulation. *Behav. Brain Res.*, v.136, p.127-135, 2002.

CACCIONI, D.R.L.; GIZZARDI, M; BIONDI, D.M.; RENDA, A.; RUBERTO, G. - Relationship between volatile components of citrus fruit essential oils and antimicrobial action on *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum*. *International Journal Food Microbiology*, 43: 73-9, 1998.

CECCARELLI, I.; LARIVIERE W.R.; FIORENZANI P. et al. Effects of long-term exposure of lemon essential oil odor on behavioral, hormonal and neuronal parameters in male and female rats. *Brain Res.*, v.1001, p.68-86, 2004.

DURU, M.E., Öztürk, M., Ugur, A. & Özgür, C.. The constituents of essential oil and in vitro antimicrobial activity of *Micromeria cilicica* from Turkey. *Journal of Ethnopharmacology*, 94: 43-48, 2004.

HUSSAIN, Khaja Amjad et al. Antimicrobial effects of citrus sinensis peel extracts against periodontopathic bacteria: an in vitro study. ***Rocz Panstw Zakl Hig***, Jordan, v. 2, n. 66, p.173-178, 2015.

KUNICKA-STYCZYN,A.; SIKORA,M.; KALEMBA. D. Antimicrobial activity of lavender, tea tree and lemon oils in cosmetic preservative systems. *Journal of Applied Microbiology*. n. 107, p. 1903–1911. 2009.

NCCLS (1997). Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests: Approved Standard M2-A7. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, PA, USA.

OLIVARES, M. et al. Antimicrobial potential of four *Lactobacillus* strains isolated from breast milk. *Journal Of Applied Microbiology* Issn 1364-5072, Espanha (granada), v. 101, n. 1, p.72-79, 16 maio 2006. Disponível em:

<<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2672.2006.02981.x/pdf>>. Acesso em: 10 out. 2016.

PIRES, Tamara Cubiaki. Efeito inibitório de óleos essenciais de citros sobre o crescimento de microrganismos. 2007. 50 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Microbiologia Agrícola, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2007. Disponível em: <[http://repositorio.ufla.br/bitstream/1/2842/2/DISSERTAÇÃO\\_Efeito inibitório de óleos essenciais de citros sobre o crescimento de microrganismos.pdf](http://repositorio.ufla.br/bitstream/1/2842/2/DISSERTAÇÃO_Efeito%20inibit%C3%B3rio%20de%20%C3%B3leos%20essenciais%20de%20citros%20sobre%20o%20crescimento%20de%20microrganismos.pdf)>. Acesso em: 07 out. 2016.

REDA, Seme Youssef et al. Caracterização dos óleos das sementes de limão rosa (citrus limonia osbeck) e limão siciliano (citrus limon), UM RESÍDUO AGROINDUSTRIAL. **Ciênc. Technol. Aliment.**, Campinas, v. 4, n. 25, p.672-676, dez. 2005. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/cta/v25n4/27634.pdf>>. Acesso em: 7 set. 2016.

ROZZA, A.L.; MORAES, T.M.; KUSHIMA, H. et al. Gastroprotective mechanisms of Citrus lemon (Rutaceae) essential oil and its majority compounds limonene and  $\beta$ -pinene: Involvement of heat-shock protein-70, vasoactive intestinal peptide, glutathione, sulfhydryl compounds, nitric oxide and prostaglandin E2. *Chem. Biol. Interact.*, v.189, p.82-89, 2011

SANTOS, Juliana Cantalino dos. Avaliação do efeito antimicrobiano de óleos essenciais sobre micro-organismos patogênicos em vôngole (*Anomalocardia brasiliana*). 2010. 83 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2010. Disponível em: <[https://repositorio.ufba.br/ri/bitstream/ri/8801/1/Juliana Cantalino dos Santos.pdf](https://repositorio.ufba.br/ri/bitstream/ri/8801/1/Juliana%20Cantalino%20dos%20Santos.pdf)>. Acesso em: 07 set. 2016

TAMBLYN, K.C.; CONNER, D.E.; BILGILI, S.F.; HALL, G.S. Utilization of the skin attachment model (SAM) to determine the antibacterial activity of potential carcass treatments. *Poult. Sci.*, v.72, p.278, 1993.

TRUCOM, Conceição. O poder da cura do limão. São Paulo – SP: ed. Alaúde, 2004  
Curtis, M. D.; Shiu, K.; Butler, W. M. e Huffmann, J. C. J. Am. Chem. Soc. 1986, 108, 3335.

VIEIRA, Darlene Ana de Paula; FERNANDES, Nayara Cláudia de Assunção Queiroz. Bactérias: Morfologia e Estrutura. In: VIEIRA, Darlene Ana de Paula; FERNANDES, Nayara Cláudia de Assunção Queiroz. **Microbiologia Geral**. Inhaumas: Ifgo; Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria, 2012. p. 37-48. Disponível em: <[http://estudio01.proj.ufsm.br/cadernos/ifgo/tecnico\\_acucar\\_alcool/microbiologia\\_geral.pdf](http://estudio01.proj.ufsm.br/cadernos/ifgo/tecnico_acucar_alcool/microbiologia_geral.pdf)>. Acesso em: 03 out. 2016.