

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO

Maria Gessica Sales da Silva

Atividade antimicrobiana, antioxidante e teor de compostos fenólicos totais de diferentes partes do limão siciliano (*Citrus limon* (L) Burn).

SÃO LUÍS
2017

Maria Gessica Sales da Silva

Atividade antimicrobiana, antioxidante e teor de compostos fenólicos totais de diferentes partes do limão siciliano (*Citrus limon* (L) Burn).

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado à Universidade Federal do Maranhão como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Química Industrial.

Orientadora: Prof^a. Dra. Adenilde Nascimento Mouchrek

SÃO LUÍS
2017

AGRADECIMENTOS

Ao bondoso e amável Deus, por me conceder forças, coragem, a dádiva da vida e a oportunidade de realizar este sonho.

A minha mãe, Celia, por todo amor, dedicação, conselhos, orações, amizade e por nunca desistir de mim e dos sonhos.

Aos meus pais, Toim, Francisco e Vovô João pela sensibilidade, palavras de carinho e motivação nessa caminhada.

Ao meu querido e amável esposo Manoel, por tanto amor, companheirismo, respeito, cumplicidade e incentivo na realização dos sonhos e por acreditar na minha carreira profissional desde o início de nosso relacionamento.

Aos meus sogros, Dona Dadi e Sr. Manoel por me acolherem em suas vidas e me amarem como filha, bem como meu cunhado Léo e sobrinho Pablo por acreditarem.

Aos meus “filhos com patas”, Sholl e Luah (in memoriam) e Dino por me ensinarem na prática sobre o amor incondicional e por amenizar os dias difíceis com sua alegria contagiante. Amo vocês para sempre.

Aos amigos, familiares e colegas que contribuíram em algum momento sejam com palavras, ações, sorrisos, e orações.

A Universidade Federal do Maranhão, todos os funcionários e departamentos pela oportunidade de alcançar a realização do curso, e por me permitirem conhecer pessoas maravilhosas e inesquecíveis que me apoiaram, ajudaram e me aceitaram.

A todas as minhas “delícias” do curso de Química Industrial pela amizade, conselhos, força e carinho, em especial, Elizaura Hyeda, Barbara Ellen, Marisa Chaves, Danilo Braga, Elaine Menezes, Matheus Castro, José Lucas, Larissa Alves, Rubens Matheus e aqueles a qual nomes não foram citados, mas sabem que são fundamentais em minha vida. Amo vocês.

A Residência universitária que foi minha casa nesses últimos anos, proporcionando a chance de ter amigos maravilhosos que alegraram e compartilharam dos planos e experiências da vida; Marcela Rocha, Solange Mendes, Dayana Rodrigues, Matheus Martins, Talita, Adriano, Arthur e a todos que não citei nomes, mas sabem que são essenciais para mim e jamais esquecerei.

A toda família do Pavilhão tecnológico - PCQA, que desde o início me acolheram e me permitiram aprender e crescer como pessoa; Amanda Teles por tudo que me ensinou e por ser um exemplo, professora Adenilde por me receber e estimular o prazer pela busca do conhecimento, Jaqueline e Josi por sempre serem lindas e gentis; a dona Dica, dona Ceíça, Cleude e Zequinha pelos sorrisos contagiantes e carinho, não poderia esquecer Felipe, Prof. Nestor, Prof. Vitor e Prof. Mouchrek por todo apoio e amor que demonstram pelo que fazem.

Ao Laboratório NARP, pelas oportunidades, amizade e aperfeiçoamento.

Aos professores que estimularam, compartilharam amizade, respeito e conhecimento durante toda minha vida escolar e acadêmica.

Ao Grupo FC Oliveira pela oportunidade de realizar o estágio e aprender com os melhores.

A todos que participaram da minha trajetória na busca por essa realização, muito obrigada. Sem vocês não conseguiria.

Maria Gessica Sales da Silva

Atividade antimicrobiana, antioxidante e teor de compostos fenólicos totais de diferentes partes do limão siciliano (*Citrus limon* (L) Burn).

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado à Universidade Federal do Maranhão como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Química Industrial.

Aprovado em: ____ de _____ de _____.

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª. Dr^ª. Adenilde Nascimento Mouchrek – Orientadora
Universidade Federal do Maranhão

Msc. Amanda Mara Teles
Universidade Federal do Maranhão

Prof^ª. Dr^ª. Ana Zelia Silva
Universidade Federal do Maranhão

Géssica Sales da Silva, Maria.

Atividade antimicrobiana, antioxidante e teor de compostos fenólicos totais de diferentes partes do limão siciliano (*Citrus limon* (L) Burn). / Maria Gessica Sales da Silva. - 2017.

17 f.

Orientadora: Adenilde Nascimento Mouchrek.

Monografia (Graduação) - Curso de Química Industrial, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2017.

1. Limão. 2. Atividade antimicrobiana. 3. Capacidade antioxidante. 4. Fenóis totais. I. Nascimento Mouchrek, Adenilde. II. Título.

Maria Gessica Sales da Silva

Atividade antimicrobiana, antioxidante e teor de compostos fenólicos totais de diferentes partes do limão siciliano (*Citrus limon* (L) Burn).

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado à Universidade Federal do Maranhão como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Química Industrial.

Aprovado em: ____ de _____ de _____.

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª. Dr^ª. Adenilde Nascimento Mouchrek – Orientadora
Universidade Federal do Maranhão

Msc. Amanda Mara Teles
Universidade Federal do Maranhão

Prof^ª. Dr^ª. Ana Zelia Silva
Universidade Federal do Maranhão

AGRADECIMENTOS

Ao bondoso e amável Deus, por me conceder forças, coragem, a dádiva da vida e a oportunidade de realizar este sonho.

A minha mãe, Celia, por todo amor, dedicação, conselhos, orações, amizade e por nunca desistir de mim e dos sonhos.

Aos meus pais, Toim, Francisco e Vovô João pela sensibilidade, palavras de carinho e motivação nessa caminhada.

Ao meu querido e amável esposo Manoel, por tanto amor, companheirismo, respeito, cumplicidade e incentivo na realização dos sonhos e por acreditar na minha carreira profissional desde o início de nosso relacionamento.

Aos meus sogros, Dona Dadi e Sr. Manoel por me acolherem em suas vidas e me amarem como filha, bem como meu cunhado Léo e sobrinho Pablo por acreditarem.

Aos meus “filhos com patas”, Sholl e Luah (in memoriam) e Dino por me ensinarem na prática sobre o amor incondicional e por amenizar os dias difíceis com sua alegria contagiante. Amo vocês para sempre.

Aos amigos, familiares e colegas que contribuíram em algum momento sejam com palavras, ações, sorrisos, e orações.

A Universidade Federal do Maranhão, todos os funcionários e departamentos pela oportunidade de alcançar a realização do curso, e por me permitirem conhecer pessoas maravilhosas e inesquecíveis que me apoiaram, ajudaram e me aceitaram.

A todas as minhas “delicias” do curso de Química Industrial pela amizade, conselhos, força e carinho, em especial, Elizaura Hyeda, Barbara Ellen, Marisa Chaves, Danilo Braga, Elaine Menezes, Matheus Castro, José Lucas, Larissa Alves, Rubens Matheus e aqueles a qual nomes não foram citados, mas sabem que são fundamentais em minha vida. Amo vocês.

A Residência universitária que foi minha casa nesses últimos anos, proporcionando a chance de ter amigos maravilhosos que alegraram e compartilharam dos planos e experiências da vida; Marcela Rocha, Solange Mendes, Dayana Rodrigues, Matheus Martins, Talita, Adriano, Arthur e a todos que não citei nomes, mas sabem que são essenciais para mim e jamais esquecerei.

A toda família do Pavilhão tecnológico - PCQA, que desde o início me acolheram e me permitiram aprender e crescer como pessoa; Amanda Teles por tudo que me ensinou e por ser um exemplo, professora Adenilde por me receber e estimular o prazer pela busca do conhecimento, Jaqueline e Josi por sempre serem lindas e gentis; a dona Dica, dona Ceíça, Cleude e Zequinha pelos sorrisos contagiantes e carinho, não poderia esquecer Felipe, Prof. Nestor, Prof. Vitor e Prof. Mouchrek por todo apoio e amor que demonstram pelo que fazem.

Ao Laboratório NARP, pelas oportunidades, amizade e aperfeiçoamento.

Aos professores que estimularam, compartilharam amizade, respeito e conhecimento durante toda minha vida escolar e acadêmica.

Ao Grupo FC Oliveira pela oportunidade de realizar o estágio e aprender com os melhores.

A todos que participaram da minha trajetória na busca por essa realização, muito obrigada. Sem vocês não conseguiria.

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA, ANTIOXIDANTE E TEOR DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS DE DIFERENTES PARTES DO LIMÃO SICILIANO (*CITRUS LIMON* (L.) BURN).

Maria Gessica Sales da Silva *

O limão siciliano, *Citrus limon* (L.) Burn é uma importante planta medicinal da família Rutaceae, com origem proveniente da região sudeste da Ásia, dispõe de inúmeros benefícios e vasta aplicação de suas propriedades, seja na cultura popular ou nos mais diversos estudos científicos. Diante disto, o presente trabalho teve como objetivos, analisar diferentes partes de *Citrus limon* (L.) Burn obtidos a partir do extrato de suas folhas secas, macerado de cascas e suco puro, determinar seus efeitos inibitórios sobre as bactérias patogênicas *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* pelas técnicas de difusão em disco e diluição em caldo, avaliar sua capacidade antioxidante pelo método ABTS e seus teores de compostos fenólicos totais. Os resultados demonstraram que o suco puro de *Citrus limon* (L.) Burn apresentou atividade inibitória satisfatória sobre *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* quando comparado aos efeitos do macerado de cascas e extrato das folhas. Todas as partes de *Citrus limon* (L.) Burn evidenciaram capacidade antioxidante forte por apresentar um percentual de inibição na faixa de 91,62% a 99,72% e teores de fenólicos totais entre 116,76 mg e 420,20 mg de EAT.g⁻¹), confirmando que o limão siciliano é um bom agente antimicrobiano e possui elevado potencial antioxidante.

PALAVRAS-CHAVE: *CITRUS LIMON* (L.) BURN, ATIVIDADE ANTIMICROBIANA, ANTIOXIDANTE, FENÓLICOS TOTAIS.

* Graduada em Química Industrial, Universidade Federal do Maranhão (UFMA), São Luís, MA (e-mail: gjessica10@hotmail.com).

1. INTRODUÇÃO

Em diversas partes do planeta o uso de plantas medicinais ainda é um método alternativo de tratamento e “cura” de doenças, sendo considerado por muitos como de custo mais baixo e fácil acessibilidade quando comparado a alguns medicamentos industrializados. (BADKE et al., 2012)

O território brasileiro apresenta ampla diversidade na flora, com vegetações de diferentes características e muitos princípios ativos ainda desconhecidos. E com o processo evolutivo da ciência, muitas ferramentas tem permitido avaliar os benefícios, riscos e conhecimento científico embasado no uso popular de certas plantas. (CALIXTO, 2003)

Um dos grandes interesses nos estudos envolvendo derivados de produtos naturais é a busca por novas substâncias que atendam os critérios de inibição antimicrobiana de certos micro-organismos super-resistentes (ROZZATO, 2012), tendo em vista que a presença de bactérias como *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* nos alimentos é uma das principais razões de sua deterioração e contaminação, o que acarreta em potenciais riscos à saúde pública. (CARVALHO e CORTEZ, 2005).

A busca por plantas com potenciais antioxidantes também é crescente por dispor de efeitos benéficos e ampla aplicação (DEL RÉ e JORGE, 2012). Dentre os antioxidantes naturais, destacam-se os compostos fenólicos, tais como flavonoides, ácido ascórbico, ácidos fenólicos, antocianinas, taninos hidrolisáveis (SHIMANO, 2012). No corpo humano os compostos fenólicos tem como função a captura dos radicais livres impedindo certas moléculas de ficarem soltas no organismo danificando as células e causando doenças. Nos alimentos, são capazes de prevenir ou retardar grandemente a oxidação de materiais facilmente oxidáveis, aumentando o tempo de vida útil. (SHIMANO, 2012).

O limão siciliano, *Citrus limon* (L.) Burn é uma importante planta medicinal da família Rutaceaea, tem sua origem proveniente da região sudeste da Ásia (LORENTE ET AL., 2014), possui cor amarela em seu estagio de maturação, casca grossa, superfície levemente rugosa e uma protuberância característica (SANTOS, 2016), possui atividade anticancerígena, potencial antibacteriano (KUMARI, 2014), presença de compostos fenólicos e antioxidantes naturais (HAJIMAHMOODI ET AL., 2014)

Todas as partes do limão *Citrus limon* (L.) Burn são utilizáveis; seja na culinária, medicina alternativa, indústria farmacêutica e alimentícia. Da casca, retira-se uma essência aromática usada em perfumaria e no preparo de licores e sabões (MATOS, 2007), suas folhas são tradicionalmente usadas na cultura popular no preparo de chás e águas de banhos; do suco dos frutos obtém-se bebidas refrescantes, molhos com sabor acentuado, dentre outros. No nordeste brasileiro, especialmente na zona rural, utiliza-se muito o sumo do limão na limpeza de carnes e preparo de saladas.

Diante dos inúmeros benefícios que o limão siciliano dispõe, o presente trabalho tem como objetivos, analisar diferentes partes de *Citrus limon* (L.) Burn obtidos a partir do extrato de suas folhas secas, macerado de cascas e suco puro, determinar sua atividade antimicrobiana por meio das técnicas de difusão em ágar e diluição em caldos sobre as bactérias patogênicas *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, avaliar sua capacidade antioxidante pelo método ABTS (2, 2-azinobis-3-etil-benzotiazolína-6-ácido sulfônico), e seus teores de compostos fenólicos totais.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MATERIAL BOTÂNICO

As folhas e frutos de limão siciliano *Citrus limon* (L.) Burn foram coletados no mês de Junho de 2017, no povoado Limoeiro, com coordenadas 4° 21'12.1"S e 44° 03'45.1"W a 37,9 km na zona rural da cidade de Codó – MA. As folhas foram mantidas à temperatura ambiente, sem exposição à luz solar e em local seco para que ocorresse o processo de desidratação; os frutos foram armazenados a temperatura ambiente para realização do estudo. O material vegetal foi identificado pela professora Dr^a Ana Zelia Silva e uma amostra encontra-se depositada no Herbário Ático Seabra (UFMA) sob registro de n° 1463.

2.2 EXTRATO DAS FOLHAS SECAS

Para obtenção do extrato a partir das folhas secas do limão, após passar pelo processo de pulverização no moinho elétrico e pesagem da massa (200 g), utilizou-se o volume de 800 ml de álcool etílico hidratado 92,8 INPM (96°Gl) como solvente, conservando o mesmo em frasco âmbar e ao abrigo da luz por um período de 11 dias, obtendo um volume de filtrado correspondente a 390 ml. Posteriormente, recolheu-se 355 ml do extrato o qual foram submetidos à rota evaporador para evaporação do etanol. Após secagem completa obteve-se uma massa equivalente a 4,7g. Retirou-se 3g da massa para preparo da solução mãe; por fim o extrato foi depositado em um balão volumétrico de 50 ml e aferiu-se com água destilada até completar o volume correspondente obtendo uma concentração de 60.000 µg/mL.

2.3 MACERADOS DE CASCAS

Os frutos foram selecionados quanto à aparência, estágio de maturação e ausência de danos físicos, foram submetidos ao processo de sanitização com água devidamente tratada e solução de cloro livre.

Em seguida iniciou-se o processo de raspagem do pericarpo (cascas), obtendo uma massa equivalente a 62,98g. Este foi macerado com auxílio de almofariz e pistilo, obtendo 10 ml de filtrado.

2.4 SUCO PURO

O sumo do limão foi obtido espremendo o endocarpo dos frutos manualmente, reservando em frasco âmbar ao abrigo de luz para uso imediato nas análises.

2.5 MICRO-ORGANISMOS TESTADOS

Foram utilizadas duas cepas microbianas provenientes da “*American Type Culture Collection*” (ATCC) doadas pelo Laboratório de Microbiologia do Controle de Qualidade de Alimentos e Água da Universidade Federal do Maranhão (PCQA-UFMA), *Escherichia coli* (ATCC 25922), e *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923). A identificação das cepas foi confirmada pelo uso de ensaios bioquímicos, seguindo as recomendações do manual de microbiologia clínica (MURRAY, 2003).

2.6 PADRONIZAÇÃO DO INÓCULO

As cepas microbianas utilizadas foram repicadas em caldo de infusão de cérebro e coração (BHI) e incubadas a 35°C até atingirem fase exponencial de crescimento (4-6h). Após esse período, as culturas tiveram sua densidade celular ajustada em solução salina 0,85% estéril, de modo a se obter uma suspensão microbiana com a turbidez comparável à da solução padrão de McFarland 0,5 ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL) de acordo com as normas do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2003).

2.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA PELO MÉTODO DE DIFUSÃO EM DISCO

Primeiro foram preparadas as placas com o meio de cultura Ágar Mueller Hinton (AMH), após sua solidificação a suspensão microbiana foi distribuída na superfície do ágar e deixada em repouso à temperatura ambiente por 30 min. Logo após são preparados os discos contendo 50 µL do extrato de folhas, macerado de cascas e suco puro de *Citrus limon* (L.) Burn. Utilizando-se pinça esterilizada, os discos foram distribuídos sobre a superfície do ágar. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 35°C por 24 horas. Os diâmetros dos halos de inibição foram mensurados, incluindo o diâmetro do disco (6 mm). Esses ensaios foram feitos em triplicata (CLSI, 2003).

2.8 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA PELO MÉTODO DA DILUIÇÃO EM CALDO

A atividade antimicrobiana foi realizada segundo a metodologia da diluição em caldo proposta pela National Committee for Clinical Laboratory Standart (NCCLS, 2003). Inicialmente uma alíquota das amostras (extrato, suco e macerados de cascas de *Citrus limon* (L.) Burn) foram diluídas em água e transferidas para tubos de ensaio contendo caldo BHI (controle negativo), em outro tubo colocou-se caldo mais a bactéria a ser testada (controle positivo). A suspensão microbiana contendo $1,5 \times 10^8$ UFC/mL das cepas de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* (50µL) foi adicionada às amostras. Foram reservados tubos para controle de esterilidade do caldo. Logo após, os tubos foram incubados a 35°C por 24 horas. Após o período de incubação, foi verificada a atividade antimicrobiana, sendo definida como a menor concentração que visivelmente inibiu o crescimento bacteriano (ausência de turvação visível).

Para confirmar a ausência de crescimento foi realizado o plaqueamento das partes de *Citrus limon* (L.) Burn testados com ausência de turvação visível, realizada pelo método de Pour-Plate (BARON et al, 1994). Essa técnica consiste na semeadura de inóculo microbiano na superfície de ágar Plate-Count.

De forma asséptica, (50µL) do inóculo obtido dos tubos que não apresentarem turvação visível usados na macrodiluição, foi espalhado em toda a superfície do meio com o auxílio da alça de Drigauski, os ensaios foram realizados em triplicata. Após incubação a 35°C durante 24h, foi feita a contagem das colônias crescidas na superfície do ágar.

2.9 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO ABTS

A determinação da atividade antioxidante pelo método ABTS [2,2-azinobis-

(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)], foi realizada conforme a metodologia sugerida por RE et al. (1999), com modificações. O radical ABTS• foi preparado pela reação de 5,0 ml de uma solução 3.840 µg/mL de ABTS com 88 µL da solução de persulfato de potássio 37.840 µg/mL, a mistura foi deixada em ambiente escuro, por 16 horas. Após a formação do radical esta foi diluída em etanol (1: 30 v/v aproximadamente) até se obter uma absorbância de 0,7 a 734 nm.

A partir da diluição da solução mãe, obteve-se uma nova concentração de 2000 µg.mL⁻¹ do extrato de folhas secas de *Citrus limon* (L.) Burn, preparou-se diluições seriadas obtendo-se concentrações de 25 a 175 µg.mL⁻¹. Para o macerado de cascas e suco puro, o procedimento foi realizado em triplicata, porém sem diluições.

Em ambiente escuro foi transferida uma alíquota de cada concentração das amostras em tubos de ensaio contendo 3,0 ml do cátion radical ABTS, homogeneizou-se em agitador de tubos e após 6 minutos realizou-se a leitura da absorbância em espectrofotômetro UV/VIS em comprimento 734 nm.

As análises foram realizadas em triplicata e a captura do radical livre foi expressa em porcentagem de inibição (%) do cátion radical ABTS (BABILI et al., 2011) de acordo com a equação:

$$\% \text{ de Inibição} = \frac{(\text{Abs. solução do radical ABTS} - \text{Abs. da amostra}) \times 100}{\text{Absorbância da solução do radical ABTS}}$$

2.10 TEOR DE FENOLICOS TOTAIS

A determinação espectrofotométrica dos compostos fenólicos foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Waterhouse (2012), utilizando-se o reagente de Folin-Ciocalteu. A curva de calibração foi obtida fazendo-se uso de seis diluições de ácido tânico (10-120 µg/L). As mensurações das absorbâncias das amostras em função da concentração foram feitas em espectrofotômetro UV/VIS Quimis a 760 nm, em triplicata.

A equação da curva de calibração obtida através de regressão linear está mostrada abaixo:

$$y = 0,0069x + 0,0062, R^2 = 0,9999$$

Onde Y representa à absorbância medida e X a concentração de equivalentes de ácido tânico. Os resultados foram expressos como mg de equivalente de ácido tânico (EAT) por grama de amostra.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

De acordo com os resultados obtidos pelo método de difusão em discos e pela técnica de diluição em caldos observaram-se diferentes comportamentos frente os patógenos testados, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*.

O suco puro do limão demonstrou formação de halo de inibição (tabela 1), confirmando assim, a atividade antimicrobiana sobre as bactérias e mostrando-se mais eficaz na obtenção de resultados diante da técnica quando comparado à

atividade antimicrobiana do extrato de folhas secas e macerado das cascas.

TABELA 1: Halos de inibição médios (mm) formados pelo uso do extrato de folhas (EXF), macerado de cascas (MC) e suco puro (SP) de *Citrus limon* (L.) Burn.

Bactérias	EXF.	MC	SP
<i>E. coli</i>	6,00 ± 0,82	6, 00 ± 1,41	10,00 ± 0,00
<i>S. aureus</i>	7,00 ± 0,82	0*	22,00 ± 2,45

Os resultados são a média das triplicatas e ± corresponde ao desvio padrão (DP).

* Não formação de halo

O extrato das folhas secas com concentração de 60.000µl e macerado das cascas de *Citrus limon* (L.) Burn apresentaram halos bacteriostáticos indicando a capacidade de inibir a multiplicação de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. (tabela 2).

TABELA 2: Referente aos halos bacteriostáticos médios (mm) formados pelo uso do extrato de folhas (EXF), macerado de cascas (MC) e suco puro (SP) de *Citrus limon* (L.) Burn frente aos patógenos testados.

Bactérias	EXF.	MC	SP
<i>E. coli</i>	15,67 ± 2,62	20 ± 0,82	19,6 ± 0,94
<i>S. aureus</i>	11 ± 0,82	0*	0*

Os resultados são a média das triplicatas e ± corresponde ao desvio padrão (DP).

* Não formação de halo.

Para interpretação dos resultados obtidos pela técnica de diluição em caldos consideraram-se os seguintes critérios:

. Ausência de crescimento do micro-organismo no meio de cultura ou detecção de crescimento até 20 UFC, igual à ação bactericida.

. Crescimento do micro-organismo no meio de cultura acima de 20 UFC, igual à ação bacteriostática.

. O surgimento de colônias em uma dada concentração acima de 20 UFC indica que a mesma não conseguiu inibir ou eliminar 99.9% ou mais do inóculo utilizado.

Com base nestes critérios, o suco puro de *Citrus limon* (L.) Burn mostrou-se o mais efetivo quanto sua ação bactericida sobre *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, sendo confirmado pelo não aparecimento de turvação nos frascos testes e o não crescimento de unidades formadoras de colônias (UFC) no meio de cultura. O extrato das folhas secas na concentração de 60.000 µg/mL apresentou cerca de 20 UFC, enquanto o crescimento de unidades formadoras de colônia (UFC) para no macerado de cascas foi bem menor. Desta forma, pode-se afirmar que todas as partes de *Citrus limon* (L.) Burn analisadas neste estudo comprovaram eficácia quanto à atividade bactericida sobre os patógenos testados.

Segundo informações apresentadas por Cavalcante et al. (2012) no tocante a

triagem da atividade antimicrobiana, estes estabelecem que halos de inibição com crescimentos superiores a 8 mm ou 10 mm são indicativo da presença de atividade inibitória.

De acordo com este parâmetro, o suco puro de *Citrus limon* (L.) Burn apresentou atividade inibitória satisfatória sobre *Staphylococcus aureus* (22 mm) e *Escherichia coli* (10 mm). Em contra partida o extrato das folhas e macerado de cascas apresentaram halos de inibição inferiores a 8 mm, indicando portanto a resistência dos micro-organismos

Resultados com valores aproximados a este trabalho, foram apresentados por Oikeh et al. (2016), ao avaliar a ação antimicrobiana de diferentes concentrados de sucos cítricos onde observaram que o suco de *Citrus limon* (L.) Burn na concentração de 200 µg/ mL apresentava halos de inibição para *S. aureus* (20 mm) e *E. coli* (12 mm). Hindi (2013) avaliou a atividade antimicrobiana de diferentes tipos e partes de limão frente diferentes bactérias e constatou que o suco de *Citrus limon* (L.) Burn tem atividade antimicrobiana maior que os outros tipos de extratos com halos inibição de (26 mm) *S. aureus* e (10 mm) *E. coli*.

Já Araújo et al. (2007) ao realizarem o estudo antimicrobiano de sucos de frutas e hortaliças constataram que o suco *Citrus limon* (L) Burm demonstrou maior atividade em relação aos demais sumos utilizados, apresentando halos que variaram de 17,333 ($\pm 0,5774$) a 35,333 ($\pm 0,5774$) sobre os grupos Gram positivos entre eles *Staphylococcus aureus*, porém não houve formação de halo para bactérias Gram negativas como *Escherichia Coli*.

A alta eficiência antimicrobiana de *Citrus limon* (L) Burm segundo a literatura ocorre pelo fato do suco ser rico em ácido cítrico, com valores entre 5 a 7%, dependendo da variedade, este ácido é muito utilizado na indústria alimentícia, pois além de antimicrobiano, apresenta propriedades antioxidantes, acidulantes, flavorizantes, sequestrantes e reguladoras de acidez.

A espécie de *S. aureus* utilizada neste trabalho foi mais sensível ao suco puro de *Citrus limon* (L) Burm, pois o ácido cítrico presente no suco atua diretamente na ruptura das membranas dos patógenos, confirmando que bactérias Gram-positivas são mais sensíveis aos produtos naturais que as Gram-negativas, assim como no trabalho de Martinez (2014) onde o mesmo conclui que o ácido cítrico presente no sumo do limão reduz a carga microbiana em especial sobre *Staphylococcus aureus* e permite manter as propriedades organolépticas dos produtos hortícolas.

Santos (2016) comparando o efeito da temperatura de secagem das cascas de limão siciliano *Citrus limon* (L) Burm notou que maioria dos micro-organismos não obteve diferenças significativas em relação aos extratos analisados, os halos de inibição ficaram com uma média em torno de 7,8 mm sobre *S. aureus* e 7,5 mm para *E. coli*, o que segundo a classificação de Cavalcante et al. (2012) halos menores que 8 mm indicam resistência do micro-organismo. Os resultados são próximos aos encontrados neste estudo.

Otang (2016) afirmou a eficácia do uso de extratos das cascas e *Citrus limon* (L.) Burn na atuação antimicrobiana e antioxidante sobre uma variedade de patógenos que estão relacionados diretamente às doenças na pele, em sua pesquisa as bactérias *S. aureus* e *E. coli*, foram fracamente inibidas pelos extratos, entretanto a maioria das bactérias testadas foram suscetíveis ao uso dos mesmos, reafirmando o alto valor medicinal e antimicrobiano de *C. limon* sendo também uma fonte potencial para o desenvolvimento de fármacos.

Ao verificar a Atividade antibacteriana *in vitro* de produtos naturais sobre *Lactobacillus casei*, Castro et al, (2010) observaram a não formação de halos de inibição de crescimento bacteriano para o extrato hidroalcoólico do *Citrus limon* (L.)

Burn, Fuzetto et al, (2013) explica que extratos de plantas necessitam de 100% de sua concentração para apresentar resultados apreciáveis.

O extrato das folhas secas de *Citrus limon* (L.) Burn com concentração de 60.000 µg/mL não apresentou atividade inibitória sobre os patógenos testados, em contra partida mostrou formação de halos bacteriostáticos significativos frente a *E. Coli* (15,67mm) e *S. aureus* (11 mm) demonstrando que nesta concentração o mesmo não mata ou inibe certas bactérias, mas detêm seu crescimento, dificultando sua proliferação o que vem a ser de grande importância no conhecimento científico.

O macerado das cascas de *Citrus limon* (L.) Burn também apresentou formação de halo bacteriostático com (20 mm) sobre *Escherichia Coli*, resultado consideravelmente maior que a atividade do extrato das folhas sobre o patógeno.

Alguns autores sugerem que na interpretação dos resultados deve-se levar em consideração que a atividade antibacteriana de um óleo essencial, suco ou extrato pode sofrer variação de acordo com a composição química, influencia da região onde a planta é cultivada, solo, prática cultural, estágio de maturidade (LORENTE, 2014) condições de coleta, armazenamento, secagem, condições de extração (DE MORAIS, 2009), estrutura de seus constituintes variações do método aplicado e parte da planta que foi usada.

3.2 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO ABTS E TEOR DE FENÓLICOS TOTAIS

Os dados expressos na tabela 3 mostram a avaliação antioxidante que foi expressa como a capacidade de sequestrar/reduzir radicais ABTS em porcentagem de inibição (%I) e a quantificação do teor de fenólicos totais feita pela metodologia Folin-Ciocalteu nas partes analisadas de *Citrus limon* (L): suco puro (SP), extrato de folhas (EXF), macerado de cascas verdes (MC).

TABELA 3: Percentual de inibição e teor de fenólicos totais do macerado de cascas verdes (MC) suco puro (SP), extrato de folhas (EXF) de *Citrus limon* (L) Burn.

Amostra	%I	Fenólicos Totais (mg EAT.g ⁻¹)
MC	99,72 ± 0,00	430,20 ± 0,00
SP	97,50 ± 0,01	289,63 ± 0,01
EXF	91,62 ± 0,00	116,76 ± 0,01

Os resultados são a média das triplicatas e ± corresponde ao desvio padrão (DP).

Melo et al. (2008), definem que a capacidade antioxidante pode ser considerada forte, intermediária ou fraca, quando o percentual de sequestro do radical atinge nessa ordem, valores acima de 70%, entre 50 e 70% e abaixo de 50%.

De acordo com estes autores e os dados da tabela 3, o macerado das cascas, suco puro e extrato das folhas secas de *Citrus limon* (L) Burn possuem capacidade antioxidante forte por apresentar um percentual de inibição equivalente

a 99,72%, 97,50% e 91,62% respectivamente. Observa-se ainda que em um comparativo das partes trabalhadas, o macerado das cascas verdes de *Citrus limon* (L) Burn demonstrou o maior percentual de captura dos radicais ABST e um elevado teor de fenóis totais.

Alguns trabalhos relatam que as cascas dos *Citrus* apresentam compostos bioativos em comparação a polpa e suco (GOULAS & MANGANARIS, 2012), e que a liberação destes compostos pode resultar em atividades antioxidantes maiores dependendo do tipo de tratamento empregado, como no trabalho de Papoutsis et al (2016) onde a aplicação do pré tratamento de micro-ondas afetou de forma significativa no aumento dos níveis de compostos fenólicos totais, TF, proantocianidinas, compostos bioativos individuais, bem como a atividade antioxidante do bagaço de limão, mas considerando que durante esse processo as medidas de tempo e temperatura devem ser criteriosa, para não ocasionar perda dos compostos e conseqüentemente diminuição da atividade antioxidante.

Xi et al. (2017) realizaram a caracterização da composição fenólica e a capacidade antioxidante de diferentes partes de *Citrus Limon* (L) Burn, incluindo cascas, polpas e suco, seus resultados confirmaram que as cascas apresentavam o conteúdo fenólico total mais elevado e conseqüentemente maior capacidade antioxidante, seguido de frutas e sementes inteiras, enquanto os menores valores foram encontrados no suco.

Kumari (2014) avaliou o comportamento antioxidante de sucos de *Citrus limon* (L) Burn pelo ensaio de eliminação de radicais livres DPPH e constatou que os sucos obtidos dos frutos verdes apresentavam melhor atividade antioxidante (94.58 ± 1) que o suco de frutos maduros (92.71 ± 0.521) e que a maior atividade antioxidante é encontrada usando-se 100% da concentração. Kumari (2013) justifica que a menor atividade antioxidante de sucos de frutas maduras pode ser devido a redução de ácido ascórbico e fenólicos totais durante o processo de maturação.

Com relação às folhas de *Citrus limon* (L) Burn a literatura não reportou referências concretas sobre a quantificação do teor de fenóis totais e atividade antioxidante presente nos extrato hidroalcoólico., mas pela análise dos resultados e pela classificação de Melo et al. (2008), o extrato hidroalcoólico das folhas secas na concentração de 2.000 µg/mL de *Citrus limon* (L) Burn apresenta-se como um forte antioxidante.

Um fator interessante a se aplicar aos estudos relacionados às propriedades de uma planta, ou partes dela no tocante a presença de maior ou menor atividade antioxidante, seria fazer uma abordagem quanto ao emprego de outros métodos, isolando e quantificando o maior número de compostos bioativos que a planta possui e avaliando o comportamento destes diante do emprego de diferentes solventes. Outro ponto importante na relação da capacidade antioxidante com a presença de compostos fenólicos é que não basta apenas determinar o teor de fenólicos totais nas amostras, o ideal nestes casos seria uma identificação individual de seus componentes, pois cada constituinte isolado apresenta uma estrutura característica de suas funções, logo uma capacidade antioxidante diferenciada.

4 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos nesta pesquisa, conclui-se que diferentes partes do limão siciliano *Citrus limon* (L) Burn, demonstram atividade antimicrobiana, antioxidante e elevado teor de fenóis totais, reforçando as informações advindas da medicina popular tradicional e aquelas obtidas nos ensaios in vitro sobre as propriedades do limão e seus múltiplos benefícios, servindo como

referência para novas pesquisas envolvendo seu uso nas indústrias alimentícias, química ou farmacêutica.

ABSTRACT

ANTIMICROBIAL ACTIVITY, ANTIOXIDANT AND CONTENT OF TOTAL PHENOLIC COMPOUNDS OF DIFFERENT PARTS OF SICILIAN LEMON (CITRUS LIMON (L) BURN).

Citrus limon (L.) Burn is an important medicinal plant of the family Rutaceae, originating from the southeast region of Asia, has numerous benefits and vast application of its properties, whether in popular culture or in the most diverse scientific studies. The objective of the present work was to analyze different parts of Citrus limon (L.) Burn obtained from the extract of its dry leaves, macerated with bark and pure juice, to determine its inhibitory effects on the pathogenic bacteria *Escherichia coli* and *Staphylococcus Aureus* by disc diffusion and broth dilution techniques, to evaluate its antioxidant capacity by the ABTS method and its total phenolic compounds contents. The results showed that the pure juice of Citrus limon (L.) Burn showed satisfactory inhibitory activity on *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* when compared to the effects of maceration of bark and leaf extract. All parts of Citrus limon (L) Burn showed strong antioxidant capacity because they presented a percentage of inhibition in the range of 91.62% to 99.72% and total phenolic contents between 116.76 mg and 420.20 mg EAT. G-1) confirming that sicilian lemon is a good antimicrobial agent and has a high antioxidant potential.

KEYWORDS: CITRUS LIMON (L) BURN, ANTIMICROBIAL ACTIVITY, ANTIOXIDANT, TOTAL PHENOIS.

REFERÊNCIAS

ARAÚJO, P. R. L.; ALMEIDA, F. R.; SENA, K. X. F. R.; CHIAPPETA, A. A.; ALBUQUERQUE, J. F. C. Estudo antimicrobiano de sucos de frutas e hortaliças frente a isolados clínicos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE QUÍMICA, 47., 2007.

BADKE, Marcio Rossato; BUDÓ, Maria de Lourdes Denardin; ALVIM, Neide Aparecida Titonelli; ZANETTI, Gilberto Dolejal; HEISLER, Elisa Vanessa. **Saberes e práticas populares de cuidado em saúde com o uso de plantas medicinais.** Texto Contexto Enferm, Florianópolis, 2012 Abr-Jun; 21(2): 363-70. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/tce/v21n2/a14v21n2.pdf>>. Acesso em: 17/07/2014

BOROWSKI, V. G R. **Avaliação da atividade antibiofilme de *Capsicum baccatum* var. *pendulum* (Solanaceae).** Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BR-RS, 2015.

CALIXTO, João B. **Biodiversidade como fonte de medicamentos.** *Cienc. Cult.* [online]. 2003, vol.55, n.3, pp. 37-39. ISSN 2317-6660. Disponível em: <<http://cienciaecultura.bvs.br/pdf/cic/v55n3/a22v55n3.pdf>>. Acesso em: 17/07/2014
CARVALHO, A. C. de F. B. De;; CORTEZ, A. L. L. *Salmonella spp.* em carcaças,

carne mecanicamente separada, linguças e cortes comerciais de frango. **Ciência Rural**, v. 35, n. 6, p. 1465-1468, 2005

CARVALHO, I.T. Microbiologia dos alimentos. Programa escola técnica aberta do Brasil (ETEC-Brasil) Recife: EDUFRPE, 2010.

CASTANHEIRA, B.A.M.G. **Mecanismos de resistência a antibióticos**. Monografia (Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Lusófona de Humanidades Tecnológicas, Lisboa, 2013.

CASTRO, Ricardo Dias de et al. Atividade antibacteriana in vitro de produtos naturais sobre *Lactobacillus casei*. **IJD. International Journal of Dentistry**, v. 9, n. 2, p. 74-77, 2010.

CAVALCANTI, Yuri Wanderley et al. Atividade antifúngica de extratos vegetais brasileiros sobre cepas de *Candida*. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, v. 16, n. 1, p. 43-48, 2012.

DE MORAIS, L.A.S. 2009. Influência dos fatores abióticos na composição química dos óleos essenciais. **Horticultura Brasileira**. V. 27, n. 2: S4050- S4063, agosto 2009.

DEL RÉ, P. V.; JORGE, N. Especiarias como antioxidantes naturais: aplicações em alimentos e implicação na saúde. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, p. 389-399, 2012.

DI STASI, L.C. **Plantas medicinais: arte e ciência. Um guia de estudo interdisciplinar**. São Paulo: UNESP, 1996. 231p.

GOULAS, Vlassios; MANGANARIS, G. A. Exploring the phytochemical content and the antioxidant potential of Citrus fruits grown in Cyprus. **Food Chemistry**, v. 131, n. 1, p. 39-47, 2012.

HAJIMAHMOODI, Mannan et al. Total Antioxidant Activity, and Hesperidin, Diosmin, Eriocitrin and Quercetin Contents of Various Lemon Juices. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 13, n. 6, p. 951-956, 2014.

HINDI, Nada Khazal Kadhim; CHABUCK, Zainab Adil Ghani. Antimicrobial activity of different aqueous lemon extracts. 2013.

KUMARI, Sony; SARMAH, Neelanjana; HANDIQUE, A. K. Antioxidant and Antimicrobial Potential of Ripen and Unripe Juice of Citrus limon. **Int. J. Pharm. Sci. Invent**, v. 3, p. 18-20, 2014.

KUMARI, Sony; SARMAH, Neelanjana; HANDIQUE, A. K. Antioxidant activities of the unripen and ripen Citrus aurantifolia of Assam. **International Journal of Innovative Research in Science, Engineering and Technology**, Vol. 2, Issue 9, September 2013

LORENTE, José et al. Chemical guide parameters for Spanish lemon (*Citrus limon* (L.) Burm.) juices. **Food chemistry**, v. 162, p. 186-191, 2014.

MARTINEZ, Karen M.; LAMK, Lizeth O.; ALVAREZ, Andrea C. Efecto antimicrobiano del vinagre blanco y del limón criollo sobre staphylococcus aureus en ensaladas de restaurantes del programa de alimentación escolar (pae) de san jose de cucuta. @ **limentech, Ciencia y Tecnología Alimentaria**, v. 12, n. 1, 2014.

MATOS, E.H.S.F. **Cultivo do limão**. Centro de Apoio ao Desenvolvimento Tecnológico da Universidade de Brasília – CDT/UnB. 2007

MURRAY, P. R. BARON, E. J., PFALLER, M. A., TENOVER, F. C. YOLKEN, R. H. M. **Manual of Clinical Microbiology**, 8^a ed. American Society for Microbiology: Washington, 2003.

OIKEH, Ehigbai I. et al. Phytochemical, antimicrobial, and antioxidant activities of different citrus juice concentrates. **Food science & nutrition**, v. 4, n. 1, p. 103-109, 2016.

OTANG, W. M.; AFOLAYAN, A. J. Antimicrobial and antioxidant efficacy of Citrus limon L. peel extracts used for skin diseases by Xhosa tribe of Amathole District, Eastern Cape, South Africa. **South African Journal of Botany**, v. 102, p. 46-49, 2016.

PAPOUTSIS, Konstantinos et al. Enhancement of the total phenolic compounds and antioxidant activity of aqueous Citrus limon L. pomace extract using microwave pretreatment on the dry powder. **Journal of Food Processing and Preservation**, 2016.

PEREIRA, A. Benefícios e curiosidades do limão. Cozinha FIT & FAT. 2017 Disponível em: < <http://cozinhafitefat.com.br/index.php/2017/03/28/beneficios-e-curiosidades-do-limao-por-aline-pereira/>> acesso em: 10/06/2017

RAUF, Abdur; UDDIN, Ghias; ALI, Jawad. Phytochemical analysis and radical scavenging profile of juices of Citrus sinensis, Citrus anrantifolia, and Citrus limonum. **Organic and medicinal chemistry letters**, v. 4, n. 1, p. 5, 2014.

ROZATTO, Mariana Rodrigues. **Determinação da atividade antimicrobiana in vitro de extratos, frações e compostos isolados de *arrabidaea brachypoda***. Araraquara – SP 2012. Disponível em: < <http://www2.fcfar.unesp.br/Home/Pos-graduacao/CienciasFarmaceuticas/MARIANA%20RODRIGUES%20ROZATTO.pdf> > Acesso: 18/06/2017

SANTOS, André Luis dos et al. Staphylococcus aureus: visiting a strain of clinical importance. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 43, n. 6, p. 413-423, 2007.

SANTOS, T. R. J. ; SANTANA, L. C. L. A. Teor de carotenoides totais e potencial antimicrobiano de cascas de limão siciliano (citrus limon l. Burm.) submetidas a diferentes temperaturas de secagem. In: xxv congresso brasileiro de ciência e tecnologia de alimentos e x cigr section vi international technical symposium, 2016, gramado-rs. Xxv congresso brasileiro de ciência e tecnologia de alimentos e x cigr section vi international technical symposium, 2016.

SHIMANO, Marilis Yoshie Hayashi. **Ação antioxidante de extratos de especiarias e suas misturas binárias e ternárias sobre a estabilidade oxidativa de óleo de soja.** 2012. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

SOUZA, Wagner de. **Avaliação da atividade antioxidante e compostos fenólicos de extratos vegetais.** 2013. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Tecnológica Federal do Paraná

XI, Wanpeng et al. Characterization of phenolic profile and antioxidant capacity of different fruit part from lemon (*Citrus limon* Burm.) cultivars. **Journal of food science and technology**, v. 54, n. 5, p. 1108-1118, 2017.