



# EXTRAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E PONTENCIAL ANTIMICROBIANO DO ÓLEO ESSENCIAL DE LIMÃO TAHITI (*Citrus latifolia* Tanaka).



## EXTRACTION, CHEMICAL CHARACTERIZATION AND ANTIMICROBIAL POTENCY OF ESSENTIAL OIL OF TAHITI LEMON (*Citrus latifolia* Tanaka).

EVERTON, Gustavo Oliveira<sup>1\*</sup>; TELES, Amanda Mara<sup>2</sup>; MOUCHREK, Adenilde Nascimento<sup>3</sup>; MOUCHREK FILHO, Victor Elias<sup>4</sup>.

<sup>1,2,3,4,5</sup> Universidade Federal do Maranhão, Departamento de Tecnologia Química, Laboratório de Microbiologia de Alimentos e Água e Laboratório de Pesquisa e Aplicação de Óleos Essenciais, Pavilhão Tecnológico (PCQA), Av. dos Portugueses, 1966, cep 65065-545, São Luís – MA, Brasil (fone: +55 98 982736148)

\* Autor correspondente  
e-mail: [gustavooliveiraeverton@gmail.com](mailto:gustavooliveiraeverton@gmail.com)

Received 21 February 2018; received in revised form 8 April 2018; accepted 9 April 2018

### RESUMO

O aumento da resistência bacteriana aos antibióticos induz ao aparecimento de estirpes mais virulentas, com capacidade de atravessar barreiras naturais de defesa do organismo e de se tornarem patogênicos, mesmo quando presentes em baixo número. Por isso, o uso de compostos naturais como os óleos essenciais, que possuem forte propriedade bactericida contra patógenos alimentares, vem sendo amplamente explorado. Dessa forma, o estudo em foco teve como objetivo extrair, caracterizar quimicamente e avaliar o potencial antimicrobiano do óleo essencial de *Citrus latifolia* Tanaka (limão tahiti) frente às cepas de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. Para extração do óleo essencial, utilizou-se a técnica de hidrodestilação, a caracterização química por Cromatografia Gasosa acoplada à Espectroscopia de Massas (CG-EM) e o potencial antimicrobiano foi avaliado pelo Método de Difusão de Disco (MDD). Observou-se para esse óleo o rendimento de (1,64%), a CG-EM quantificou o *limonene dioxide* (25,93%) como componente majoritário e todas as bactérias se mostraram sensíveis frente ao óleo em estudo. Portanto, constatou-se o potencial antimicrobiano do óleo essencial de *Citrus latifolia* Tanaka (Limão Tahiti) apontando-se o mesmo como aliado em aplicações cuja finalidade dependa da inibição dos microrganismos testados neste estudo.

**Palavras-chave:** *resistência bacteriana, propriedade bactericida, hidrodestilação, inibição, MDD.*

### ABSTRACT

The increase in bacterial resistance to antibiotics induce the emergence of more virulent strains, with ability to cross natural barriers of defense of the organism and of becoming pathogenic, even when present in low numbers. Therefore, the use of natural compounds such as essential oils, which have a strong bactericidal property against food pathogens has been widely explored. In this way, the focus study aimed to extract, chemically characterize and evaluate the antimicrobial potential of essential oil from *Citrus latifolia* Tanaka (tahiti lemon) against the strains of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. For extraction of essential oil, we used the hydrodistillation technique, chemical characterisation by Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry (GC/MS) and the antimicrobial potential was evaluated by the Disk Diffusion Method (DDM). It was observed for this oil yield (1,64%), the CG-MS quantified the limonene dioxide (25,93%) as major component and all bacteria were sensitive front of the oil. Therefore, it has the potential of antimicrobial essential oil from *Citrus latifolia* Tanaka (Tahiti lemon) pointing the same as an ally in applications which depend on the inhibition of microorganisms tested in this study.

**Keywords:** *bacteria resistance, bactericidal property, hydrodistillation, inhibition, DDM.*

## INTRODUÇÃO

Os óleos essenciais são utilizados desde épocas anteriores ao antigo Egito, passando pela Idade Média e chegando ao início do século XX através de tratados de Aromaterapia (Cunha *et al.*, 2007), também conhecidos como óleos voláteis ou etéreos, provenientes do metabolismo secundário de plantas aromáticas. Os seus componentes pertencem a duas classes quimicamente distintas, terpenóides e fenilpropanóides. Estes são sintetizados a partir de diferentes precursores metabólicos primários e são produzidos a partir de rotas biossintéticas diferentes. (Souza Júnior *et al.*, 2009).

Terpenos ou isoprenos são moléculas cuja unidade básica possui um número de átomos de carbono múltiplo de cinco. Entre esses constituintes dos óleos podem ser citados: monoterpenos (C10), sesquiterpenos (C15) e diterpenos (C20). Estes podem ser acíclicos, mono e bicíclicos, e seus produtos oxigenados são os álcoois, aldeídos, cetonas e compostos aromáticos (fenilpropanóides), principalmente fenóis e éteres. Também são encontrados ácidos orgânicos de baixo peso molecular e cumarinas (Araújo, 2010).

Nas plantas, os óleos desenvolvem funções que estão relacionadas à sua volatilidade, agindo na proteção contra predadores e patógenos, na atração de polinizadores, perda de água e inibidores de germinação de sementes. Além disso, recebem atenção especial, pelas diferentes atividades como alternativas ao uso de fungicidas, de herbicidas, de inseticidas e de nematicidas (Sodaeizadeh; Rafieiolhossain; Van Damm, 2010). A extração destes teve origem há milhares de anos, mas no início do século XIX ocorreu um aumento acentuado no rendimento de extração com o uso de prensas hidráulicas” (Cunha *et al.*, 2007).

Existem várias técnicas de obtenção dos óleos essenciais, em certos casos sua extração se torna um pouco fácil, como destilação por arraste a vapor, hidrodestilação, extração com CO<sub>2</sub> supercrítico, expressão a frio, entre outros. Essas variam conforme a localização, como em pétalas de flores, cascas de frutos, rizomas, raízes, folhas, galhos e pequenos frutos, casca da árvore, lenho, resinas da casca, goma, sementes, em quantidades e composições diferentes (Wolffenbüttel, 2011) e sua utilização (Pereira, 2010).

A exploração da atividade biológica dos metabólitos secundários dos óleos essenciais de plantas aparece como potencial de controle alternativo de fitopatógenos. Vários extratos brutos e óleos essenciais de plantas já foram testados sobre agentes causais de doenças em diversos trabalhos, tais como os realizados por Balbi-Peña *et al.* (2006) e Souza Júnior *et al.* (2009).

Os componentes essenciais bioativos desses óleos, apresentam-se promissores na terapêutica de doenças infecciosas (Ogunwande *et al.*, 2005). Tais substâncias, geralmente, são agentes que apresentam atividade antimicrobiana contra um grande número de microrganismos, incluindo espécies resistentes a antibióticos e antifúngicos. Diversos estudos mostram a ação antibacteriana exercida por vários óleos essenciais ensaiados sobre cepas bacterianas (Ferronato *et al.*, 2007; Rosato *et al.*, 2007; Albertson *et al.*, 2010; Santos *et al.*, 2011).

As caracterizações químicas de óleos essenciais remetem a técnica de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa. A identificação pode ser feita através da utilização de uma biblioteca de compostos ou através de índices específicos como o índice de retenção (Czepak & Bandoni, 2008). É uma das técnicas mais empregadas em análises quantitativas e qualitativas. Nela, os componentes da amostra são vaporizados no injetor e, então, é injetada na cabeça da coluna cromatográfica. A eluição é feita por um fluxo constante da fase móvel gasosa. No trajeto da amostra pela coluna, a amostra é separada em consequência de sua partição e interação das moléculas entre uma fase móvel gasosa e uma fase estacionária líquida ou sólida (Skoog, 2008).

Entre as plantas da flora Brasileira que produzem óleo essencial com potencial antimicrobiano promissor está o *Citrus latifolia* Tanaka (Limão Tahiti). Estudos realizados por Santos *et al.* (2011), Kotzekidou *et al.* (2008), Kunicka-Styczyn *et al.* (2009), Soares *et al.* (2008) e Silva (2014) comprovam. Este potencial justifica-se pela sua composição que integra compostos como limoneno, p-cimeno, terpenol e citral (Kunicka-Styczyn *et al.*, 2009), e principalmente ao seu elevado teor de ácido cítrico que é de cerca de 5 a 7%, independentemente da variedade de limão (Trucom, 2016).

Porém, os microrganismos apresentam

enorme facilidade de evoluir por mutação e recombinação genética, conduzindo ao aparecimento de espécies ou linhagens com maior virulência e com grande capacidade de sobrevivência perante antimicrobianos e fatores ambientais adversos (Brandl, 2006; O'Brien, 2002). As doenças alimentares de origem microbiológica constituem problema crescente em saúde pública e causa importante na redução da produtividade econômica, tanto em países desenvolvidos como em vias de desenvolvimento.

Dessa forma, observa-se que a maioria dos queijos se destaca pelo teor relevante de nutrientes, porém este é um alimento muito suscetível à contaminação microbiológica. Sabe-se que o uso de óleos essenciais é caracterizado por uma notável atividade antimicrobiana, por esta razão, seus produtos derivados podem ser usados para retardar ou inibir o desenvolvimento de microrganismos patogênicos e/ou deteriorantes. O óleo essencial de limão tahiti (*Citrus latifolia* Tanaka) possui atividade antibacteriana sobre as bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* constatada por Kunicka-Styczyn *et al.* (2009).

O aumento da resistência bacteriana aos antibióticos induz ao aparecimento de estirpes mais virulentas, com capacidade de atravessar barreiras naturais de defesa do organismo e de se tornarem patogênicos, mesmo quando presentes em baixo número (Santos & Cunha, 2007).

Por isso, o uso de compostos naturais como os óleos essenciais, que possuem forte propriedade bactericida contra patógenos alimentares, vem sendo amplamente explorado (Bodini, 2011). Assim, os óleos essenciais geralmente são utilizados como um método de controle eficaz, pois visa à redução dos custos, menor risco de contaminação do ambiente e dos alimentos causados pelos produtos químicos (Xavier *et al.*, 2012).

Dessa forma, o estudo em foco teve como objetivo extrair, caracterizar quimicamente e avaliar a atividade antimicrobiana do óleo essencial da casca de *Citrus latifolia* Tanaka (limão tahiti) frente às cepas de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* isoladas de queijo coalho comercializado em feiras livres de São Luís -MA.

## PARTE EXPERIMENTAL

O presente trabalho foi desenvolvido nos Laboratórios de Microbiologia de Alimentos e Água e Físico-Química de Alimentos e Água do Programa Controle de Qualidade de Alimentos e Água do Pavilhão Tecnológico da Universidade Federal do Maranhão (UFMA) e pela Central Analítica da Universidade de Campinas.

### 2.1. Extração do Óleo Essencial de Limão Tahiti (*Citrus latifolia* Tanaka)

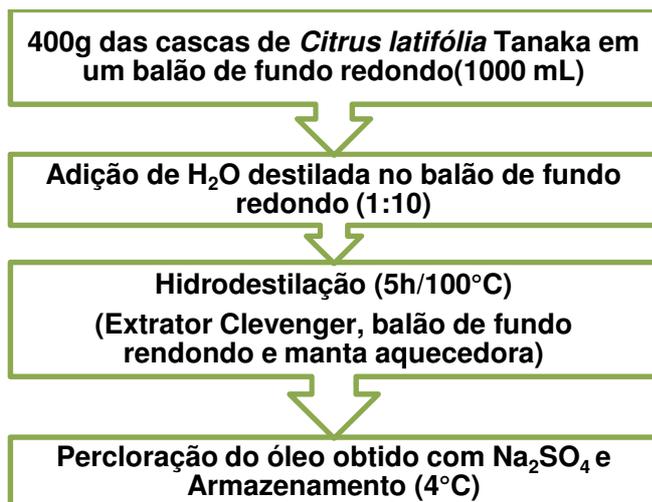
As cascas de *Citrus latifolia* Tanaka, apresentadas na Figura 1 abaixo, foram coletadas, no município de São Luís-MA, Brasil, em julho de 2017 e transportadas para o Laboratório de Físico-Química de Alimentos do Pavilhão Tecnológico da Universidade Federal do Maranhão (UFMA), onde foram secas em temperatura ambiente, trituradas (em pó) e armazenadas para extração do óleo essencial.



**Figura 1.** Cascas de *Citrus latifolia* Tanaka.

Para extração do óleo essencial de *Citrus latifolia* Tanaka, utilizou-se a técnica de hidrodestilação, com um extrator de Clevenger, de vidro acoplado a um balão de fundo redondo de 1000 mL acondicionado em manta elétrica como fonte geradora de calor. A cada rotina de extração do óleo essencial foram pesadas 400 g das cascas e adicionou-se água destilada na proporção de 1:10 e colocadas em um balão de fundo redondo acoplado ao sistema extrator. A hidrodestilação foi conduzida a 100°C por 5h recolhendo-se o óleo essencial extraído. O óleo foi seco por meio de percloração com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Essas operações foram realizadas em triplicatas e as amostras armazenadas em ampolas de vidro âmbar sob refrigeração de 4°C para evitar possíveis perdas de constituintes voláteis. O procedimento experimental é apresentado na

Figura 2 abaixo. Posteriormente o óleo essencial obtido foi submetido as análises.



**Figura 2.** Procedimentos para extração do óleo essencial das cascas de *Citrus latifolia* Tanaka.

O rendimento do óleo essencial foi expresso em porcentagem na relação massa/volume pela medida de densidade. Para realização dessa medida, foi utilizado um picnômetro de 1,0 mL, previamente seco, tarado e aferido, onde se adicionaram as amostras a 25°C, pesando-as em seguida. Após essa etapa, observou-se o volume (mL) de óleo essencial obtido após a extração do óleo por massa (g) de material vegetal, conforme a fórmula descrita pela quarta edição da Farmacopeia Brasileira (1996) e por Fabrowski (2002).

## 2.2 Caracterização e Quantificação Química do Óleo Essencial de Limão Tahiti (*Citrus latifolia* Tanaka) por Cromatografia Gasosa acoplada à Espectroscopia de Massas (CG-EM)

Os espectros na região do infravermelho foram obtidos no equipamento modelo IR PRESTIGE-21 e foram registrados na região 4000-400  $\text{cm}^{-1}$ . Todas as pastilhas foram preparadas usando brometo de potássio (KBr) anidro.

Os constituintes do óleo essencial foram identificados por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) na Central Analítica do Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas. Foi dissolvido 1,0 mg da amostra em 1000  $\mu\text{L}$  de diclorometano (pureza 99,9%). As condições de análise foram as seguintes: Método : Adams.M; Volume injetado: 0,3  $\mu\text{L}$ ; Coluna : Capilar HP-5MS (5% difenil, 95% dimetil polisiloxano ) (Equivalente DB-5MS ou CP-Sil 8CB LB/MS), nas dimensões (30 m x

0,25 mm x 0,25  $\mu\text{m}$ ); Gás de arraste : He (99,9995); 1,0 mL/min; Injetor : 280 °C, modo Split (1:10); Forno : 40 °C (5,0 min.) até 240 °C numa taxa de 4 °C .min<sup>-1</sup>, de 240 °C até 300 °C (7,5 min) numa taxa de 8 °C.min<sup>-1</sup> );  $t_{\text{r}} = 60,0$  min; Detector : EM<sup>1</sup>; EI (70 eV); Modo varredura (0,5 seg/scan); Faixa de massas: 40 – 500 daltons (uma); Linha transferência: 280 °C.; Filamento: desligado 0,0 a 4,0 min; Espectrômetro de massas tipo quadrupolo linear. Para a identificação dos compostos na amostra utilizou-se o programa AMDIS (*Automated Mass spectral Deconvolution Mass & Identification System*).

## 2.3 Avaliação do Potencial Antimicrobiano do Óleo Essencial de Limão Tahiti (*Citrus latifolia* Tanaka)

Para determinação do potencial antimicrobiano foi aplicada o “Método de Difusão de Disco (MDD) descrito por Bauer (1966), adaptada por *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2003), que padroniza o método dispensando os discos impregnados com óleo essencial sobre o centro da placa de Ágar Mueller Hinton, após a semeadura do inóculo bacteriano.

### 2.3.1. Cepas utilizadas

Foram utilizadas duas cepas de bactérias provenientes do isolamento de Queijo Coalho comercializado em feiras livres de São Luís-MA, considerando estudos relacionados com atividade antimicrobiana frente a cepas isoladas de alimentos e padrões *American Type Culture Collection* (ATCC), em estudos prévios da literatura. Essas foram doadas pelo Laboratório de Microbiologia do Controle de Qualidade de Alimentos e Água da Universidade Federal do Maranhão (PCQA-UFMA), sendo uma Gram-negativas: *Escherichia coli* (*E. coli*) e uma Gram-positiva: *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*). A identificação das cepas foi confirmada pelo uso de ensaios bioquímicos, seguindo as recomendações do manual de microbiologia clínica (Murray, 2003).

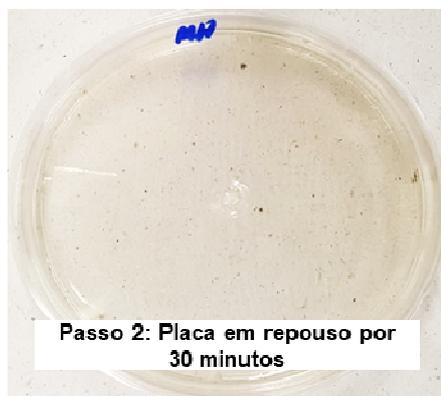
### 2.3.2. Padronização do inóculo

Culturas microbianas puras mantidas em Ágar TSA foram repicadas para 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 turbidez comparável à da solução padrão de McFarland 0,5, o que resulta em uma suspensão microbiana contendo aproximadamente  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL.

### 2.3.3. Método de Difusão de Disco (MDD)

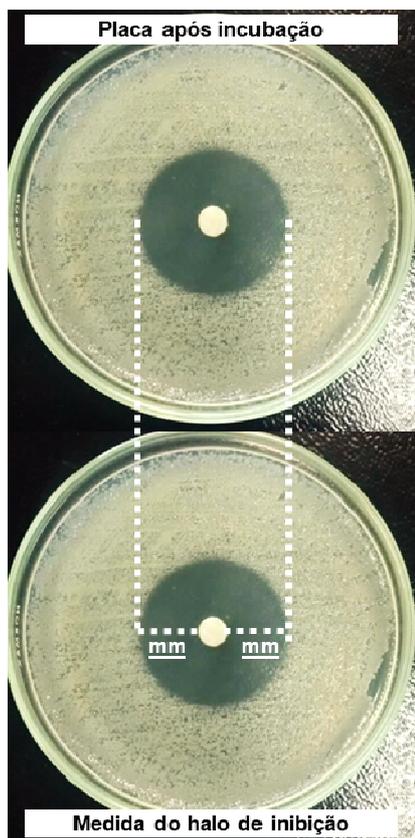
A técnica de Difusão de Disco padroniza os testes de sensibilidade de antimicrobianos por disco-difusão. Primeiro foram preparadas as placas com o meio de cultura Ágar Mueller Hinton após sua solidificação foi distribuído à suspensão microbiana na superfície do ágar com auxílio de *swab* estéril e deixado em repouso à temperatura ambiente por 30 min. Logo após são preparados os discos impregnados com óleo essencial respectivo. Utilizando-se pinça esterilizada, os discos foram aderidos ao centro das placas sobre a superfície do ágar. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 35°C por 24 horas. Após 24 horas faz-se a leitura do diâmetro do halo de inibição, incluindo o diâmetro do disco. Ensaio estes realizados em triplicata para obtenção dos resultados médios de cada medida. O procedimento experimental descrito é apresentado nas Figuras 3-5.



**Figura 3.** Semeadura do inóculo - Método de Difusão de disco.



**Figura 4.** Aplicação dos discos impregnados com óleo essencial - Método de Difusão de Disco.

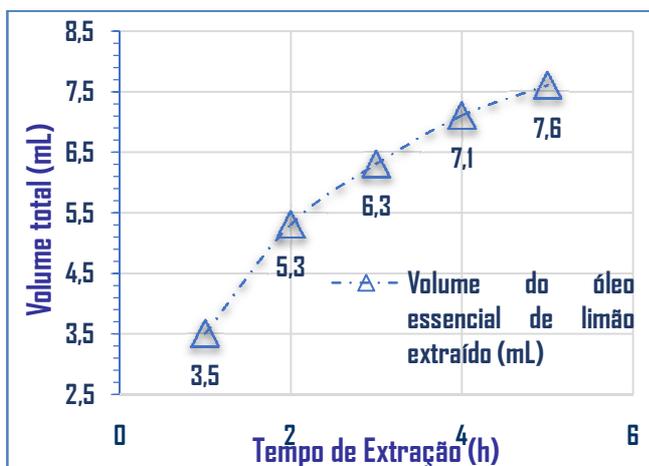


**Figura 5.** Mensurando os halos de inibição – Método de Difusão de Disco.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO:

### 3.1. Avaliação da Cinética de Extração

A extração do óleo essencial foi realizada num tempo máximo de 05 horas, para uma massa de 400g de amostra, com uma temperatura de 100°C. Na Figura 6 pode ser observado o tempo máximo.



**Figura 6.** Cinética referente ao rendimento de extração do óleo em função do tempo, com massa de 400g e temperatura de 100°C.

De acordo com os resultados obtidos na extração, o tempo máximo e o volume para óleo extraído das cascas de *Citrus latifolia* Tanaka foi de 5,0 horas e 7,6 mL, observando-se ainda aumento do rendimento até a última hora.

Atti-Santos *et al.* (2005) trabalharam com óleo essencial das cascas do limão Tahiti, em seu estudo da avaliação da cinética de extração, observaram o crescimento do rendimento até a quinta hora de extração.

Segundo Mouchrek Filho (2000), o tempo de extração do óleo essencial é um dos principais parâmetros físico-químicos da indústria de essências, no que se refere à qualidade e à natureza econômica. Por isso, uma destilação rápida pode conduzir a um produto contendo predominantemente constituintes mais voláteis, porém destituído das melhores características; ao contrário, uma extração prolongada encarece o produto e também pode sobrecarregá-lo de compostos de aromas indesejáveis (Chaar, 2000).

O rendimento foi calculado mediante a quantidade de óleo extraído, da massa e da densidade, para a casca de *Citrus latifolia* Tanaka foi de 1,64%. Estevam *et al.* (2017), ao extraírem o óleo essencial do óleo de *Citrus latifolia* Tanaka, obtiveram rendimento semelhante de 0,80%.

### 3.2. Avaliação das Características Químicas do Óleo Essencial de Limão Tahiti (*Citrus latifolia* Tanaka) por Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectroscopia De Massas (CG-EM)

O resultado desse estudo nos mostra a presença do constituinte majoritário. O constituinte majoritário do óleo foi o *limonene dioxide* com 25,92%. Além deste, foram identificados e quantificados outros 16 constituintes, conforme a Figura 7. Foram estes o *cis-carveol* com 11,59%, *p-cymene* (10,86%), *d-limonene* (8,85%), *1-hydroxylinalool* (8,10%), *myrtenol* (6,31%), *myrtenal* (5,34%), *carvone oxide* (3,69%), *bicyclo [5.2.1] decan-10-one* (3,23%), *p-cymen-8-ol* (3,02%), *caryophyllene oxide* (2,56%), *p-mentha-2,8-dien-1-ol* (2,47%), *pinocarvone* (2,02%), *carvone* (1,68%), *trans-carveol* (1,58%), *cyclooctanone* (1,54%) e *8-hydroxylinalool* (1,24%).

Resultados semelhantes ao desta pesquisa quanto à composição do óleo essencial de limão tahiti foram encontrados por Estevam *et*

al. (2016) que ao analisarem a composição do óleo essencial do *Citrus limonia* Osbeck e *Citrus latifolia* Tanaka, constataram 17 constituintes e o limoneno como componente majoritário com 46,3% do total do óleo.

Gragano (2007) ao analisar por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa a composição do óleo essencial das cascas de *Citrus latifolia* Tanaka também obteve o limoneno como constituinte majoritário deste óleo com 58,43%.

### 3.3. Determinação do Potencial Antimicrobiano do Óleo Essencial de Limão Tahiti (*Citrus latifolia* Tanaka) através do Método de Difusão de Disco (MDD).

Através do Método de Difusão de Disco, observou-se que o óleo essencial de *Citrus latifolia* Tanaka (Limão Tahiti) apresentou atividade antimicrobiana frente a todas as bactérias testadas, conforme a Tabela 1.

**Tabela 1.** Diâmetro dos halos de inibição, resultado do MDD aplicando o óleo essencial de *Citrus latifolia* Tanaka

Óleo Essencial de <i>Citrus latifolia</i> Tanaka	
Bactéria	Diâmetro do halo de inibição
<i>E. coli</i>	21 mm
<i>S. aureus</i>	10 mm

Moreira (2005) propôs uma classificação do diâmetro do halo de inibição formado para a sensibilidade de microrganismos frente a ação de óleos essenciais, sendo considerados resistentes quando os halos de inibição apresentarem diâmetro inferior a 8 mm e sensíveis para halos de 9 a 14 mm. Observou-se que a *Escherichia coli* apresentou halo de inibição de diâmetro de 21 mm, e *Staphylococcus aureus* 10 mm, sendo ambas classificadas como perfil antimicrobiano sensível frente a esse óleo.

O potencial antimicrobiano encontrado do óleo essencial de limão, foi relatada por Kotzekidou *et al.* (2008) estudaram a eficácia do óleo de limão comerciais em cepas de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* em amostras de chocolate e constataram que estas cepas foram inibidas pela presença do óleo, sugerindo o uso deste como uma barreira para aumentar a vida de prateleira ao produto.

A utilização desse óleo como agente

antimicrobiano frente a microrganismos patogênicos em alimentos é pouco explorada, no entanto, e possível encontrar estudos, como Soares *et al.* (2008) que avaliaram a atividade antibacteriana in vitro da casca do limão sobre *Staphylococcus aureus* e observaram o limão apresentando resultados muito satisfatórios.

Kunicka-Styczyn *et al.* (2009) estudaram a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de lavanda e limão para uso como cosméticos e constataram a eficácia do óleo essencial de limão em cepas de *S. aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida* sp. e *Aspergillus niger*. Essa ação é devida sua composição que integra compostos como limoneno, p-cimeno, terpenol e citral (Kunicka-Styczyn *et al.*, 2009), e principalmente ao seu elevado teor de ácido cítrico que é de cerca de 5 a 7%, independentemente da variedade de limão (Trucom, 2016).

Santos *et al.* (2011) ao analisarem a atividade antimicrobiana in vitro dos óleos essenciais de orégano, alho, cravo e limão sobre bactérias patogênicas isoladas de vôngole, não obtiveram ação antimicrobiana para o óleo essencial de limão. Os dados apresentados neste trabalho apresentam resultados satisfatórios, visto que obteve uma classificação para ambas bactérias testadas como perfil sensível para o potencial antimicrobiano do óleo essencial de limão.

Silva (2014) realizou uma avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial de limão-cravo e limão-siciliano, frente a bactérias patogênicas, incluindo a *Escherichia coli*, pela técnica de Difusão de Disco e observou os halos de inibição, respectivamente, de 11,40 e 14,40. Essa diferença, está intimamente relacionada com os componentes químicos do óleo, conforme descreveram anteriormente Kunicka-Styczyn *et al.*, (2009). Além disso, composição química de um óleo essencial extraído de uma mesma espécie vegetal pode variar significativamente, de acordo com, por exemplo, a época de coleta, condições climáticas, tipo de solo, quimiotipos e ciclo vegetativo (Simões & Spitzer, 2003). Sendo que fatores extrínsecos como a influência do clima e solo dos locais de cultivo podem ocasionar variações nos teores e nas composições químicas dos óleos essenciais (Mouchrek Filho, 2000).

## CONCLUSÕES:

Através dos resultados obtidos, pode-se concluir que o tempo de extração máxima para o óleo essencial de limão é de 5h, apresentando um rendimento de 1,64%. A técnica CG-EM comprovou que o *limonene dioxide* (25,93%) é o componente majoritário do óleo em estudo, conforme os estudos prévios da literatura. O MDD classificou o óleo como agente antimicrobiano frente à *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, ambas foram classificadas como perfil antimicrobiano sensível frente a esse óleo com halos de inibição, respectivamente, de 21 e 10 mm. Apontando-se ainda o óleo de limão como aliado nas aplicações cuja finalidade dependa da inibição dos microrganismos testados neste estudo.

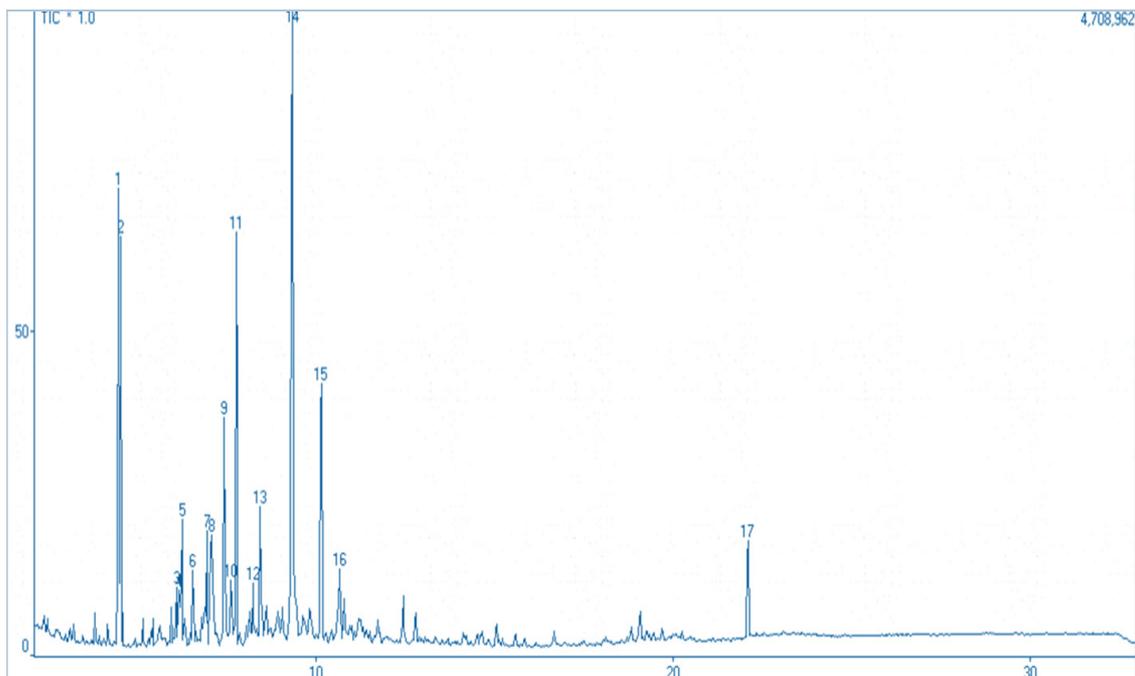
## AGRADECIMENTOS:

Ao Programa Controle de Qualidade de Alimentos e Água (PCQA) e a Universidade Federal do Maranhão (UFMA).

## REFERÊNCIAS:

1. Albertsson, K. W.; Persson, A.; Lingström, P.; Van Dijken, J. W.; *Clin. Oral Invest.*, **2010**, 107, 112.
2. Araújo, R.C.; *Tese de Doutorado*, Escola Superior de Agricultura de Piracicaba, Brasil, **2010**.
3. Atti-Santos, A.; Rossato, M.; Serafini, L.; Cassel, E.; Moyna, P.; *Braz. Arch. Biol. Technol.*, **2005**, 155, 160.
4. Balbi-Peña, M. I.; Becker, A.; Stangarlin, J. R.; Franzener, G.; Lopes, M. C.; Schwan-Estrada, K. R. F.; *Fitopatol. Bras.*, **2006**, 10, 14.
5. Bandoni, A. L.; Czepak, M. P.; Os Recursos Vegetais Aromáticos no Brasil, 1th ed., Vitoria, Brasil, **2008**.
6. Bodini, R.B.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade de São Paulo, Brasil, 2011.
7. BRANDL, M. T.; *Annu. Rev. Phytopathol.*, **2006**, 367, 392.
8. Chaar, J. S.; *Tese de Doutorado*, Universidade Federal de São Carlos, Brasil, **2000**.
9. *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)*. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests. Approved standard. M2-A8, 8.ed. **2003**.
10. Cunha, A. P. *O Emprego das Plantas Aromáticas desde as Antigas Civilizações até ao Presente*; Cunha, A. P.; Ribeiro, J. A.; Roque, O. R., eds.; Fundação Calouste Gulbenkian Lisboa, **2007**, cap 6.
11. Estevam, E.; Miranda, M.; Alves, J.; Egea, M.; Pereira, P.; Martins, C.; Esperandim, V.; Magalhães, L.; Bolela, A.; Cazal, C.; Souza, A; Alves, C.; *Rev. Virtual Quim.*, **2016**, 1842, 1854.
12. Ferronato, R.; Marchesan, E. D.; Pezenti, E.; Bedinarski, F.; Onofre, S. B.; *Rev. Bras. Farmacogn.*, **2007**, 224, 230.
13. FABROWSKI, F. J. R. T.; *Tese de Doutorado*, Universidade Federal do Paraná, Brasil, **2002**.
14. *Farmacopeia Brasileira IV*; 4. ed.: eds.; Atheneu São Paulo, **1996**, cap 1.
15. Gargano, A. C.; *Dissertação de mestrado*, Universidade Estadual Paulista, Brasil, **2007**.
16. Kotzekidou, P.; Giannakidis, P.; Boulamatsis, A.; *Food Sci. Technol.*, **2008**, 119, 127.
17. Kunicka-Styczyn, A.; Sikora, M.; Kalemba. D.; *J. Appl. Microbiol.*, **2009**, 1903, 1911.

18. Mouchrek Filho, V. E.; *Tese de Doutorado*, Universidade de São Paulo, Brasil, **2000**.
19. Moreira, V. S.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Brasil, **2013**.
20. Murray, P. R.; *Microbiologia Clínica*. Murray, P. R., eds.; Guanabara Koogan, **2003**, cap.
21. O'Brien, T. F.; *Clin. Infect. Dis.*, **2002**, 78, 84.
22. Ogunwande, I.A.; Olaworeb N.O.; Ekundayoc, O.; Walkerd T.M.; Schmidtd, J.M; Setzerd, W.N.; *Int. J. Aromather.*, **2005**, 152, 147.
23. Pereira, M. A. A.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Brasil, **2010**.
24. Rosato, A.; Vitali, C.; De Laurentis, N.; Armenise, D.; Milillo, M.A.; *Phytomedicine*, **2007**, 727, 732.
25. Santos, J.; Carvalho Filho, C.; Barros, 6T.; Guimaraes, A.; *Ciênc. Agrár.*, **2011**, 1537, 1564.
26. Santos, I.; Cunha, I. *Segur. Aliment. Nutr.*, **2007**, 10, 13.
27. Simões, C.M.; Spitzer, V.; *Óleos Voláteis: Farmacognosia da Planta ao Medicamento*, 5th ed., Florianópolis: Brasil, **2003**.
28. Skoog D. A.; West D. M.; Holler F. J.; Crouch S. R.; *Fundamentos de Química Analítica*, 9th ed., São Paulo: Brasil, **2008**.
29. Silva, R. *Tese de Doutorado*, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Brasil, **2014**.
30. Soares, S.; *Rev. Odontol. Araçatuba*, **2008**, 20, 24.
31. Sodaeizadeh, H.; Rafieiolhossain, M.; Van Damm, P.; *Ind Crops Prod.*, **2010**, 385, 394.
32. Souza Júnior, I.T.; Sales, N.L.P.; Martins, E.R.; *Rev. Biotemas*, **2009**, 77, 83.
33. <https://www.docelimao.com.br/site/limao/conceito/12-o-acido-citrico-do-limao-um-agente-221-bactericida.html>, acessada em Janeiro 2018.
34. Xavier, M.V.A.; Brito, S.S.S.; Oliveira, C.R.F.; Matos, C.H.C.; Pinto, M.A.D.S.C.; *Rev. Bras. Pl. Med.*, **2012**, 214, 217.
35. Wolffenbüttel, A. N.; *Base da Química dos Óleos essenciais e Aromaterapiam- Uma Abordagem Técnica e Científica*. Wolffenbüttel, A. N., eds.; Lazlo, **2011**, cap.
36. World Health Organization (The World Health Report 2002: *Reducing Risks, Promoting Healthy Life*. World Health Organization, **2002**.



**Figura 7.** Cromatograma da amostra do óleo essencial das cascas de *Citrus latifolia* Tanaka, apresentando os picos selecionados e identificados através da comparação dos respectivos espectros de massas.