



**MARCOS DE SOUZA GOMES**

**ATIVIDADES BIOLÓGICAS DOS ÓLEOS  
ESSENCIAIS DE TRÊS ESPÉCIES DO GÊNERO  
*CITRUS* E DE SEUS COMPONENTES  
MAJORITÁRIOS**

**LAVRAS – MG  
2014**

**MARCOS DE SOUZA GOMES**

**ATIVIDADES BIOLÓGICAS DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE TRÊS  
ESPÉCIES DO GÊNERO CITRUS E DE SEUS COMPONENTES  
MAJORITÁRIOS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, área de concentração em Agroquímica e Agrobioquímica, para a obtenção do título de Doutor.

Orientadora  
Dra. Maria das Graças Cardoso

**LAVRAS – MG  
2014**

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Coordenadoria de Produtos e  
Serviços da Biblioteca Universitária da UFLA**

Gomes, Marcos de Souza.

Atividades biológicas dos óleos essenciais de três espécies do gênero *Citrus* e de seus componentes majoritários / Marcos de Souza Gomes. – Lavras : UFLA, 2014.

126 p. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2014.

Orientador: Maria das Graças Cardoso.

Bibliografia.

1. Antimicrobiano. 2. Antiparasitário. 3. Citotoxicidade. 4. Hemolítico. 5. Antioxidante. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 633.898

**MARCOS DE SOUZA GOMES**

**ATIVIDADES BIOLÓGICAS DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE TRÊS  
ESPÉCIES DO GÊNERO CITRUS E DE SEUS COMPONENTES  
MAJORITÁRIOS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, área de concentração em Agroquímica e Agrobioquímica, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 24 de julho de 2014.

Dra. Maria das Graças Cardoso	UFLA
Dr. David Lee Nelson	UFMG
Dr. Dr. Luís Roberto Batista	UFLA
Dra. Marisi Gomes Soares	UNIFAL
Dr. Milene Aparecida Andrade	UFLA

Dr. Maria das Graças Cardoso  
Orientadora

**LAVRAS – MG  
2014**

## **DEDICO E OFEREÇO**

*A Deus, que sempre esteve ao meu lado guiando-me e dando-me forças para seguir.*

*Aos meus pais, Luiz e Rosânia, que são meus exemplos de vida e educação.*

*Aos meus irmãos, Matheus, Júlia e Daniela, que sempre me deram força e incentivo nos momentos difíceis.*

*À Ana Clara, pelo amor, incentivo e compreensão.*

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus e a Nossa Senhora, por iluminarem meus passos.

À professora Dra. Maria da Graças Cardoso, a quem agradeço, em especial pela orientação, amizade, ensinamentos e confiança para execução do meu trabalho.

Aos professores Dr. Luiz Roberto Batista, Dr. Paulo Sérgio C. Preté, Dr. Maurílio J. Soares, Dra. Maria Dulce C. Antunes, Dra. Maria Graça C. Miguel e Dra. Josefina Aparecida de Souza pela coorientação, atenção, disponibilidade, ensinamentos e a amizade. Sou muito grato por tudo que vocês fizeram por mim. À professora Dra. Samísia Maria Fernandes Machado (UFS), pelas análises cromatográficas dos óleos essenciais.

Ao professor Maluf pelos ensinamentos, ajuda e atenção.

Aos professores do programa de pós-graduação em Agroquímica, pelos ensinamentos.

Aos meus colegas do Laboratório Wildão, Juliana, Milene, Cíntia, Maria Luisa, Juliana Valério, Léo, Lucilene, Christiane, Aline, Lidiany, Ana, João, Jean, Luiz Gustavo, Felipe, Cleusa, Luiz Roberto e os mais novos, pela amizade, companheirismo, dedicação e ajuda na condução dos experimentos.

Aos meus colegas de mestrado e doutorado da UFLA, pela amizade e companheirismo.

Aos meus colegas do Laboratório da Universidade do Algarve (Portugal) Adriana, Custódia e Smail pela ajuda na condução dos experimentos. Em especial a Adriana que foi fundamental para que nossa passagem por Portugal fosse inesquecível.

A todos os funcionários do Departamento de Química, pela amizade, atenção e auxílio prestados.

Aos meus pais, Luiz e Rosânia, por todo amor e por me ensinarem a ser uma pessoa melhor a cada dia. Obrigado por sempre apoiarem-me em todos os meus sonhos. Vocês foram fundamentais nesta minha conquista.

Aos meus irmãos, Matheus, Júlia e Daniela, pelo amor, carinho, companheirismo e por estarem presentes em todos os momentos.

Ao meu amor, Ana Clara, pelo amor, carinho, paciência, companheirismo, sempre apoiando-me e ajudando-me nos momentos em que mais precisei.

Aos todos os meus familiares pelo amor e carinho. Agradeço por todos os momentos em que vocês incentivaram-me e ajudaram-me, independentemente do meu propósito.

Aos meus avós, pelo amor e pelas orações. Essas são essenciais em minha vida.

À Carol e ao Gustavo, pela amizade, carinho e atenção.

À todos meus amigos pelo companheirismo e pelos momentos felizes que passamos juntos.

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Química, que me permitiram realizar este trabalho.

E a todos que, de alguma forma, contribuíram para a conclusão deste trabalho.

## RESUMO GERAL

Este trabalho foi realizado com o objetivo de caracterizar e quantificar quimicamente os óleos essenciais extraídos das cascas do limão-taiti (*Citrus aurantifolia*), limão-verdadeiro (*Citrus limon*) e laranja (*Citrus sinensis*), bem como avaliar, juntamente com os padrões limoneno, citral e sua mistura (limoneno + citral), seus efeitos antibacteriano, antifúngico, antitripanossoma, citotóxico e hemolítico e avaliar também as atividades antioxidantes somente dos referidos óleos essenciais em diversas metodologias. Os óleos essenciais foram extraídos pela técnica de hidrodestilação e a identificação e quantificação dos constituintes químicos, pelas análises em CG-EM e CG-DIC. Para avaliar o efeito sobre a forma epimastigota do *Trypanosoma cruzi* as concentrações testadas foram (500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,63; 7,81  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) e, para avaliar a atividade antibacteriana e antifúngica, as concentrações foram (500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,63; 7,81 e 3,91  $\mu\text{L mL}^{-1}$ ). Para avaliar a atividade citotóxica contra às células Vero as concentrações testadas foram (1000; 500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,63; 7,81  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) e, para avaliar a atividade hemolítica (hematócrito 0,15%), empregaram-se as seguintes concentrações (0,6; 1,0; 2,0; 4,0; 5,0 e 10,0  $\mu\text{L mL}^{-1}$ ). Adicionalmente ao teste hemolítico, foram realizadas varreduras nos comprimentos de onda de 500 a 700nm para avaliar se houve oxidação da hemoglobina. Também foi determinada a atividade antioxidante dos três óleos essenciais por meio de diversas metodologias. Verificou-se por meio da atividade antitripanossoma que o efeito dos seis tratamentos contra à forma epimastigota foi fraco, sendo os padrões limoneno e citral os mais eficazes. Em relação à atividade antimicrobiana, os resultados foram satisfatórios, tanto para os fungos quanto para as bactérias. Observou-se, por meio da atividade citotóxica, que os seis tratamentos apresentaram efeitos elevados, verificando em todos eles um efeito dose-dependente. Para a atividade hemolítica, os padrões (citral e limoneno) e sua mistura (citral + limoneno) possuíram maior efeito em baixas concentrações, seguido dos três óleos essenciais. Percebeu-se também que todos os tratamentos apresentaram efeito oxidante na hemoglobina, sendo mais intenso para as concentrações mais elevadas. Com relação às atividades antioxidantes, verificou-se, pelos métodos TBARs e Lipossomas, que todos os óleos essenciais tiveram um efeito pró-oxidante, ou seja, além de não protegerem o substrato lipídico da oxidação, eles também oxidaram. Já para a avaliação da capacidade de captura dos radicais, somente o método de DPPH não apresentou atividade antioxidante, no entanto, para os outros métodos, obtiveram-se resultados antagônicos. Isso demonstra a importância da utilização de vários métodos de avaliação da atividade antioxidante, pois métodos diferentes fornecem resultados diferentes. Com relação ao método da oxidação do sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico, verificou-se que o  $\text{IC}_{50}$  dos três óleos essenciais foram acima de 500  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . E para o método fosfomolibdênio,

observou-se, por meio da análise de variância, que não houve diferença significativa entre os óleos essenciais analisados. Com isso, pode-se observar que os três óleos essenciais testados apresentaram atividade antioxidante positiva em algumas metodologias utilizadas e, em outras, não. Isso pode ser devido a diversos fatores inerentes a cada metodologia que influenciam na atividade antioxidante.

Palavras-chave: Antimicrobiano. Antiparasitário. Citotoxicidade. Hemolítico. Antioxidante.

## GENERAL ABSTRACT

This work was carried out in order to characterize and to quantify chemically the essential oils extracted from lemon taiti peel (*Citrus aurantifolia*), true lemon peel (*Citrus limon*), orange peel (*Citrus sinensis*). It was evaluated not only the antibacterial, antifungal and anti-trypanosome effects of the essential oils and their standards limonene, citral and the mixture (limonene + citral) but also the cytotoxic, hemolytic and antioxidant activities using several methodologies. The essential oils were extracted by hydrodistillation technique. Their chemical constituents were identified and quantified by GC-MS and GC-FID. To evaluate the effects on epimastigote forms of *Trypanosoma cruzi* the following concentrations of essential oils were tested 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.63, 7.81 mg mL<sup>-1</sup>. To analyze the antibacterial/antifungal activity, different concentrations were used 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.63, 7.81 mg mL<sup>-1</sup>. To assess the cytotoxic activity against Vero cells were tested concentrations 1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.63, 7.81 mg mL<sup>-1</sup> and to evaluate the hemolytic activity (hematocrit 0.15%) were employed the following concentrations 0.6, 1.0, 2.0, 4.0, 5.0 and 10.0 mL<sup>-1</sup>. In addition to the hemolytic test, scans were performed in the wavelength between 500 to 700 nm to assess whether there was hemoglobin oxidation. The antioxidant activity of three essential oil was also determined by several methods. The results of chemistry identification and quantification of the essential oils displayed three essential oils showed the limonene as a major component. It was found by anti-trypanosome activity that the effect of six treatments against the epimastigote form was weak, being the most effective the standards limonene and citral. Regarding antimicrobial activity the results were satisfactory for both bacteria and for fungi. The six treatments displayed high cytotoxic activity and dose-dependent effect. For hemolytic activity the standards (citral and limonene) and their mixture (limonene + citral) displayed higher effect at low concentrations, followed by three essential oils. It was also observed that all treatments showed oxidative effect on hemoglobin, being stronger for higher concentrations. Regarding the antioxidant activity it was verified by the TBARS methods and liposomes all essential oils had a pro-oxidant effect, in other words, they did not protect the lipid substrate from oxidation, they also oxidized them. As for the evaluation of the ability to capture the radicals, only the DPPH assay showed no antioxidant activity. However, for other methods yielded conflicting results. This demonstrated the importance to use multiple methods to evaluate the antioxidant activity, because different methods might provide different results. Regarding the oxidation of linoleic  $\beta$ -caroteno/ácido system method, it was found that the IC<sub>50</sub> of the three essential oils were above 500 mg mL<sup>-1</sup>. For phosphomolybdenum method it was observed by analysis of variance that there was no significant difference between the

essential oils analyzed. Thus, it can be observed that the three essential oils tested showed positive antioxidant activity in some methodologies only. This might be due to several factors inherent to each method that influence the antioxidant activity.

**Keywords:** Antimicrobial. Antiparasitic. Cytotoxicity. Hemolytic. Antioxidant.

## LISTA DE FIGURAS

### PRIMEIRA PARTE

Figura 1	Rotas biossintéticas dos metabólitos secundários.....	23
Figura 2	Biossíntese dos terpenoides.....	25
Figura 3	Biossíntese dos fenilpropanoides.....	26
Figura 4	Estrutura química do limoneno.....	27
Figura 5	Estrutura química do citral: (a) neral , (b) geranial.....	27

### ARTIGO 1

Figura 1	Anti-trypanosome activity of three essential oils of the genus <i>Citrus</i> and the standards citral, limonene and the mixture (limonene + citral) on <i>T. cruzi</i> epimastigote forms. (a) Lime (b) Lemon (c) Orange (d) Limonene (e) Citral and (f) mixture (limonene + citral) .....	60
----------	--	----

### ARTIGO 2

Figura 1	Atividade citotóxica de três óleos essenciais do gênero <i>Citrus</i> , dos padrões citral e limoneno e da sua mistura (citral + limoneno) sobre Células Vero. (a) Limão-taiti (b) Limão-verdadeiro (c) Laranja (d) Limoneno) (e) Citral e (f) Mistura (citral + limoneno).....	82
Figura 2	Efeito da concentração dos óleos essenciais sobre eritrócitos íntegros (Ht 0,15%), incubados em solução isotônica (PBS, pH 7,4) a 37°C. Médias seguidas da mesma letra, sendo a minúscula comparação dentro de cada tratamento e a maiúscula comparação entre as concentrações de cada tratamento, não diferem significativamente entre si a 5% de probabilidade, pelo teste de Scott-Knott.....	85
Figura 3	Espectros de absorção (500-700 nm) de Hemoglobina purificada (20 µM) frente às diferentes concentrações do limão-taiti em tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 7,4 a 37°C.....	87
Figura 4	Espectros de absorção (500-700 nm) de Hemoglobina purificada (20 µM) frente às diferentes concentrações	

	do limão-verdadeiro em tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 7,4 a 37°C.....	88
Figura 5	Espectros de absorção (500-700 nm) de Hemoglobina purificada (20 µM) frente às diferentes concentrações da laranja em tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 7,4 a 37°C.....	88
Figura 6	Espectros de absorção (500-700 nm) de Hemoglobina purificada (20 µM) frente às diferentes concentrações do limoneno em tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 7,4 a 37°C.....	89
Figura 7	Espectros de absorção (500-700 nm) de Hemoglobina purificada (20 µM) frente às diferentes concentrações do citral em tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 7,4 a 37°C.....	89
Figura 8	Espectros de absorção (500-700 nm) de Hemoglobina purificada (20 µM) frente às diferentes concentrações da mistura (citral + limoneno) em tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 7,4 a 37°C.....	90

### ARTIGO 3

Figura 1	Estabilização do radical DPPH• por um antioxidante..	113
Figura 2	Estrutura química do limoneno.....	113
Figura 3	Porcentagem da atividade antioxidante dos óleos essenciais de limão-taiti, limão-verdadeiro e laranja pelo método da oxidação do sistema β-caroteno/ácido linoleico.....	115
Figura 4	Percentual da atividade anti-inflamatória dos óleos essenciais de limão-taiti, limão-verdadeiro e laranja. Médias seguidas da mesma letra, não diferem significativamente entre si a 5% de probabilidade, pelo teste de Scott-Knott.....	118
Figura 5	Percentual da atividade antioxidante dos óleos essenciais de limão-taiti, limão-verdadeiro e laranja por meio dos métodos TBARs e lipossomas. Médias seguidas da mesma letra, não diferem significativamente entre si a 5% de probabilidade, pelo teste de Scott-Knott.....	119

## LISTA DE TABELAS

### ARTIGO 1

Table 1	Identification and quantification of peel essential oils from lime, lemon and orange.....	58
Table 2	Minimum inhibitory concentration of essential oils of lime, lemon, orange and the standards citral, limonene and limonene + citral against microorganisms <i>S. aureus</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>P. aeruginosa</i> and <i>S. cholerasuis</i> .....	62
Table 3	Minimum inhibitory concentration of essential oils of lime, lemon, orange and the standards citral, limonene and limonene + citral against microorganisms <i>A. niger</i> , <i>A. flavus</i> and <i>A. carbonarius</i> .....	63

### ARTIGO 2

Tabela 1	Valores do CC <sub>50</sub> dos três óleos essenciais do gênero <i>Citrus</i> , dos padrões citral e limoneno e da sua mistura (citral + limoneno) sobre Células Vero.....	83
----------	--	----

### ARTIGO 3

Tabela 1	Atividade antioxidante dos óleos essenciais de limão-taiti, limão-verdadeiro e laranja e dos antioxidantes padrões BHT e ácido ascórbico, por meio dos métodos sequestro dos radicais DPPH e inibição da oxidação do sistema β-caroteno/ácido linoleico.....	112
Tabela 2	Atividade antioxidante dos óleos essenciais de limão-taiti, limão-verdadeiro e laranja e dos antioxidantes padrões eugenol e manitol, por meio dos métodos TEAC, capacidade de captura do óxido nítrico e por inibição do radical hidroxil.....	116

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

°C	Unidade de temperatura: Graus Celcius
%	Unidade: Porcentagem
mL	Unidade de volume: Mililitros
G	Unidade de massa: Gramas
p/p	Razão: Peso/peso
µL	Unidade de volume: Microlitros
M	Unidade de medida: Metros
Mm	Unidade de medida: Milimetros
Mm	Unidade de medida: Micrômetros
mL/min	Razão: Mililitros/minuto
KPa	Unidade de pressão: Quilopascal
eV	Unidade de energia: Elétron-volt
µg/mL	Razão: Micrograma/mililitro
Cm	Unidade de medida: Centímetro
Mg	Unidade de massa: Miligrama

## SUMÁRIO

	<b>PRIMEIRA PARTE</b>	19
1	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	20
2	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	22
2.1	<b>Metabolismo secundário das plantas</b> .....	22
2.2	<b>Óleos essenciais</b> .....	23
2.2.1	<b>Óleos essenciais do gênero <i>Citrus</i></b> .....	26
2.3	<b>Atividades biológicas dos óleos essenciais</b> .....	28
2.3.1	<b>Atividade antitripanossoma</b> .....	28
2.3.2	<b>Atividade antibacteriana e antifúngica</b> .....	30
2.3.3	<b>Atividade citotóxica</b> .....	32
2.3.4	<b>Potencial antioxidante dos óleos essenciais</b> .....	35
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	38
	<b>SEGUNDA PARTE – ARTIGOS</b> .....	45
	<b>ARTIGO 1 : Use of essential oils of the genus <i>Citrus</i> as biocidal agents</b> .....	46
1	<b>INTRODUCTION</b> .....	49
2	<b>MATERIAL AND METHODS</b> .....	51
2.1	<b>Collect of the vegetal material and extraction of the essential oil</b> .....	51
2.2	<b>Chemical Identification and quantification of the essential oils</b> .....	51
2.3	<b>Evaluation of the anti-trypanosome activity in vitro</b> .....	52
2.4	<b>Evaluation of antibacterial and antifungal activities <i>in vitro</i></b> .	54
2.5	<b>Statistics analysis</b> .....	55
3	<b>RESULTS AND DISCUSSION</b> .....	57
3.1	<b>Yield, identification and chemical quantification of essential</b>	

	oil.....	57
3.2	Anti-trypanosome activity in vitro.....	59
3.3	Antimicrobial activity in vitro.....	61
4	CONCLUSIONS.....	65
	REFERÊNCIAS.....	66
	<b>ARTIGO 2: Atividades citotóxicas e hemolíticas dos óleos essenciais do gênero <i>Citrus</i> e dos padrões limoneno e citral.....</b>	69
1	INTRODUÇÃO.....	72
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	74
2.1	Coleta e preparação do Material Vegetal.....	74
2.2	Extração do óleo essencial.....	74
2.3	Determinação da umidade.....	75
2.4	Identificação e quantificação química dos óleos essenciais.....	75
2.5	Avaliação da atividade citotóxica in vitro.....	76
2.6	Atividade hemolítica.....	78
2.6.1	Teste hemolítico em meio isotônico.....	79
2.6.2	Avaliação da oxidação da hemoglobina.....	80
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	81
3.1	Atividade citotóxica in vitro.....	81
3.2	Atividade hemolítica e avaliação da oxidação da hemoglobina por ação de diferentes tratamentos.....	85
4	CONCLUSÕES.....	92
	REFERÊNCIAS.....	93
	<b>ARTIGO 3: Avaliação das atividades antioxidantes dos óleos essenciais de três espécies do gênero citrus utilizando diversas metodologias.....</b>	96
1	INTRODUÇÃO.....	99

<b>2</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>101</b>
<b>2.1</b>	<b>Coleta do material vegetal e extração do óleo essencial.....</b>	<b>101</b>
<b>2.2</b>	<b>Identificação e quantificação química dos óleos essenciais.....</b>	<b>101</b>
<b>2.3</b>	<b>Avaliação da atividade antioxidante.....</b>	<b>102</b>
<b>2.3.1</b>	<b>Atividade antioxidante do radical livre DPPH.....</b>	<b>103</b>
<b>2.3.2</b>	<b>Ensaio do <math>\beta</math>-caroteno/Ácido Linoleico.....</b>	<b>104</b>
<b>2.3.3</b>	<b>Atividade antioxidante equivalente ao Trolox (TEAC).....</b>	<b>105</b>
<b>2.3.4</b>	<b>Determinação da capacidade de remoção do óxido nítrico....</b>	<b>106</b>
<b>2.3.5</b>	<b>Radical hidroxil.....</b>	<b>106</b>
<b>2.3.6</b>	<b>Inibição da atividade da lipoxigenase.....</b>	<b>107</b>
<b>2.3.7</b>	<b>Método do TBARS.....</b>	<b>108</b>
<b>2.3.8</b>	<b>Lipossomas.....</b>	<b>109</b>
<b>2.3.9</b>	<b>Fosfomolibdênio.....</b>	<b>110</b>
<b>2.4</b>	<b>Análises Estatísticas.....</b>	<b>110</b>
<b>3</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>112</b>
<b>4</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>121</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>122</b>

**PRIMEIRA PARTE**

## 1 INTRODUÇÃO

A utilização de produtos naturais como matéri-prima para a obtenção de substâncias bioativas tem sido amplamente estudada nas últimas décadas. O mercado consumidor está buscando produtos diferenciados, saudáveis e isentos de aditivos sintéticos. O interesse das indústrias por esses produtos naturais é crescente, impulsionando os pesquisadores ao isolamento, caracterização e ao estudo das suas propriedades. Nesse contexto, destacam-se os óleos essenciais conhecidos como compostos voláteis, caracterizados por serem misturas complexas de diversos compostos. À temperatura ambiente, são líquidos oleosos de alta volatilidade, conferindo aromas agradáveis e sabores característicos. Podem ser consideradas moléculas lipofílicas, ou seja, insolúveis em água e solúveis em solventes orgânicos e sua composição envolve uma grande quantidade de classes de compostos, como hidrocarbonetos terpênicos, álcoois simples e terpênicos, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, éteres, ácidos orgânicos, entre outros (BAKKALI et al., 2008; SIMÕES et al., 2007).

No âmbito mundial, os óleos essenciais do gênero *Citrus* destacam-se, estando entre os mais utilizados no mundo e esta posição se deve principalmente por serem obtidos como subprodutos da indústria de suco (BIZZO et al., 2009). O componente limoneno presente na maioria dos óleos essenciais do gênero *Citrus* é o composto majoritário, havendo diferenças nos seus teores de uma espécie para outra. As aplicações biológicas desses óleos essenciais são diversas e seus componentes químicos podem atuar de maneira isolada ou em associação, atuando de forma sinérgica ou antagônica, promovendo, assim, um maior ou menor potencial.

Apesar do grande número de trabalhos nos quais se avaliam e comprovam algumas atividades biológicas dos óleos essenciais do gênero *Citrus*, poucos estudos foram realizados avaliando a atividade desses óleos sobre

parasitas e abordando o seu potencial citotóxico. Assim, no presente trabalho teve-se como objetivos caracterizar e quantificar quimicamente os óleos essenciais extraídos das cascas do limão-taiti (*Citrus aurantifolia*), limão-verdadeiro (*Citrus limon*) e laranja (*Citrus sinensis*), bem como avaliar, juntamente com os padrões limoneno, citral e sua mistura (limoneno + citral), seus efeitos antibacteriano, antifúngico, antitripanossoma, citotóxico e hemolítico e avaliar também as atividades antioxidantes dos referidos óleos essenciais, por diversas metodologias.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Metabolismo secundário das plantas

Nas plantas, etapas do processo vital, como nascimento, crescimento, reprodução, envelhecimento, doenças e morte, são asseguradas e controladas pelas transformações químicas realizadas pelo metabolismo primário e secundário (BRAZ FILHO, 2010). Os compostos envolvidos no metabolismo primário são macromoléculas que possuem uma distribuição universal e têm função fundamental para sua sobrevivência, sendo eles celulose, lignina, proteínas, lipídeos, açúcares entre outras substâncias. Em contrapartida, os compostos envolvidos no metabolismo secundário são moléculas de baixo peso molecular que não possuem uma distribuição universal nos vegetais, pois não são necessários para todos eles (SIMÕES et al., 2007). Esses compostos desempenham papéis ecológicos importantes (proteção, atração de polinizadores, adaptações ao estresse ambiental ou defesa química contra micro-organismos, insetos, herbívoros e outras plantas) que foram desenvolvidos ao longo do período evolutivo, para poder escapar das ameaças, pelo fato das plantas serem sésseis (BAKKALI et al., 2008).

Segundo Simões et al. (2007), a origem de todos os metabólitos secundários pode ser resumida por meio de dois metabólitos intermediários, que são derivados da glicose: o ácido chiquímico e o acetil-CoA (Figura 1). O ácido chiquímico origina os aminoácidos aromáticos, fenilalanina e tirosina, que depois de várias reações, irão formar os fenilpropanoides e o acetil-CoA, que são os precursores de vários tipos de substâncias, tais como terpenoides, esteróis, ácidos graxos entre outras.

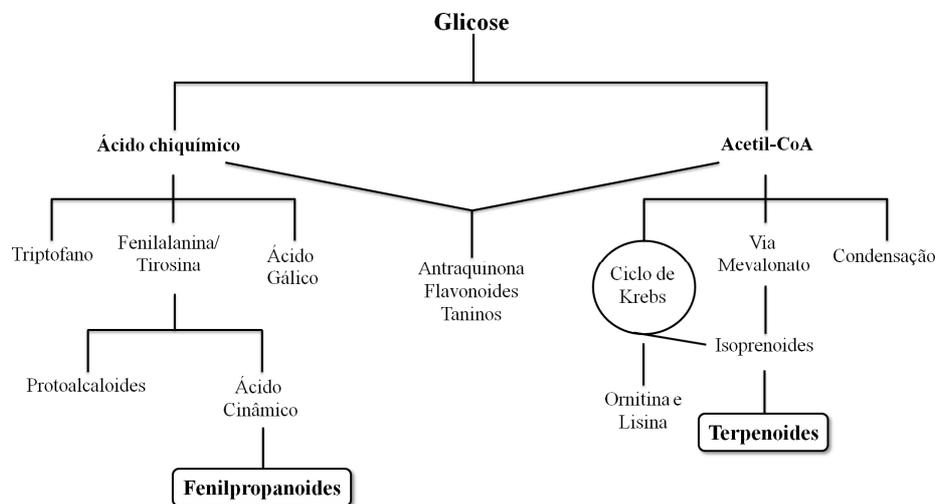


Figura 1 Rotas biossintéticas dos metabólitos secundários  
Fonte Simões et al., 2007

## 2.2 Óleos essenciais

Entre os metabólitos secundários sintetizados pelas plantas, encontram-se os óleos essenciais. Esses são misturas complexas, naturais, voláteis, caracterizadas por um forte odor, de constituição, na sua maioria, lipofílica, e que apresentam-se à temperatura ambiente como líquidos oleosos, o que os diferencia dos óleos fixos. De uma maneira geral, os óleos essenciais são instáveis, especialmente na presença de luz, calor, umidade, ar, substâncias oxidantes ou redutoras e metais. São, na maioria das vezes, caracterizados por dois ou três componentes majoritários (20 a 70%), podendo conter em sua constituição cerca de 20 a 60 componentes em concentrações muito diferentes (SIMÕES et al., 2007; BAKKALI et al., 2008).

A International Organization for Standardization (ISO) define os óleos essenciais como compostos obtidos de diferentes partes de plantas por hidrodestilação ou destilação por arraste com vapor d'água, bem como os

produtos obtidos por expressão dos pericarpos de frutos cítricos. De acordo com Gobbo-Neto e Lopes (2007), a produção desses óleos essenciais pode ser influenciada por diversos fatores ambientais (índice pluviométrico, temperatura, ritmo circadiano, sazonalidade, tipo de solo, altitude e ciclo vegetativo da planta) e isso ocorre por essas substâncias representarem uma interface química entre as plantas e o ambiente circundante. Essa variação da produção e da composição química dos óleos essenciais também pode se modificar de acordo com alguns procedimentos, como secagem, época de colheita, tipo de adubação, entre outros (BANDONI e CZEPAK, 2008).

A constituição química dos óleos essenciais é muito variada, podendo ser formada de derivados de terpenoides ou de fenilpropanoides. Os terpenoides representam aproximadamente 90% da composição química dos óleos essenciais (BAKKALI et al., 2008) e são sintetizados a partir da unidade isoprênica (2-metil-1,3-butadieno) que, por sua vez, origina-se do ácido mevalônico (citosol) ou do 1-deoxi-D-xilulose-5-fosfato (cloroplasto) (DXPS) (Figura 2).

A unidade isoprênica é formada pelo ácido mevalônico, que é desidratado e pirofosforilado, produzindo o isopentenil difosfato (IPP), o qual, por meio de reações de isomerização, é transformado em dimetilalil difosfato (DMAPP) (unidades isoprênicas bioquimicamente ativas). Já por meio do intermediário 1-deoxi-D-xilulose-5-fosfato (DXPS), esse dá origem ao 2-C-metil-D-eritritol-4-fosfato que, cujas sucessivas reações formam o isopentenil difosfato (IPP) e o dimetilalil difosfato (DMAPP). Por meio da condensação das unidades pentacarbonadas formadas (IPP e DMAPP), ocorre à síntese de outros compostos terpênicos: monoterpenos ( $C_{10}H_{16}$ ); sesquiterpenos ( $C_{15}H_{24}$ ); diterpenos ( $C_{20}H_{32}$ ); triterpenos ( $C_{30}H_{48}$ ); tetraterpenos ( $C_{40}H_{64}$ ) (Figura 3) (DEWICK, 2002).

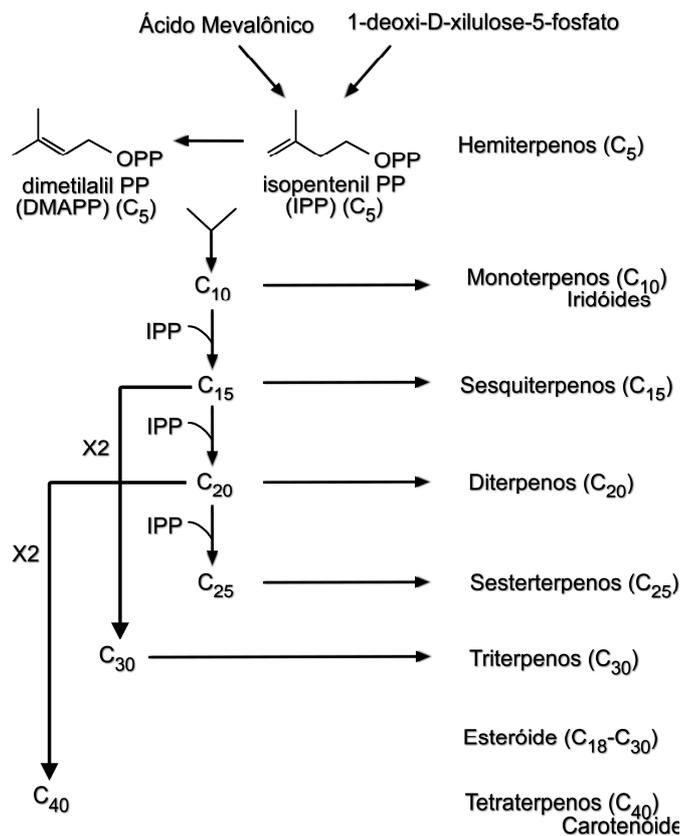


Figura 2 Biossíntese dos terpenoides

Fonte Dewick, 2002

Os fenilpropanoides são formados a partir do ácido chiquímico, do qual se originam os aminoácidos fenilalanina e a tirosina que, por sua vez, com a ação da enzima fenilalanina amonialiase (FAL), perde uma molécula de amônia, resultando na formação dos ácidos cinâmico e *p*-cumárico, respectivamente (Figura 3). Nas plantas, a atividade da FAL está sob o controle de vários fatores internos e externos, tais como hormônios, níveis de nutrientes, luz, infecção por fungos e lesões.

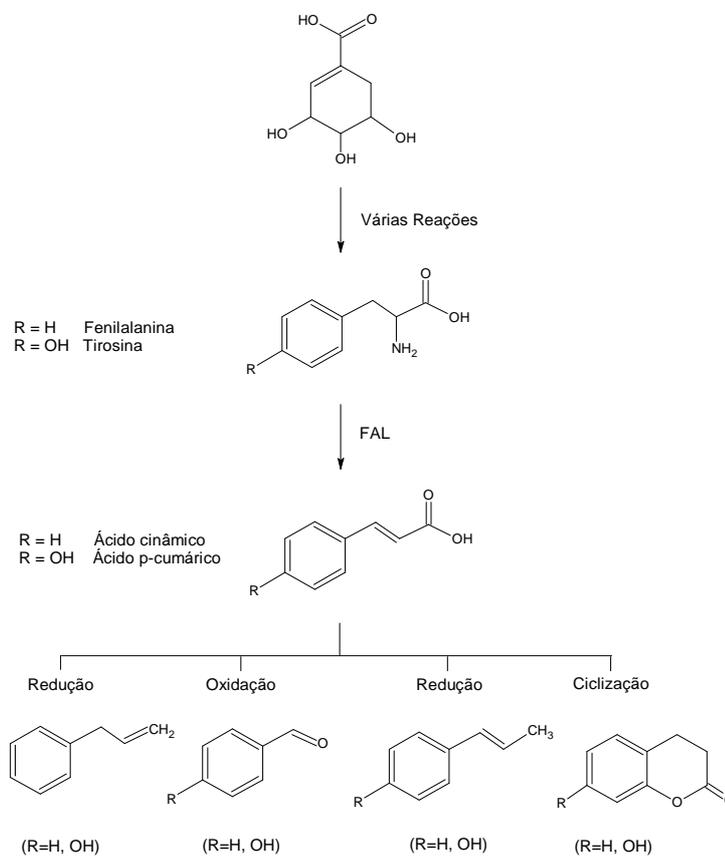


Figura 3 Biossíntese dos fenilpropanoides

Fonte Simões et al., 2007

As várias reações de redução, oxidação e ciclização, levam à formação dos fenilpropanoides (SIMÕES et al., 2007).

### 2.2.1 Óleos essenciais do gênero *Citrus*

Os óleos essenciais que mais se destacam no mundo são os óleos essenciais do gênero *Citrus*, estando entre os mais consumidos e comercializados. Esse volume de produção se dá principalmente por serem

obtidos principalmente a partir das cascas das frutas cítricas, como subprodutos da indústria de suco. No âmbito mundial, o Brasil tem lugar de destaque na produção de óleos essenciais, ficando ao lado da Índia, China e Indonésia e essa posição do Brasil se deve principalmente devido fato de o país ser o maior produtor de frutas cítricas e de sua industrialização para a produção de sucos (BIZZO et al., 2009).

O componente químico de maior expressão nos óleos essenciais dos cítricos é o limoneno (monotepeno cíclico) (Figura 4), estando presente em algumas espécies de 90 a 96% (DEMYTTENAERE; VANOVERSCHELDE; DE KIMPE, 2004).



Figura 4 Estrutura química do limoneno

Ladaniya (2008) relata que há mais de 150 compostos encontrados em óleos essenciais de cítricos e os principais responsáveis pelo aroma e qualidade do óleo essencial dos cítricos são os componentes limoneno e o citral (mistura isomérica neral e geranial, aldeídos monoterpênicos) (Figura 5).

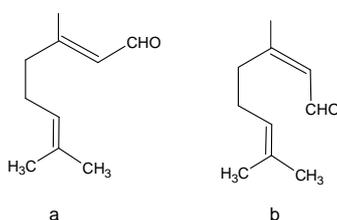


Figura 5 Estrutura química do citral: (a) neral, (b) geranial

As aplicações dos óleos essenciais das cascas dos cítricos são diversas, tendo eles um amplo aproveitamento. São utilizados principalmente na indústria alimentícia, cosmética, farmacêutica e em materiais de limpeza. Atuam como agentes redutores da peroxidase em vegetais folhosos e antioxidantes de óleos comestíveis, como o azeite, para melhorar suas propriedades sensoriais (PONCE et al., 2004). Apresentam também atividades contra diversos micro-organismos (CHUTIA et al., 2009; VIUDA-MARTOS et al., 2008).

## **2.3 Atividades biológicas dos óleos essenciais**

### **2.3.1 Atividade antitripanossoma**

A doença de Chagas, descoberta em 1909 pelo médico brasileiro Carlos Chagas, é um problema de saúde pública enfrentado na América Latina. Essa doença, causada pelo protozoário parasita *Trypanosoma cruzi*, afeta cerca de 18 milhões de pessoas do sul dos Estados Unidos até a Patagônia, causando aproximadamente 50.000 mortes por ano; outros 100 milhões de indivíduos vivem em áreas endêmicas (ENGELS & SAVIOLI, 2006; GELB & HOL 2002). Ela pode ser transmitida para os seres humanos por triatomíneos (barbeiros) ou por transfusões de sangue infectado, sendo esse o mais significativo mecanismo de transmissão (PIZZOLATTI et al., 2002). O ciclo de vida de *T. cruzi* é complexo, e se alterna entre hospedeiros vertebrados e invertebrados, apresentando três estágios de desenvolvimento: epimastigotas no intestino de insetos; tripomastigota, uma forma infecciosa na corrente sanguínea de mamíferos; e amastigota, uma forma proliferativa em células de mamíferos.

Há uma necessidade de desenvolver drogas eficazes contra essa doença aguda e crônica devido à falta de medicamentos eficientes e menos tóxicos, uma vez que a maior parte dos compostos sintéticos utilizados até agora para tratar

doenças parasitárias produzem efeitos secundários indesejáveis. Com isso, pesquisas por novos fármacos para o tratamento da doença de Chagas têm evoluído sensivelmente nas últimas décadas (DIAS et al., 2009) e os óleos essenciais podem fornecer informações úteis, bem como a base científica para o seu uso racional (BORGES et al., 2012; SANTORO et al., 2007a; SANTORO et al., 2007b; SANTORO et al., 2007c).

Estudando a atividade antitripanossoma dos óleos essenciais de diversas espécies do nordeste brasileiro (*Lippia sidoides*, *Lippia organoides*, *Chenopodium ambrosioides*, *Ocimum gratissimum*, *Justicia pectorales* e *Vitex agnus-castus*), Borges et al. (2012) verificaram que todos os óleos essenciais apresentaram efeito sobre o crescimento e sobrevivência do parasita, sendo os óleos essenciais de *L. sidoides* e *L. organoides* os mais efetivos contra as formas tripomastigotas e amastigotas, respectivamente. De forma semelhante, estudos anteriores de Santoro et al. (2007b) haviam relatado também atividades dos óleos essenciais (cravo-da-índia, manjerição e mil-folhas) e alguns de seus componentes majoritários (eugenol e linalol) contra as formas epimastigota e tripomastigota. O óleo essencial que apresentou maior efeito foi o do cravo-da-índia para as duas formas do parasita avaliadas. Em outro estudo, Santoro et al. (2007a), utilizando o óleo essencial de orégano (*Origanum vulgare* L.) e tomilho (*Thymus vulgaris* L.), verificaram que os dois óleos essenciais inibiram o crescimento do parasita, sendo essa atividade mais pronunciada para o último óleo essencial, provavelmente devido ao seu componente majoritário: o timol.

Embora seja menos investigada, a utilização dos óleos essenciais para o tratamento de parasitoses vem adquirindo maior importância nos últimos anos (SANTORO et al. 2007a). Isso faz com que eles sejam alvos potenciais para o desenvolvimento de novos antiparasitários (KAYSER et al., 2003).

### 2.3.2 Atividade antibacteriana e antifúngica

Uma das atividades biológicas dos óleos essenciais mais relatada é a atividade antimicrobiana. Essa está sendo considerada a base de várias aplicações, incluindo preservação de alimentos e produção de novos fármacos alternativos. Esse efeito contra os micro-organismos representa a própria função que os compostos presentes nos óleos essenciais exercem nas plantas, defendendo-as de bactérias e fungos fitopatogênicos. Dessa forma, muitas plantas têm sido atualmente consideradas como importantes fontes para a extração de compostos com atividade antimicrobiana (CANSIAN et al., 2010).

Na literatura, existem diversos estudos registrando a eficiência dos óleos essenciais de um grande número de espécies botânicas em promover a inibição do desenvolvimento de vários micro-organismos. Andrade et al. (2012), empregando a técnica difusão cavidade em ágar, avaliaram a atividade antibacteriana dos óleos essenciais de citronela (*Cymbopogon nardus*), canela (*Cinnamomum zeylanicum*) e gengibre (*Zingiber officinale*) sobre os micro-organismos *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Salmonella Cholerasuis* e *Pseudomonas aeruginosa*. Os autores verificaram que ocorreu um efeito inibitório para todas as bactérias analisadas, com exceção da espécie *E. coli*, que apresentou efeito inibitório somente na presença do óleo essencial de canela. Eles observaram também que as bactérias Gram-negativas exibiram valores da concentração mínima inibitória maiores que as Gram-positivas, provavelmente devido ao fato de a parede celular das bactérias Gram-negativas serem ricas em lipopolissacarídeos, o que inibe a penetração das substâncias antimicrobianas (BURT, 2004). Andrade et al. (2011), avaliando o efeito antibacteriano do óleo essencial das folhas de *Pelargonium odoratissimum* sobre os patógenos *S. aureus* e *E. coli*, observaram que o óleo essencial apresentou ação somente a partir da concentração 100 µL mL<sup>-1</sup>. Segundo

Bakkali et al. (2008), essa diferença na ação antibacteriana dos diferentes óleos essenciais pode ser devida à complexidade da sua constituição química, estando relacionada com a presença de uma substância ou um conjunto delas.

Lima et al. (2012) avaliaram os óleos essenciais de *Myristica fragrans* e *Salvia microphylla* quanto à sua propriedade antibacteriana, diante das bactérias Gram-negativas (*Aeromonas hydrophila*, *E. coli*, *P. aeruginosa* e *S. choleraesuis*) e Gram-positivas (*S. aureus*, *L. monocytogenes* e *Listeria innocua*). Os autores concluíram que os óleos essenciais mostraram atividade antibacteriana, inibindo o crescimento de todas as espécies de bactérias, exceto para a *E. coli*.

As propriedades antibacterianas *in vitro* dos óleos essenciais de *Thymus vulgaris*, *Cymbopogon citratus* e *Laurus nobilis* sobre cinco importantes bactérias patogênicas veiculadas por alimentos foram estudadas por Milezzi et al. (2012). Os autores verificaram que o óleo essencial de *C. citratus* demonstrou maior atividade antibacteriana em todas as concentrações testadas e para todas as bactérias. Eles relatam que a atividade antibacteriana dos óleos essenciais provavelmente ocorreu devido à característica hidrofóbica dos seus constituintes químicos, atuando sobre os lipídios da membrana celular, modificando a sua estrutura e tornando-a mais permeável, permitindo, assim, a passagem de íons e outras substâncias, ocorrendo perda do controle quimiosmótico e, consequentemente, morte celular (BAKKALI et al., 2008).

No que diz respeito à atividade antifúngica, Guimarães et al. (2011), avaliando a atividade fungitóxica do óleo essencial de *C. citratus* e do constituinte majoritário citral sobre os fungos fitopatogênicos *Fusarium oxysporum*, *Colletotrichum gloeosporioides* e *Rhizoctonia solani*, constataram que a atividade foi exercida pelo componente citral. Belletti et al. (2010) e Park et al. (2007) relatam que a atividade antifúngica dos terpenos, como o citral, é devida à característica lipofílica desses compostos, como descrito anteriormente.

Avaliando a atividade antifúngica *in vitro* do óleo essencial das folhas de *Piper hispidinervum* sobre *Bipolaris sorokiniana*, *F.oxysporum* e *C. gloeosporioides*, Zacaroni et al. (2009) verificaram que houve inibição total do fitopatógeno *B. sorokiniana*, na concentração de 200  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , ao passo que, para o *F. oxysporum* e o *C. gloeosporioides*, ela ocorreu na concentração de 1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Os pesquisadores atribuíram esse efeito antifúngico à presença do safrol, componente majoritário identificado nesse óleo essencial. Nascimento et al. (2008), pesquisando o óleo essencial da mesma planta, encontraram o safrol como componente majoritário e observaram uma inibição sobre o crescimento micelial do fungo *Alternaria alternata* em todas as concentrações analisadas.

Souza et al. (2011), investigando a atividade fungitóxica do óleo essencial das folhas de *Baccharis tridentata* obtido pelo método de hidrodestilação sobre os fitopatógenos (*Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani* e *Colletotrichum gloeosporioides*), encontraram inibição considerável do crescimento micelial dos fungos analisados. De forma similar, Vieira et al. (2012) verificaram também atividade fungitóxica do óleo essencial extraído das folhas e caules de *Ageratum conyzoides* L., utilizando os mesmos fitopatógenos.

Verifica-se, então, o vasto potencial contra micro-organismos que os óleos essenciais extraídos de diversas plantas apresentam. Desse modo, a descoberta de mais compostos com propriedades antimicrobianas por meio das pesquisas de fontes naturais é de extrema importância.

### **2.3.3 Atividade citotóxica**

Pelo fato de os óleos essenciais serem produtos advindos dos vegetais, não se exclui a possibilidade de eles apresentarem toxicidade. Nesse sentido, a avaliação da citotoxicidade dessas substâncias é de suma importância para

assegurar a qualidade e segurança desses produtos, quando aplicados em fármacos, alimentos e cosméticos.

O teste de citotoxicidade *in vitro* é classificado na ISO 10993-1 (Órgão Internacional de Padronização) como o primeiro ensaio para avaliar a biocompatibilidade de qualquer material. Esse teste promove resultados preliminares relacionados à interação entre o material e o corpo biológico, de forma rápida e eficiente, minimizando a necessidade de testes em animais (ROGERO et al., 2003). Esses ensaios consistem em colocar o material direta ou indiretamente em contato com uma cultura de células de mamíferos, verificando-se as alterações celulares por diferentes mecanismos, entre os quais a incorporação de corantes vitais ou a inibição da formação de colônias celulares (ROGERO et al., 2000).

O produto, para ser viável no ensaio de citotoxicidade *in vitro*, não deve ocasionar a morte das células, nem afetar suas funções celulares. Esses testes podem detectar a ocorrência de lise das células, a inibição da formação de colônias celulares, deslocamento do tecido, entre outros efeitos que possam ser desencadeados nelas (DAGUANO et al., 2007). Essas alterações são verificadas na maioria das vezes por meio de mecanismos de coloração, que são aplicados à cultura de células após um tempo de exposição ao material em teste.

O método colorimétrico do MTT (brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio) é baseado na redução desse sal solúvel de tetrazólio por células vivas, produzindo um produto colorido insolúvel. Esse ensaio, então, está relacionado com a viabilidade e o estado metabólico da célula, convertendo o sal (MTT) em azul de formazan, a partir de enzimas mitocondriais presentes somente nas células metabolicamente ativas. A quantificação da inibição enzimática é realizada espectrofotometricamente, permitindo a obtenção dos valores de  $IC_{50}$  (concentração das drogas que inibem 50% da atividade enzimática). É um método rápido, sensível e barato (MACIEL et al., 2002).

A determinação da citotoxicidade *in vitro* tem se tornado cada vez mais constante em trabalhos para a determinação da toxicidade dos óleos essenciais. Ensaio com essas substâncias podem fornecer importantes resultados sobre seu modo de ação e, assim, conduzir para próximas etapas do estudo. Tavares et al. (2010), avaliando o potencial citotóxico do óleo essencial de *Distichoselinum tenuifolium* sobre a linhagem celular de macrófagos de ratos, utilizando o método de MTT, observaram que os óleos essenciais não apresentaram efeito tóxico para as células. Em trabalhos anteriores já se demonstravam que o composto majoritário desses óleos essenciais, o mirceno, não apresentava efeitos sobre a viabilidade celular de linfócitos humanos e fibroblastos pulmonares de hamster (KAUDERER et al.,1991). Anteriormente, Tavares et al. (2008), avaliando a citotoxicidade do óleo essencial de *Daucus carota* sobre células dendríticas da pele de feto de rato, utilizando o mesmo método colorimétrico, observaram que nas concentrações  $0,64 \mu\text{L mL}^{-1}$ ,  $0,32 \mu\text{L mL}^{-1}$  e  $0,16 \mu\text{L mL}^{-1}$  não houve efeito citotóxico desse óleo essencial. Patil et al. (2009), avaliando o potencial citotóxico do óleo essencial de limão-taiti, contra o carcinoma de células do cólon, utilizando o método do MTT, observaram uma citotoxicidade dose-dependente ( $6,25 \mu\text{g mL}^{-1}$  a  $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), atribuindo esse efeito aos monoterpenos presentes no óleo essencial. Similarmente, Peres et al. (2009) observaram um efeito dose-dependente, diante das células V79, quando se utilizou o óleo essencial extraído das folhas de *Piper gaudichaudianum*.

Existem poucos trabalhos que avaliam a toxicidade dos óleos essenciais contra as células eritrocitárias. Os eritrócitos, também chamados de hemácias ou glóbulos vermelhos, são células desprovidas de núcleo e organelas, sendo constituídas basicamente de globulina e hemoglobina. As membranas eritrocitárias são muito úteis no estudo da interação de fármacos e cosméticos com sistemas biológicos, devido elas serem de fácil obtenção e isolamento, por punção intravenosa e posterior centrifugação (MALHEIROS; MEIRELLES; DE

PAULA, 2000). Tariku et al. (2011), avaliando o potencial hemolítico dos óleos essenciais de *Artemisia absinthium* L. e *Echinops kebericho* Mesfin, observaram que eles apresentaram lise em 50% das células eritrocitárias nas concentrações de  $1,52 \mu\text{L L}^{-1}$  e  $2,62 \mu\text{L L}^{-1}$ . Para os óleos essenciais de *Artemisia abyssinica* e de *Satureja punctata* ssp. *Punctata*, o mesmo autor, em 2010, encontrou atividades hemolíticas nas concentrações de  $0,35 \mu\text{L L}^{-1}$  e  $1,52 \mu\text{L L}^{-1}$  respectivamente (TARIKU et al., 2010).

Estudos com esses métodos de avaliação da toxicidade de biomateriais demonstraram que os testes com culturas celulares podem ser utilizados com sucesso, pois são reprodutíveis, rápidos, sensíveis e financeiramente acessíveis para a execução do estudo de biocompatibilidade *in vitro* (ROGERO et al., 2003).

#### **2.3.4 Potencial antioxidante dos óleos essenciais**

Há algum tempo há um grande interesse no estudo dos antioxidantes devido, principalmente, às descobertas sobre o efeito dos radicais livres no organismo. Muitas doenças crônicas e degenerativas, como câncer, doenças cardiovasculares, aterosclerose, Alzheimer e também o envelhecimento estão sendo diretamente associados aos danos causados pelos radicais livres e outros oxidantes (SOUSA et al., 2007).

A produção dos antioxidantes pelo corpo ou aqueles naturais adquiridos na dieta são as principais maneiras de combater o excesso de radicais livres no organismo. Segundo Andrade et al. (2007), denominam-se antioxidantes as substâncias que retardam ou previnem significativamente a oxidação de lipídios ou outras moléculas, ao inibirem a iniciação ou a propagação da reação de oxidação em cadeia, além de prevenirem ou repararem danos ocasionados às células pelas espécies reativas de oxigênio. Um maior interesse pelo estudo dos

antioxidantes naturais vem ocorrendo nos últimos anos, pois além de serem saudáveis, nas indústrias alimentícias, eles evitam o processo de oxidação lipídica, responsável pela formação de compostos indesejáveis. Diante disso muitas substâncias naturais produzidas pelas plantas, como os óleos essenciais, têm apresentado um grande potencial antioxidante, demonstrando resultados promissores (ANDRADE et al., 2013; LIMA et al., 2012; GUIMARAES et al., 2011).

Guimarães et al. (2011), empregando a técnica de hidrodestilação para a extração do óleo essencial de capim-limão, avaliaram sua capacidade antioxidante e do componente majoritário, citral, por meio dos métodos de redução do radical livre DPPH e o ensaio de oxidação do sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico. Tanto o óleo essencial quanto o padrão citral apresentaram pequena atividade antioxidante perante a primeira metodologia; no entanto, perante a segunda metodologia, esses compostos apresentaram atividades antioxidantes significativas. Isso se deve, de acordo com Kulisic et al. (2004), a compostos que apresentam o grupo aldeído (CHO) em sua estrutura, uma vez que compostos com valores intermediários de polaridades são menos diluídos na fase aquosa da emulsão, estando, assim, em maior concentração juntos à fase lipídica, sendo, dessa maneira, mais efetivos na proteção do ácido linoleico.

Estudando a atividade antioxidante dos óleos essenciais de *Myristica fragrans* e *Salvia microphylla*, Lima et al. (2012) verificaram que esses apresentaram atividade dose-dependente para o teste do sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico. Já para o teste do radical livre DPPH, os óleos essenciais não apresentaram atividades antioxidantes nas concentrações utilizadas. Segundo os autores, os óleos essenciais geralmente têm baixa solubilidade no meio do DPPH; com isso, tem-se uma dificuldade para avaliação da atividade antioxidante por esse método. Para Mata et al. (2007), essa baixa

atividade ou não atividade perante esse método pode ser também devido aos componentes dos óleos essenciais, monoterpenos ou sesquiterpenos não serem capazes de doar um átomo de hidrogênio ao radical. Esse resultado foi também observado por Andrade et al. (2013) que, avaliando a atividade antioxidante dos óleos essenciais de *Cinnamodendron dinisii* e *Siparuna guianensis*, observaram somente atividade antioxidante perante o método do sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico.

## REFERÊNCIAS

ANDRADE, C.A. et al. Determinação do conteúdo fenólico e avaliação da atividade antioxidante de *Acácia podalyriifolia* A. Cunn. ex G. Don, Leguminosae-mimosoideae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 17, n. 2, p. 231-235, abr./jun. 2007.

ANDRADE, M.A. et al. Antimicrobial activity and chemical composition of essential oil of *Pelargonium odoratissimum*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 21, nº1 p. 47-52, jan./feb. 2011.

ANDRADE, M.A. et al. Óleos essenciais de *Cymbopogon nardus*, *Cinnamomum zeylanicum* e *Zingiber officinale*: composição, atividades antioxidante e antibacteriana. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 43, n. 2, p. 399-408, abr./jun. 2012.

ANDRADE, M. A. et al. Chemical Composition and Antioxidant Activity of Essential Oils from *Cinnamodendron dinisii* Schwacke and *Siparuna guianensis* Aublet. **Antioxidants**, v. 2, p. 384-397, 2013.

BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 46, n. 2, p. 446-475, feb. 2008.

BANDONI, A. L.; CZEPAK, M. P. **Os recursos vegetais aromáticos no Brasil**: seu aproveitamento industrial para a produção de aromas e sabores. Vitória: EDUFES, 2008. 623 p.

BELLETTI, N. et al. Modeling of combined effects of citral, linalool and  $\beta$ -pinene used against *Saccharomyces cerevisiae* in citrus-based beverages subjected to a mild heat treatment. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 136, n. 3, p. 283-289, jan. 2010.

BIZZO, H. R.; HOVELL, A. N.; REZENDE, C. M. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 3, p. 588-594, maio/jun. 2009.

BORGES, A. R. et al. Trypanocidal and cytotoxic activities of essential oils from medicinal plants of Northeast of Brazil. **Experimental Parasitology**, San Diego, v.132, p. 123–128, 2012.

BRAZ FILHO, R. Contribuição da fitoquímica para o desenvolvimento de um país emergente. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 1, p. 229-239, 2010.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 94, n. 3, p. 223-253, Aug. 2004.

CANSIAN, R. L. et al. Atividade antimicrobiana e antioxidante do óleo essência de ho-sho (*Cinnamomum camphora* Ness e Eberm Var. *Linaloolifera fujita*). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 30, n. 2, p. 378-384, abr./jun. 2010.

CHUTIA, M. et al. Antifungal activity and chemical composition of *Citrus reticulata* Blanco essential oil against phytopathogens from North East India. **LWT-Food Science and Technology**, Zurich, v. 42, n. 3, p. 777-780, apr. 2009.

DAGUANO, J. K. M. F.; SANTOS, C.; ROGERO, S. O. Avaliação da Citotoxicidade de Biocerâmicas Desenvolvidas para uso em Sistemas de Implantes. **Matéria**, v. 12, n. 1, p.134-139, 2007.

DEMYTTENAERE, J. C. R.; VANOVERSCHELDE, J.; DE KIMPE, N. Biotransformation of (R)-(+)- and (S)-(-)-citronellol by *Aspergillus* sp. and *Penicillium* sp. and the use of solid phase microextraction for screening. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1027, n. 1-2, p. 137-146, feb. 2004.

DEWICK, P. M. **Medicinal natural products – A biosynthetic approach**. 2<sup>a</sup>. ed. Hoboken, USA: John Wiley & Sons, 2002. 507 p.

DIAS, L. C. et al. Quimioterapia da doença de chagas: estado da arte e perspectivas no desenvolvimento de novos fármacos. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 9, p. 2444-2457, 2009.

ENGELS, D.; SAVIOLI, L. Reconsidering the underestimated burden caused by neglected tropical diseases. **Trends in Parasitology**, Oxford, v.22, p. 363-366, 2006.

GELB, M. H.; HOL, W. G. Parasitology. Drugs to combat tropical protozoan parasites. **Science**, New York, v.297, p. 343–344, 2002.

GUIMARÃES, L. G. L. et al. Atividades antioxidante e fungitóxica do óleo essencial de capim-limão e do citral. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 42, n.2, p. 464-472, abr./jun., 2011.

GOBBO-NETO, L; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 2, p. 374-381, mar./apr. 2007.

KAYSER, O.; KIDERLEN, A.F.; CROFT, S.L. Natural products as antiparasitic drugs. **Parasitology Research**, Berlin, v. 90, p. S55–S62, 2003.

KAUDERER, B. et al. Evaluation of the mutagenicity of beta-myrcene in mammalian cells *in vitro*. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, New York, v.18, p.28–34, 1991.

KULISIC, T. et al. Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil. **Food Chemistry**, London, v. 85, p.633–640, 2004.

LADANIYA, M. S. **Citrus fruit biology, technology and evaluation**. 1<sup>st</sup> ed. San Diego: Academic Press, 2008. 558 p.

LIMA, R. K. et al. Bactericidal and Antioxidant Activity of Essential Oils from *Myristica fragrans* Houtt and *Salvia microphylla* H.B.K. **Journal of the American Oil Chemists Society**, Chicago, v.89, p.523–528, 2012.

MACIEL, M. A. M. et al. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, São Paulo, v.25, p.429-438, 2002.

MALHEIROS, S. V. P.; MEIRELLES, N. C.; DE PAULA, E. Pathways involved in trifluoperazine, dibucaine and praziquantel induced hemolysis. **Biophysics Chemistry**, v.83, p.89-100, 2000.

MATA, A.T. et al. Antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of five plants used as portuguese food spices. **Food Chemistry**, London, v.103, p.778–786, 2007.

MILLEZI, A. F. et al. In vitro antimicrobial properties of plant essential oils *Thymus vulgaris*, *Cymbopogon citratus* and *Laurus nobilis* against five important foodborne pathogens. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 32, n.1, p.167-172, jan./mar. 2012.

NASCIMENTO, F. R. et al. Efeito do óleo essencial de pimenta longa (*Piper hispidinervum* C. DC) e do emulsificante Tween®80 sobre o crescimento micelial de *Alternaria alternata* (Fungi: Hyphomycetes). **Acta Amazônica**, Manaus, v. 38, n. 3, p. 503-508, jul. 2008.

PARK, M. J. et al. Antifungal activities of the essential oils in *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. Et Perry and *Leptospermum petersonni* Bailey and their

constituents against various dermatophytes. **Journal Microbiology**, Seoul, v. 45, n. 5, p. 460-465, oct. 2007.

PATIL, J. R. et al. Apoptosis-mediated proliferation inhibition of human colon cancer cells by volatile principles of *Citrus aurantifolia*. **Food Chemistry**, London, v. 114, p.1351–1358, 2009.

PÉRES, V. F. et al. Chemical composition and cytotoxic, mutagenic and genotoxic activities of the essential oil from *Piper gaudichaudianum* Kunth leaves. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v.47, p. 2389–2395, 2009.

PIZZOLATTI, M.G. et al. Trypanocidal activity of extracts from Brazilian Atlantic rain forest plant species. **Phytomedicine**, Jena, v.9, p. 422-426, 2002.

PONCE, A. G. et al. Natural essentials oils as reducing agents of peroxidase activity in leafy vegetables. **LWT-Food Science and Technology**, Zurich, v. 37, n. 2, p. 199-204, Mar. 2004.

ROGERO, S. O. et al. Teste in vitro de Citotoxicidade: Estudo Comparativo entre Duas Metodologias. **Materiais Research**, São Carlos, v. 6, n.3, p.317-320, june 2003.

ROGERO, S. O. et al. Cytotoxicit due to corrosion of ear piercing studs. **Toxicology in vitro**, Oxford, v. 14, p. 497-504, 2000.

SANTORO, G. F. et al. Effect of oregano (*Origanum vulgare* L.) and thyme (*Thymus vulgaris* L.) essential oils on *Trypanosoma cruzi* (Protozoa: Kinetoplastida) growth and ultrastructure. **Parasitology Research**, Berlin, v.100, p. 783–790, 2007a.

SANTORO, G. F. et al. *Trypanosoma cruzi*: activity of essential oils from *Achillea millefolium* L., *Syzygium aromaticum* L. and *Ocimum basilicum* L. on epimastigotes and trypomastigotes. **Experimental Parasitology**, San Diego, v. 116, p. 283-290. 2007b.

SANTORO, G. F. et al. Anti-proliferative effect of the essential oil of *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf (lemongrass) on intracellular amastigotes, bloodstream trypomastigotes and culture epimastigotes of *Trypanosoma cruzi* (Protozoa: Kinetoplastida). **Parasitology**, Cambridge, v.134, p.1649–1656, 2007c.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre: Ed. da UFRGS, 2007. 1104 p.

SOUSA, C. M. M. et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 2, p. 351-355, 2007.

SOUZA, S. P. et al. Óleo essencial de *Baccharis tridentata* Vahl: composição química, atividade antioxidante e fungitóxica, e caracterização morfológica das estruturas secretoras por microscopia eletrônica de varredura. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.13, nº4, p.456-466, 2011.

TARIKU, Y. et al. Essential Oil Composition, Antileishmanial, and Toxicity Study of *Artemisia abyssinica* and *Satureja punctata* ssp. *punctata* from Ethiopia. **Chemistry & Biodiversity**, Zurich, v.7, p. 1009-1018, 2010.

TARIKU, Y. et al. In vitro Evaluation of Antileishmanial Activity and Toxicity of Essential Oils of *Artemisia absinthium* and *Echinops kebericho*. **Chemistry & Biodiversity**, Zurich, v.8, p. 614-623, 2011.

TAVARES, A. C. et al. Essential oils from *Distichoselinum tenuifolium*: Chemical composition, cytotoxicity, antifungal and anti-inflammatory properties. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 130, p. 593-598, 2010.

TAVARES, A. C. et al. Essential oil of *Daucus carota* subsp. *halophilus*: Composition, antifungal activity and cytotoxicity. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 119 129–134, 2008.

VIEIRA, S. S. et al. Composição química e atividade fungitóxica do óleo essencial de *Ageratum conyzoides* L. (Mentrasto). **Magistra**, Cruz das Almas-BA, v. 24, nº 1, p. 55-62, jan./mar. 2012.

VIUDA-MARTOS, M. et al. Antifungal activity of lemon (*Citrus lemon* L.), mandarin (*Citrus reticulata* L.), grapefruit (*Citrus paradisi* L.) and orange (*Citrus sinensis* L.) essential oils. **Food Control**, Guildford, v. 19, n.11 p. 1130-1138, Nov. 2008.

ZACARONI, L. M. et al. Potencial Fungitóxico do óleo essencial de *Piper hispidinervum* (pimenta Longa) sobre os fungos fitopatogênicos *Bipolaris sorokiniana*, *Fusarium oxysporum* e *Colletotrichum gloesporioides*. **Acta Amazônica**, Manaus, v. 39, n. 1, p. 193-198, mar. 2009.

**SEGUNDA PARTE - ARTIGOS**

**ARTIGO 1**

**USE OF ESSENTIAL OILS OF THE GENUS *CITRUS* AS  
BIOCIDAL AGENTS**

**Publicado:**

GOMES M. S.; CARDOSO M. G.; SOARES M. J.; BATISTA L. R.;  
MACHADO S. M. F.; ANDRADE M. A.; AZEREDO C. M. O.; RESENDE J.  
M. V.; RODRIGUES L. M. A. **American Journal of Plant Science**, v. 5, p.  
299-305, feb. 2014.

## RESUMO

Atualmente a utilização de produtos naturais com propriedades terapêuticas vem sendo largamente empregada no desenvolvimento de novos fármacos. Neste contexto os óleos essenciais extraídos das cascas de frutos do gênero *Citrus* se destacam devido à presença na sua constituição de compostos biologicamente ativos. No presente estudo foram caracterizados e quantificados quimicamente os óleos essenciais das cascas de frutas de três espécies do gênero *Citrus*; limão-taiti (*Citrus aurantifolia*), limão-verdadeiro (*Citrus limon*) e laranja (*Citrus sinensis*), bem como avaliaram-se, juntamente com os padrões limoneno, citral e sua mistura (limoneno + citral), suas atividades antitripanossoma, antifúngica (*Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus* e *Aspergillus carbonarius*) e antibacteriana (*Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella choleraesuis*, *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus*). Para avaliar o efeito sobre a forma epimastigota do *Trypanosoma cruzi* as concentrações testadas dos seis tratamentos foram (500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,63; 7,81  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) e para avaliar a atividade antibacteriana e antifúngica as concentrações foram (500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,63; 7,81 e 3,91  $\mu\text{L mL}^{-1}$ ). A identificação e quantificação química dos três óleos essenciais por cromatografia em fase gasosa acoplada a um espectrômetro de massas (CG/EM e CG/DIC) mostraram que o composto limoneno foi o componente majoritário, estando ele em maior quantidade no óleo essencial de laranja (76,0%), seguido do limão-verdadeiro (52,6%) e limão-taiti (52,1%). Verificou-se por meio da atividade antitripanossoma que o efeito dos seis tratamentos frente à forma epimastigota foi fraco, sendo os padrões limoneno e citral os mais eficazes. Observou-se também que à medida que aumentou a concentração de todos os tratamentos a porcentagem da inviabilidade das células epimastigotas aumentou. Em relação à atividade antimicrobiana os resultados foram satisfatórios, exceto para a bactéria *P. aeruginosa* que não apresentou inibição a nenhum tratamento utilizado e para o óleo essencial de laranja que não mostrou atividade inibitória frente a nenhuma das bactérias utilizadas.

Palavras-chave: Gênero *Citrus*. Óleos essenciais. Atividade antitripanossoma. Atividade antibacteriana. Atividade antifúngica.

## ABSTRACT

Currently the use of natural products with therapeutic properties have been widely used in the development of new drugs. In this context the essential oils extracted from fruit peel of the genus *Citrus* are highlighted due to the presence of biologically active compounds. In this study were chemically characterized and quantified the essential oils from fruit peels of three species of the genus *Citrus*; lime (*Citrus aurantifolia*), lemon (*Citrus limon*) and orange (*Citrus sinensis*). In addition evaluate with the standard limonene, citral and its blend (limonene + citral), the activities, anti-trypanosome, antifungal (*Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus* e *Aspergillus carbonarius*) and antibacterial (*Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella choleraesuis*, *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus*). To evaluate the effect on epimastigote form of *Trypanosoma cruzi* the concentrations tested were (500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.63, 7.81 mg mL<sup>-1</sup>) and to evaluate the antibacterial and antifungal the concentrations were (500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.63, 7.81, 3.91 µL mL<sup>-1</sup>). The identification and quantification of chemical three essential oils by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC/MS and GC/FID) showed that the compound was the major component limonene. There was a higher amount of it in the essential oil of orange (76.0%), followed by lemon (52.6%) and lime (52.1%). Was verified that the activity to anti-trypanosomal effect of the six treatments front of the epimastigote form was low, and the standard limonene and citral the most effective. It was also observed that increasing the concentration of all treatments the percentage of cells infeasibility epimastigotes increased. In relation to antimicrobial activity results were satisfactory, except for the bacterium *P. aeruginosa* which showed no inhibition of any treatment used and the essential oil of orange showed no inhibitory activity against any of the bacteria used.

Keywords: Genus *Citrus*. Essential oils. Anti-trypanosoma activities. Antibacterial. Antifungal activities.

## 1 INTRODUCTION

Human civilization have been using plants with therapeutic properties for centuries and these natural products nowadays have been used in the development of new drugs in the Pharmaceutical area. Among the compounds used to produce these drugs the secondary metabolites have been raised as one of the most important molecules. In this context, we highlight the essential oils, which are mixtures of several volatile compounds being insoluble in water, soluble in organic solvents and showing great therapeutic importance (SIMÕES et al., 2007).

In recent decades, the antimicrobials of traditional plants have received great attention due to resistance to commercial antibiotics developed by some microorganism (KAMRAN et al., 2012; SANTOS et al., 2012). An alternative to reduce the microorganism growth is using essential oils with antifungal and antibacterial properties (ANDRADE et al., 2012; GOMES et al., 2013; OKUNOWO et al., 2013; PIMENTEL et al., 2010). It has been reported that the antimicrobial properties of essential oils are due to hydrophobic characteristic of the chemical constituents of their composition (BAKKALI et al., 2008). The lipophilicity of the essential oil allows interaction among their constituents with lipids in the cell membrane, affecting the cell permeability and causing changes in cell structure (COSTA et al., 2011).

Despite recent advances in antimicrobial chemotherapy, the treatment of parasitic diseases has remained as a public health problem highlighting the Chagas disease (ANTHONY; FYFE; SMITH, 2005). This disease is caused by the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*, causing approximately 50,000 deaths per year (ENGELS and SAVIOLI, 2006). In recent years, the use of essential oils has acquired great importance for the treatment of parasitic diseases

(SANTORO et al., 2007a; SANTORO et al., 2007b).

The development of new effective drugs against parasitic disease (i.e. Chagas disease) has been aimed for several researchers, because most of the synthetic compounds used to treat these parasitic diseases produce toxicity and side effects for the patients. Moreover, there has been a need to find more effective compounds with anti-microbial effect to reduce the contamination and deterioration of food.

Thus, in this study we aimed to characterize and chemically quantify the essential oils extracted from the peels of lime (*Citrus aurantifolia*), limon (*Citrus limon*) and orange (*Citrus sinensis*), as well as to evaluate, with standards limonene, citral and limonene + citral, the anti-trypanosome, antifungal and antibacterial activities.

## 2 MATERIAL AND METHODS

### 2.1 Collect of the vegetal material and extraction of the essential oil

The vegetal materials, lime (*C. aurantifolia*), lemon (*C. limon*) and orange (*C. sinensis*), were collected on a rural area of Lavras city in the morning during the months of March and April 2012, at coordinates 21°26'27 south and 44°39'27 west, with an altitude of 1049 meters.

The extraction process of the essential oils was performed at Laboratory of Organic Chemistry of the Department of Chemistry at Federal University of Lavras. The method used was the hydrodistillation, using a modified Clevenger device (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2000). Extractions were performed in triplicate for a period of 2 hours and their yields have been calculated on moisture free basis. Moisture was performed using the technique described by Pimentel et al. (2010), using the Dean Stark type glass collector. The humidity was calculated considering the water content in 100 g of sample.

### 2.2 Chemical Identification and quantification of the essential oils

The quantitative analysis and the identification of constituents of the essential oils were performed at the Department of Chemistry at Federal University of Sergipe. The quantitative analyses of the reaction mixture were performed in a gas chromatography equipped with a flame ionization detector (Shimadzu GC-17A), under the following operational conditions: fused silica capillary column ZB-5MS (5% dimethylpolysiloxane) with 30 m x 0.25 mm i.d. x 0.25 µm of film, using He as gas carrier with flow of 1.2 mL min<sup>-1</sup>. The temperature was kept at 50°C for 2 minutes, and later increased 4°C min<sup>-1</sup>, up to

reaching 200°C. After that, increased 15°C min<sup>-1</sup>, up to reaching 300°C, keeping this temperature steady for 15 minutes; the temperature of the injector was 250°C and the temperature of the detector (or interface), 280°C. It was injected a volume of 0.5 µL of the reaction mixture dissolved in ethyl acetate. The qualitative analysis of the reaction mixture was performed in gas chromatography coupled to a mass spectrometry GC-MS (Shimadzu, model QP 5050A), equipped with fused silica capillary column (J&W Scientific; 5%-phenyl-95%-dimethyl- polysiloxane) 30 m x 0.25 mm i.d., 0.25 µm of film, using He as gas carrier, with flow of 1.2 mL min<sup>-1</sup>. The chromatographic conditions of the analysis were the same used for GC-FID. The conditions of the MS were detector of ionic capture operating by electronic impact and impact energy of 70 eV; scan rate 1.000; interval of decomposition of 0.50 fragments/s and detected fragments in the stripe from 40 to 500 Da. For the identification of the constituents, it was also used the comparison of their retention indexes with the ones of the literature (ADAMS, 2007). For the retention index, the equation of Van den Dool and Kratz (1963) was used in relation to a homologous series of n-alkanes (nC<sub>9</sub>-nC<sub>18</sub>). Two libraries NIST107 and NIST21 were also used, which allowed comparison of the spectra database with the ones in the libraries.

### **2.3 Evaluation of the anti-trypanosome activity in vitro**

Evaluation of the anti-trypanosome activity of the essential oils, citral and limonene standards and their mixture (limonene + citral) were performed at the Instituto Carlos Chagas / Fiocruz, Curitiba, Paraná. Three-day-old culture epimastigote forms of *Trypanosoma cruzi* strain Dm28c were used in all experiments. The parasites were kept at 28°C in LIT (liver Infusion Tryptose) medium supplemented with 10% fetal calf serum.

The essential oils were initially dissolved in dimethyl sulphoxide

(DMSO) at a concentration of  $100 \text{ mg mL}^{-1}$ . This solution was then dissolved in culture medium to obtain a stock solution at  $1 \text{ mg mL}^{-1}$ . Under this condition, the DMSO was diluted at 0.01%, a concentration that is not toxic for the protozoa. Both solutions were stored at  $-20^{\circ}\text{C}$ . The stock solution was then diluted at different concentrations for the experiments ( $500$ ;  $250$ ;  $125$ ;  $62.5$ ;  $31.25$ ;  $15.63$ ;  $7.81$ ;  $3.91 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) in  $20 \mu\text{L}$  of LIT medium in each well of 96-wells plates. After dilution, it was added  $180 \mu\text{L}$  of culture medium with epimastigote per well, at a concentration of  $1 \times 10^7$  parasites  $\text{mL}^{-1}$ . In control wells were added  $200 \mu\text{L}$  of culture medium with parasites, but without treatment. The plates were incubated for 24 hours at  $28^{\circ}\text{C}$ .

After incubation,  $50 \mu\text{L}$  of MTT (3-(4,5-methyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) solubilized at  $10 \text{ mg mL}^{-1}$  in PBS (phosphate buffered saline, pH 7.2) was added to all wells. The plate was wrapped in aluminum foil and incubated for 3 hours at  $28^{\circ}\text{C}$  (MOSMANN, 1983). After this second incubation,  $50 \mu\text{L}$  of paraformaldehyde (4%) in PBS pH 7.2 were added and the plate was centrifuged at 1700 rpm for 10 minutes. The medium was removed by quickly inverting the plate and the parasites were resuspended by gently tapping the plate. Twenty  $\mu\text{L}$  of SDS (sodium dodecyl sulfate, at 10% in 0.01 M HCl) were added and the plate was incubated at  $37^{\circ}\text{C}$  for 1 hour, or until lysis of all parasites. Subsequently,  $80 \mu\text{L}$  of DMSO were added to all wells to solubilize the formazan crystals, by incubating the plate at  $37^{\circ}\text{C}$  under shaking until complete solubilization of the crystals. The absorbance reading was performed at 550 nm in an ELISA reader.

The percent cell death of epimastigotes (ECD) was determined by the equation  $\% \text{ECD} = [100 (\text{Ac}-\text{As})/\text{Ac}]$ , where ECD% is the percentage of epimastigote cell death, Ac is absorbance of control, and As is absorbance of the sample.

## 2.4 Evaluation of antibacterial and antifungal activities in vitro

Evaluations of antibacterial and antifungal activity of essential oils (from *C. aurantifolia*, *C. limon* and *C. sinensis*), citral and limonene standards and their mixture (limonene + citral) were performed at the Laboratory for Mycotoxin and Mycology, Department of Science food, Federal University of Lavras. The microorganisms used were *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442, *Salmonella cholerasuis* ATCC 6539, *Listeria monocytogenes* ATCC 19117, *Staphylococcus aureus* ATCC 13565, *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus* and *Aspergillus carbonarius*.

The bacteria sensibility against essential oils and their standards was determined using the agar diffusion test. After activation of the bacteria in BHI (Brain Heart Infusion) broth, aliquots of the medium were transferred to a tube containing 5 ml of tryptic soy broth (TSB). The tubes were incubated at 37°C until reaching the turbidity of a McFarland standard solution of 0.5, resulting in a suspension containing  $10^8$  CFU mL<sup>-1</sup>. The turbidity readings were performed using a spectrophotometer (Shimadzu UV-160 PC 1) at a wavelength of 625 nm, according to the standards imposed by the National Committee for Clinical Laboratory Standards (NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS, 2003).

The inoculum concentration obtained by the McFarland standard solution was diluted in TSB to give a concentration of  $10^6$  CFU mL<sup>-1</sup>. This inoculum was subsequently transferred to a Mueller-Hinton agar, by pouring it over a thin layer of agar containing glass beads. After cooling the medium, the beads were removed with help of sterile tweezers, forming wells that were filled with 10 µL of essential oils or their standards diluted in dimethylsulfoxide

(DMSO) at concentrations of 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.63, 7.81 and 3.91  $\mu\text{L mL}^{-1}$ .

As a positive control, 10  $\mu\text{L}$  of chloramphenicol ( $1\text{g L}^{-1}$ ) were placed in a well, while the same amount of dimethylsulfoxide (DMSO) was used as a negative control. The plates were incubated at  $37^{\circ}\text{C}$  for 24 hours and then the circumferences of the halos formed for each treatment were measured. The minimum inhibitory concentration (MIC) was defined as the lowest concentration of the essential oil and standards where an inhibition halo was formed (LIMA et al., 2012).

To evaluate the inhibitory effect on filamentous fungi, we used the disk diffusion test accepted by the U.S. Food and Drug Administration (FDA) and established as standard by the National Committee for Clinical Laboratory Standards (LIMA et al., 2012). A concentration of  $10^6$  spores  $\text{mL}^{-1}$  was used for the experiments, with countings in a Neubauer chamber. This inoculum was transferred to a plate containing malt extract agar (MEA), using the surface scattering technique. Filter paper disks of 6 mm in diameter were placed onto the culture medium and were embedded with 10  $\mu\text{L}$  of essential oils or standards diluted in DMSO, at concentrations of 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.63, 7.81, and 3.91  $\mu\text{L mL}^{-1}$ . As a positive control, 10  $\mu\text{L}$  of 2% hypochlorite ( $1\text{g L}^{-1}$ ) were deposited in a well, while the same amount of DMSO was used as a negative control. The plates were incubated in BOD at  $25^{\circ}\text{C}$  for 72 hours and then the minimum inhibitory concentration (MIC) was defined as the lowest concentration of essential oil where the presence of an inhibition zone could be identified.

## **2.5 Statistics analysis**

For evaluation of the anti-trypanosome in vitro activity the experiments

were arranged in a completely randomized design (CRD) in factorial (6 x 8), 6 samples (3 essential oils, 2 standards and their mixture) and 8 concentrations. Data were submitted to analysis of variance (3 replicates) and quantitative variables with F significance were submitted to regression analysis. Statistical analyzes were performed by using the Statistical Analysis System program of Variance for Balanced Data - Sisvar, according to Ferreira (2008). The IC<sub>50</sub> (concentration effective for 50% growth inhibition of epimastigote cells) was estimated by the regression equation analyzed using the software Origin 8.

### 3 RESULTS AND DISCUSSION

#### 3.1 Yield, identification and chemical quantification of essential oil

The mean values of the essential oil (EO) content of lime, lemon and orange peels in moisture free basis were 2.2%, 2.2% and 1.1%, respectively. The chemical constituents of the essential oils, as analyzed by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC/MS), are shown in Table 1, demonstrating a variety of constituents. These results are in agreement with those of Ladaniya (2008) that described the existence of more than 150 compounds in essential oils of the genus *Citrus*. It was observed in all essential oils that limonene was the major component, with the highest concentration in orange (76.0%), followed by lemon (52.6%) and lime (52.1%). The compound citral (isomeric mixture of geranial and neral) was also found in higher amounts in the essential oils of lemon (13.3%) followed by lime (11.1%). This compound has been found as the main component for the aroma and quality of citrus essential oils Ladaniya (2008).

Table 1 Identification and quantification of peel essential oils from lime, lemon and orange.

<b>Compound</b>	<b>IR cal.</b>	<b>IR lit.</b>	<b>Lime %</b>	<b>Lemon%</b>	<b>Orange %</b>
<b>Triciclene</b>	922	926	2.24	2.35	4.16
<b>Sabinene</b>	975	975	1.51	7.51	2.50
<b><math>\beta</math>-pinene</b>	975	979	6.82	-	6.67
<b>Myrcene</b>	989	990	1.84	1.64	2.92
<b>Octanal</b>	1006	998	-	0.78	1.69
<b>p-cymene</b>	1026	1024	1.17	-	-
<b>Limonene</b>	1031	1029	52.11	52.62	76.00
<b><math>\gamma</math>-terpinene</b>	1060	1059	7.28	3.44	1.89
<b>Linalol</b>	1103	1096	-	2.03	4.17
<b>Terpinen-4-ol</b>	1184	1177	-	1.17	-
<b><math>\alpha</math>-terpineol</b>	1199	1188	2.02	3.05	-
<b>Neral</b>	1241	1238	4.41	5.47	-
<b>Geranial</b>	1271	1267	6.73	7.89	-
<b>Neril acetate</b>	1361	1361	3.14	2.03	-
<b>Geranil Acetate</b>	1380	1381	1.16	1.64	-
<b><math>\alpha</math>-trans-bergamotene</b>	1436	1434	2.22	-	-
<b><math>\beta</math>-bisabolene</b>	1511	1505	4.26	-	-
Total (%)			96.91%	91.62%	100.00%

IR cal. - Kovats index calculated (ADAMS, 2007); IR lit. - Retention index of literature.

### 3.2 Anti-trypanosome activity in vitro

The variance analysis showed significant interaction ( $P < 0.05$ ) among the samples and concentrations. Viability varied significantly among the samples, but for each concentration it could be observed a dose-dependent effect (Figure 1). Regression analysis showed that the  $IC_{50}$  of the standard limonene was the lowest ( $308.0 \text{ mg mL}^{-1}$ ) followed by citral ( $323.0 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ ), the mixture ( $379.6 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ ), the orange EO ( $560.8 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ ), the lime EO ( $584.5 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ ) and finally the lemon EO ( $618.5 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ ). According to standards proposed by Muthaura et al. (2007), the trypanocidal activity found was absent, since an  $IC_{50}$  value less than  $10 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$  can be considered high activity, between 10 and  $20 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$  can be considered moderate and between 20 and  $100 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$  can be considered weak. The standards and their mixture presented similar  $IC_{50}$  values and a synergistic effect could not be observed between citral and limonene. However, the isolated constituents were more active than the essential oils.

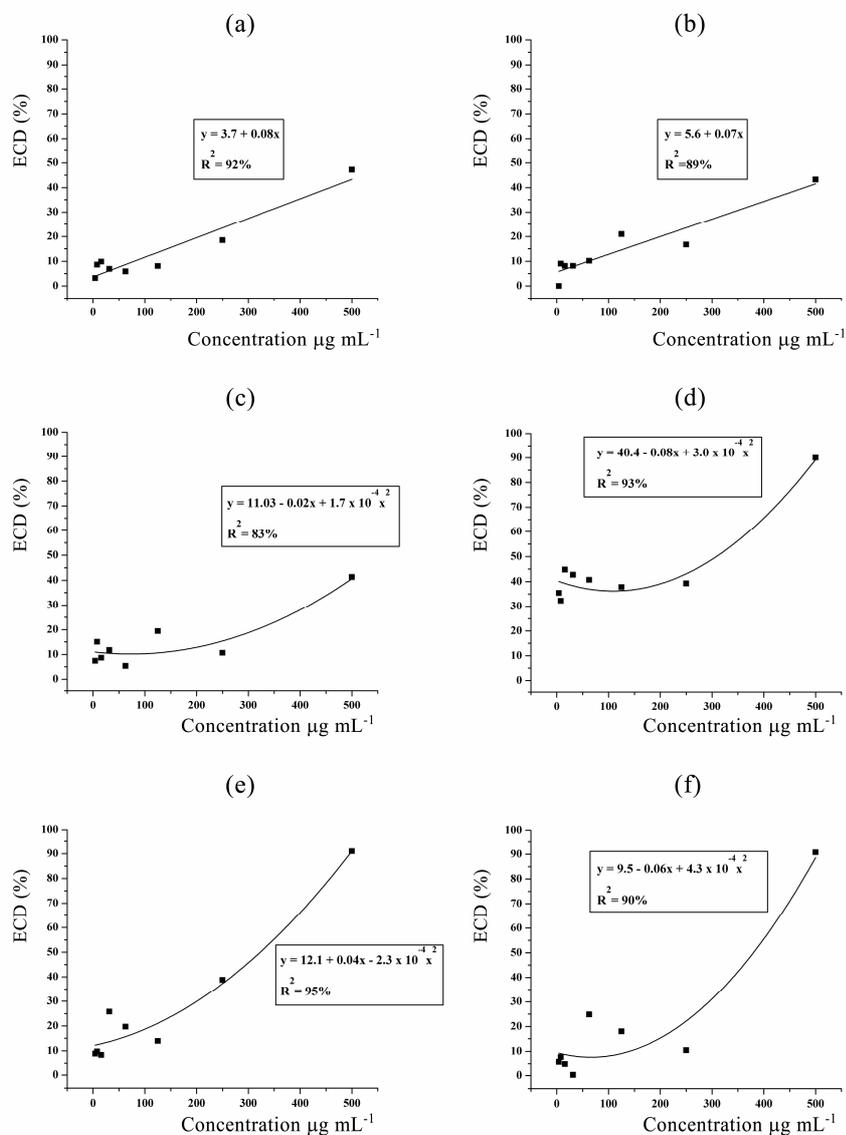


Figure 1 Anti-trypanosome activity of three essential oils of the genus *Citrus* and the standards citral, limonene and the mixture (limonene + citral) on *T. cruzi* epimastigote forms. (a) Lime (b) Lemon (c) Orange (d) Limonene (e) Citral and (f) mixture (limonene + citral).

Legend: ECD% = Percentage of epimastigotes cell death.

In accordance to our results, Santoro et al. (2007a) noted a dose-dependent effect when analyzing the activity of the essential oils of clove, basil, yarrow and their major constituents (eugenol and linalool) against epimastigote form of *T. cruzi*. The authors also observed that the trypanocidal activity was weak, with IC<sub>50</sub> of the five treatments varying from 99.5 to 246.0 mg mL<sup>-1</sup>. In another work, Santoro et al. (2007b) found similar results using the essential oil of *Cymbopogon citratus* and its major component citral, obtaining a dose-dependent effect. Some studies have shown that essential oils have effects against all three forms of *T. cruzi* and this is probably due to essential oil properties such as low density and lipid solubility, which enable them to diffuse across cell membranes and break layers of polysaccharides, fatty acids and phospholipids, while also affecting some organelles and some cytoplasmic metabolic pathways (BAKKALI et al., 2008; SANTORO et al., 2007b; SANTOS et al., 2012).

### **3.3 Antimicrobial activity in vitro**

Regarding antibacterial activity, as observed by the MIC, the treatments with citral, mixture of limonene + citral, and the essential oils of lime and lemon resulted in similar satisfactory inhibitory effect against the bacteria *S. aureus*, *L. monocytogenes* and *S. cholerasuis*. However, the essential oil of lime showed no inhibition against the bacteria *S. cholerasuis*, while the standard limonene and the orange essential oil showed inhibition only for the bacterium *S. aureus*. Among all bacteria studied *P. aeruginosa* was the most resistant against the treatments, with no inhibitory activity. The negative control, the diluent DMSO, showed no interference in activity of essential oils and standards, without inhibition halo formation. As for the positive control, chloramphenicol (1g L<sup>-1</sup>),

there was inhibition halo formation, which was greater than the halos in the treatments tested (Table 2).

Table 2 Minimum inhibitory concentration of essential oils of lime, lemon, orange and the standards citral, limonene and limonene + citral against microorganisms *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *P. aeruginosa* and *S. cholerasuis*

Bacterium	IMC ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )					
	LI	LE	OR	C	L	C+L
<i>S. a.</i>	7.81	7.81	NI	3.91	500	3.91
<i>L. m.</i>	3.91	3.91	NI	3.91	NI	3.91
<i>P. a.</i>	NI	NI	NI	NI	NI	NI
<i>S. c.</i>	NI	62.50	NI	15.62	NI	15.62

Legend: NI = no inhibition; LI = Lime; LE = Lemon; OR = Orange; C = Citral; L = Limonene; *S.a.* = *S. aureus*; *L.m.* = *L. monocytogenes*; *P.a.* = *P. aeruginosa*; *S.c.* = *S. cholerasuis*.

Several studies have investigated the action of essential oils on Gram-positive and Gram-negative bacteria, indicating that they are more active against Gram-positive bacteria (Andrade et al., 2012). Accordingly, we found that Gram-positive bacteria (*S. aureus* and *L. monocytogenes*) were more susceptible to treatment than Gram-negative bacteria. This could be explained because Gram-negative species have an outer membrane that provides a surface hydrophilicity due to the presence of lipopolysaccharides, thus hindering the access of essential oils, which are mostly constituted of hydrophobic compounds (BURT, 2004).

When analyzing the essential oil of the peels of *Citrus limon*, *C. paradisi*, *C. bergamia*, *C. aurantium*, *C. sinensis* and *C. reticulata* Kirbaslar et al. (2009) found limonene as the major component. The authors evaluated the antimicrobial activity of these essential oils against 9 bacteria and found a strong

antibacterial activity activity, more prominent for the essential oil extracted from lemon peels.

Table 3 shows the antifungal activity against three fungi, *Aspergillus niger*, *A. flavus* and *A. carbonarius*, using the disk diffusion method. It was observed through the IMCs that the essential oils of lemon, lime, orange, as well as limonene, citral and the mixture of limonene + citral had similar IMCs values. This might be due to the similar chemical composition of these essential oils, which show high a concentration of limonene.

Table 3 Minimum inhibitory concentration of essential oils of lime, lemon, orange and the standards citral, limonene and limonene + citral against microorganisms *A. niger*, *A. flavus* and *A. carbonarius*

Fungo	IMC ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )					
	LI	LE	OR	C	L	C+L
<i>A.n.</i>	62.5	62.5	500	3.91	500	3.91
<i>A.f.</i>	500	500	250	62,5	62.5	62.5
<i>A.c.</i>	62.5	125	500	3.91	500	3.91

Legend: LI = Lime; LE = Lemon; OR = Orange; C = Citral; L = Limonene; *A. n.* = *A. niger*; *A. f.* = *A. flavus*; *A. c.* = *A. carbonarius*

Similarly to the results of antibacterial activity, we observed that for the antifungal activity there was no synergistic effect between the standards limonene and citral, since the effect did not increase with the combination. Several studies have reported interactions among substances aiming to potentiate the desired effect (synergism) or decrease it (antagonism). According to Deba et al. (2008) the antimicrobial activity of essential oils is probably due to the presence of a single compound, or synergism, or antagonism among several compounds. To verify the antimicrobial effect against the *S. cerevisiae* yeast, Belletti et al. (2010) used a combination of the compounds citral, linalool and  $\beta$ -

pinene. They found that the antimicrobial activity of these three terpenes increased when they were combined.

#### 4 CONCLUSIONS

The major compound of essential oils from peels of three species of the genus *Citrus* was limonene, with 52.1% for lime essential oil, 52.6% for the lemon essential oil and 76.0% for the orange essential oil.

The essential oils of lime, lemon and orange, the limonene and citral standards, and standard mixture (limonene + citral) showed no trypanocidal activity. However, the antimicrobial activity against the bacteria *S. aureus*, *L. monocytogenes* and *S. choleraesuis* was satisfactory.

**REFERENCES**

ADAMS, R. P. **Identification of essential oils components by gas chromatography/mass spectroscopy**. 4th ed. Carol Stream: Allured, 2007. 804 p.

ANDRADE, M.A. et al. Óleos essenciais de *Cymbopogon nardus*, *Cinnamomum zeylanicum* e *Zingiber officinale*: composição, atividades antioxidante e antibacteriana. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 43, n. 2, p. 399-408, abr-jun, 2012.

ANTHONY, J.P.; FYFE, L.; SMITH, H. Plant active components - a resource for antiparasitic agents? **Trends in Parasitology**, Cambridge, v. 21, p. 462-468, 2005.

BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 46, n. 2, p. 446-475, Feb. 2008.

BELLETTI, N. et al. Modeling of combined effects of citral, linalool and  $\beta$ -pinene used against *Saccharomyces cerevisiae* in citrus-based beverages subjected to a mild heat treatment. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 136, n. 3, p. 283-289, Jan. 2010.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 94, n. 3, p. 223-253, Aug. 2004.

COSTA, A. R. T. et al. Ação do óleo essencial de *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L.M. Perry sobre as hifas de alguns fungos fitopatogênicos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 13, n. 2, p. 240-245, 2011.

DEBA, F. et al. Chemical composition and antioxidant, antibacterial and antifungal activities of the essential oils from *Bidens pilosa* Linn. Var. Radiata. **Food Control**, Guildford, v. 19, n. 4, p. 346-352, Apr. 2008.

ENGELS, D.; SAVIOLI, L. Reconsidering the underestimated burden caused by neglected tropical diseases. **Trends in Parasitology**, Cambridge, v. 22, p.

363-366, 2006.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2000. 4ª ed., parte I, Ateneu: São Paulo, p.2-7.

FERREIRA, D. F. SISVAR: um programa para análises e ensino de estatística. **Revista Científica Symposium**, Lavras, v.6, n.2, p. 36-41, jul./dez. 2008.

GOMES, M. S. et al. Multivariate analysis of the essential oil components of the genus *Citrus* and their antifungal activity. **Científica**, Jaboticabal, v. 41, nº 2, p.111-121, 2013.

KAMRAN, A. et. al. Therapeutic effects of essential oil from waste leaves of *Psidium guajava* l. against cosmetic embarrassment using phylogenetic approach. **American Journal of Plant Sciences**, Delaware, v.3, n. 6, p.745-752, 2012.

KIRBASLAR, F. G. et al. Antimicrobial activity of Turkish *Citrus* peel oils. **Pakistan Journal of Botany**, Karachi, v. 41, n. 6, p. 3207-3212, Dec. 2009.

LADANIYA, M. S. **Citrus fruit biology, technology and evaluation**. 1<sup>st</sup> ed. San Diego: Academic Press, 2008. 558 p.

LIMA, R. K. et al. Bactericidal and Antioxidant Activity of Essential Oils from *Myristica fragrans* Houtt and *Salvia microphylla* H.B.K. **Journal of the American Oil Chemists Society**, Chicago, v.89, p.523–528, 2012.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunology Methods**, Amsterdam, v. 65, p. 55–63, 1983.

MUTHAURA, C. N. et al. Antimalarial activity of some plants traditionally used in treatment of malaria in Kwale district of Kenya. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v.112, n.3, p. 545-551, 2007.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically**: approved standard. 6. ed. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2003, v. 23, n. 2 (Replaces M7-A6).

OKUNOW, W. et al. Essential Oil of Grape Fruit (*Citrus paradisi*) Peels and Its Antimicrobial Activities. **American Journal of Plant Sciences**, Delaware, v. 4, n. 7, p. 1-9, 2103.

PIMENTEL, F. A. et al. Ação fungitóxica do óleo essencial de *Tanaecium nocturnum* (Barb. Rodr.) Bur. e K. Shum sobre o *Aspergillus flavus* isolado da castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa*). **Acta Amazônica**, Manaus, v. 40, n. 1, p. 213-220, mar. 2010.

SANTORO, G. F. et al. Effect of oregano (*Origanum vulgare* L.) and thyme (*Thymus vulgaris* L.) essential oils on *Trypanosoma cruzi* (Protozoa: Kinetoplastida) growth and ultrastructure. **Parasitology Research**, Berlin, v.100, p. 783-790, 2007a.

SANTORO, G.F. et al. Anti-proliferative effect of the essential oil of *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf (lemongrass) on intracellular amastigotes, bloodstream trypomastigotes and culture epimastigotes of *Trypanosoma cruzi* (Protozoa: Kinetoplastida). **Parasitology**, Cambridge, v.134, p.1649–1656, 2007b.

SANTOS, T. G. et al. Composição química e avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial das folhas de *Piper malacophyllum* (C. Presl.) C. DC. **Química Nova**, São Paulo, v. 35, n. 3, p. 477-481, 2012.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia**: da planta ao medicamento. 6. ed. Porto Alegre: Ed. da UFRGS, 2007. 1104 p.

## ARTIGO 2

### ATIVIDADES CITOTÓXICA E HEMOLÍTICA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DO GÊNERO *CITRUS* E DOS PADRÕES LIMONENO E CITRAL

## RESUMO

O Brasil é um dos principais produtores de óleos essenciais do mundo e isso se deve principalmente àqueles provenientes das cascas de frutas do gênero *Citrus*. No presente estudo, avaliaram-se as atividades citotóxica e hemolítica dos óleos essenciais das cascas de frutas de três espécies do gênero *Citrus*; limão-taiti (*Citrus aurantifolia*), limão-verdadeiro (*Citrus limon*) e laranja (*Citrus sinensis*) e dos padrões limoneno, citral e sua mistura (limoneno + citral). Para avaliar a atividade citotóxica diante das células Vero as concentrações testadas dos seis tratamentos foram (1000; 500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,63; 7,81  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) e, para avaliar a atividade hemolítica (hematócrito 0,15%), as concentrações foram (0,6; 1,0; 2,0; 4,0; 5,0 e 10,0  $\mu\text{L mL}^{-1}$ ). Adicionalmente ao teste hemolítico, foram realizadas varreduras nos comprimentos de onda de 500 a 700 nm para avaliar se houve oxidação da hemoglobina. Como observado em trabalhos anteriores, os três óleos essenciais apresentaram predominantemente o composto limoneno como componente majoritário. Observou-se, por meio da atividade citotóxica que os seis tratamentos apresentaram efeitos elevados, observando em todos um efeito dose-dependente, ou seja, à medida que aumentou a concentração, a citotoxicidade aumentou. No ensaio de atividade hemolítica, os padrões (citral e limoneno) e sua mistura (citral + limoneno) apresentaram maiores efeitos em baixas concentrações, seguido dos três óleos essenciais. Percebeu-se também que os seis tratamentos apresentaram efeito oxidante na hemoglobina, sendo mais intenso para as concentrações mais elevadas.

Palavras-chave: Cítricos. Limoneno. Citral. Citotoxicidade. Hemólise.

## ABSTRACT

Brazil is among the leading producers of essential oils in the world and this is mainly due to the peel from fruits of the genus *Citrus*. In the present study evaluated the cytotoxic and hemolytic activities of the essential oils of peel of three species of the genus *Citrus*; lime (*Citrus aurantifolia*), lemon (*Citrus limon*) and orange (*Citrus sinensis*), and the standards, limonene citral and its mixture (limonene + citral). To evaluate the cytotoxic activity to Vero cells facing the tested concentrations of the six treatments (1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.63, 7.81  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) and to evaluate the activity hemolytic (0.15% hematocrit) concentrations were (0.6, 1.0, 2.0, 4.0, 5.0, 10.0  $\mu\text{L mL}^{-1}$ ). In addition to the hemolytic test scans were conducted at a wavelength of 500 to 700nm to evaluate if there was hemoglobin oxidation. As noted in previous work the three essential oils showed predominantly the compound limonene as major component. Was observed that the cytotoxic activity of six treatments showed high effects, observing in all a dose-dependent effect, increasing the concentration increased cytotoxicity. In hemolytic activity the standard (citral and limonene) and its blend (limonene + citral) showed greater effects at low concentrations, followed by three essential oils. We also noticed that the six treatments showed oxidative effect on hemoglobin, being more intense for higher concentrations.

Keywords: Citricos. Limonene. Citral. Cytotoxicity. Hemolysis.

## 1 INTRODUÇÃO

A utilização de produtos naturais com fins medicinais datam desde o início da civilização e, nas últimas décadas, o interesse pelas plantas medicinais tem aumentado o número de investigações sobre seus efeitos biológicos em seres humanos e animais. Segundo a Organização Mundial da Saúde, planta medicinal é todo e qualquer vegetal que possui, em um ou mais órgãos, substâncias que podem ser utilizadas com fins terapêuticos ou que sejam precursores de fármacos semi-sintéticos (VEIGA Jr.; PINTO; MACIEL, 2005).

Existem muitos exemplos de fármacos que foram produzidos por meio de fontes naturais, especialmente de plantas, como a morfina, a vinblastina, a vincristina, entre outros. Atualmente um dos desafios para a química farmacêutica, bioquímica e farmacológica é a elucidação dos componentes ativos nas plantas, bem como seus mecanismos de ação, uma vez que as plantas contêm inúmeros constituintes e, quando testados, podem exibir efeitos sinérgicos ou antagônicos. Entre os produtos naturais que apresentam essas características, os óleos essenciais vêm se destacando devido esses serem misturas complexas de diversos compostos, podendo conter em sua constituição cerca de 20 a 60 componentes em concentrações muito diferentes, apresentando na maioria das vezes dois ou três componentes em concentrações bastante elevadas, ou seja, compostos majoritários (20-70%) (BAKKALI et al., 2008).

Estudos de toxicidade de produtos naturais, como os óleos essenciais, são pouco realizados, principalmente avaliando sua ação em nível celular (PERON et al., 2008). Esses testes citotóxicos *in vitro* com substâncias de

origem vegetal podem fornecer importantes dados sobre seu modo de ação, permitindo, assim, uma análise comparativa fácil em relação às reações das células *in vitro* ao composto em teste e também fácil manutenção dessas culturas, quando comparadas aos animais em laboratório (SIMONI et al., 2002).

Os óleos essenciais do gênero *Citrus* estão entre os mais consumidos e comercializados no mundo, sendo o Brasil um dos principais produtores, devido às indústrias de fabricação de suco (BIZZO; HOVELL; REZENDE, 2009). Embora existam alguns estudos que mostram os efeitos citotóxicos do limoneno (BARDON; PICARD; MARTEL, 1998), componente majoritário da maioria dos óleos essenciais presente nas cascas dos frutos cítricos, existem poucos estudos mostrando o efeito citotóxico dos outros componentes presentes nos óleos essenciais desse gênero (JOMAA et al., 2012).

Neste trabalho objetivou-se avaliar as atividades citotóxica e hemolítica dos óleos essenciais extraídos das cascas do limão-taiti (*Citrus aurantifolia*), do limão-verdadeiro (*Citrus limon*) e da laranja (*Citrus sinensis*), e dos padrões limoneno, citral e sua mistura (limoneno + citral).

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Coleta e preparação do Material Vegetal**

Os materiais vegetais, limão-taiti (*C. aurantifolia*), limão-verdadeiro (*C. limon*) e laranja (*C. sinensis*) foram coletados em uma propriedade próxima à cidade de Lavras, a uma latitude 21°26'27 sul e 44°39'27 oeste, com altitude de 1049 metros. As coletas foram realizadas no período da manhã, em torno das 9 horas, em dias ensolarados e ausentes de chuva. Foram coletados frutos sadios e de aparência perfeita e homogênea. Todo o material coletado foi limpo com papel-toalha, sendo os frutos descascados e as cascas picadas em pedaços pequenos e uniformes. Em seguida, o material foi pesado para o cálculo do rendimento.

### **2.2 Extração do óleo essencial**

O processo de extração dos óleos essenciais foi realizado no Laboratório de Química Orgânica - Óleos essenciais do Departamento de Química da Universidade Federal de Lavras. O método utilizado foi o de hidrodestilação, utilizando um aparelho de Clevenger modificado, acoplado a um balão de fundo redondo com capacidade de 6L (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, ANVISA, 2010).

A extração foi realizada em triplicata por um período de 2 horas, mantendo-se a solução em ebulição. Posteriormente, coletou-se o hidrolato, que

foi centrifugado em centrífuga de cruzeta horizontal a 960 x g por 10 minutos (Fanem Baby®I Modelo 206 BL). Após a centrifugação, o óleo essencial foi retirado com o auxílio de uma micropipeta de Pasteur, acondicionado em frasco de vidro âmbar e armazenado sob refrigeração. Os rendimentos das extrações dos óleos essenciais foram calculados em p/p em base livre de umidade (GUIMARÃES et al., 2008).

### **2.3 Determinação da umidade**

Utilizaram-se 5 g separadamente de cada amostra (três espécies do gênero *Citrus*) em triplicata, emergidas em um balão de fundo redondo (250 mL) contendo 70 mL de cicloexano. Após o processo de destilação, realizado por 2 horas à temperatura de  $100 \pm 5^\circ\text{C}$ , quantificou-se o volume de água presente nas cascas, por meio do coletor de vidro tipo Dean Stark. A umidade foi calculada considerando-se o teor de água contido em 100 g da amostra (PIMENTEL et al., 2010).

### **2.4 Identificação e quantificação química dos óleos essenciais**

A análise quantitativa e a identificação dos constituintes dos óleos essenciais foram realizadas na Universidade Federal de Sergipe (UFS).

As análises quantitativas dos óleos essenciais foram realizadas em um cromatógrafo gasoso equipado com detector de ionização de chamas (DIC) Shimadzu GC-17A, sob as seguintes condições operacionais: coluna capilar de sílica fundida ZB-5MS (5% dimetillpolisiloxano) com 30 m x 0,25 mm i.d. x 0,25 µm de filme, usando He como gás de arraste com fluxo de  $1,2 \text{ mL min}^{-1}$ . A temperatura foi mantida a  $50^\circ\text{C}$  por 2 min, depois aumentada  $4^\circ\text{C min}^{-1}$ , até atingir  $200^\circ\text{C}$ . Em seguida, aumentada  $15^\circ\text{C min}^{-1}$ , até atingir  $300^\circ\text{C}$ , mantendo-

se essa temperatura constante por 15 min; a temperatura do injetor foi 250°C e a temperatura do detector (ou interface), de 280°C. Foi injetado um volume de 0,5 µL da mistura reacional dissolvida em acetato de etila.

A análise qualitativa dos óleos essenciais foi realizada em cromatógrafo a gás acoplado a espectrômetro de massa CG/EM (Shimadzu, modelo QP 5050A), equipado com coluna capilar de sílica fundida (J&W Scientific) 5%-phenyl-95%-dimetilpolisiloxano de 30 m x 0,25 mm i.d., 0,25 µm de filme, usando He como gás de arraste, com fluxo de 1,2 mL min<sup>-1</sup>. As condições cromatográficas da análise foram as mesmas utilizadas para CG/DIC. As condições do EM foram detector de captura iônica operando por impacto eletrônico e energia de impacto de 70 eV; velocidade de varredura 1.000; intervalo de varredura de 0,50 fragmentos/s e fragmentos detectados na faixa de 40 a 500 Da. Utilizou-se também, para a identificação dos constituintes, a comparação de seus índices de retenção com os da literatura (ADAMS, 2007). Para o índice de retenção, foi utilizada a equação de Van den Dool e Kratz 1963 em relação a uma série homóloga de n-alcenos (nC<sub>9</sub>-nC<sub>18</sub>). Também foram utilizadas duas bibliotecas, NIST107 e NIST21, que permitem a comparação dos dados dos espectros com aqueles existentes nas bibliotecas.

## **2.5 Avaliação da atividade citotóxica *in vitro***

As avaliações da atividade citotóxica dos óleos essenciais do gênero *Citrus* (*C. aurantifolia*, *C. limon* e *C. sinensis*), dos padrões citral e limoneno e da sua mistura (citral + limoneno) foram realizadas no Instituto Carlos Chagas (Fiocruz), Curitiba, Paraná. No teste citotóxico, utilizou-se Células Vero (fibroblastos de rim de macaco-verde da África).

Os óleos essenciais e seus padrões foram inicialmente diluídos em DMSO (dimetilsulfóxido), e, em seguida, submetidos à diluição seriada (1000;

500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,63; 7,81  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) no meio de DMEM (Dulbecco Mem) suplementado com 2,5% de FBS (soro fetal bovino) e penicilina e estreptomicina 2mM.

Em placas de 96 poços, a suspensão celular de  $1 \times 10^5$  células  $\text{mL}^{-1}$  foi distribuída, totalizando 200  $\mu\text{L}$  por poço. As placas foram incubadas a  $37^\circ\text{C}$  em incubadora a 5% de  $\text{CO}_2$  por 24h. Em seguida, o meio foi retirado e as células lavadas com tampão PBS (tampão fosfato salino)  $\text{pH}=7,2$ ; logo em seguida, adicionaram-se 180  $\mu\text{L}$  de meio de cultura e 20  $\mu\text{L}$  de solução de diluição dos óleos essenciais e dos padrões, em cada poço. As placas foram novamente incubadas a  $37^\circ\text{C}$  em incubadora a 5% de  $\text{CO}_2$  por 24h. Após esse período, acrescentaram-se 50  $\mu\text{L}$  de MTT ((brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio) ( $5 \text{ mg mL}^{-1}$ ), em todos os poços e a placa, foi envolvida em papel-alumínio e incubada novamente por 3h.

Posteriormente, retirou-se o MTT dos poços e adicionaram-se 100  $\mu\text{L}$  de DMSO em cada poço para solubilização dos cristais de formazan. As placas foram agitadas durante 5 minutos e a absorbância correspondente a cada amostra foi medida no leitor de ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) a 550 nm. A absorbância obtida das células-controle, não tratadas, foi considerada como 100% de viabilidade celular (MOSMANN, 1983).

A porcentagem de células inviáveis ou a porcentagem de citotoxicidade foi determinada pela equação:

$$\% \text{CI} = [100 (\text{Ac}-\text{Aa})/\text{Ac}]$$

Em que:

%CI: Porcentagem de citotoxicidade ou de células inviáveis;

Ac: absorbância do controle;

Aa: absorbância da amostra analisada.

O experimento foi disposto em delineamento inteiramente casualizado (DIC) em esquema fatorial (6 x 8), sendo 6 (3 óleos essenciais, 2 padrões e sua mistura) e 8 concentrações. Os dados foram submetidos à análise de variância (3 repetições), sendo as variáveis quantitativas significativas pelo teste de F submetidas à análise de regressão. Para a realização das análises estatísticas, utilizou-se o programa estatístico Sistema de Análise de Variância para Dados Balanceados – Sisvar, segundo Ferreira (2011).

A  $CC_{50}$  (Concentração efetiva para inibição de 50% das células Vero) foi estimada por meio da equação de regressão analisadas, empregando o software Origin 8.

## 2.6 Atividade hemolítica

A avaliação da atividade hemolítica dos óleos essenciais do gênero *Citrus* (*C. aurantifolia*, *C. limon* e *C. sinensis*), dos padrões citral e limoneno e da sua mistura (citral + limoneno) foi realizada no Laboratório de Bioquímica da Universidade Federal de Lavras. Para a realização dos experimentos, utilizou-se o sangue do próprio autor do trabalho, o qual foi coletado no Laboratório de Análises Clínicas da UFLA, em tubos Vacutainer® com capacidade de 10 mL contendo heparina sódica.

A suspensão de eritrócitos foi preparada, utilizando-se 10 mL de sangue, com 3 repetições. Posteriormente, essa alíquota foi centrifugada por 5 minutos a 900 x g, utilizando uma centrífuga de bancada de cruzeta horizontal (Fanem Baby®I Modelo 206 BL). O plasma, contendo plaquetas, células brancas e lipídios, foi removido por aspiração. As células vermelhas foram ressuspensas em tampão fosfato (PBS) 5 mM, pH 7,4, tampão de osmolaridade e pH fisiológicos, sendo novamente centrifugadas nas mesmas condições. Após três repetições consecutivas desse processo, obteve-se um concentrado de hemácias

que foi mantido sob refrigeração (4°C). Esse concentrado de hemácias, com concentração de 100% [100% de hematócrito (Ht)], foi diluído para o hematócrito de 0,15% (13µM de lipídios) (MALHEIROS; DE PAULA; MEIRELLES, 1998; PRETÉ et al., 2011).

### 2.6.1 Teste hemolítico em meio isotônico

A determinação da resistência à hemólise foi acompanhada pela incubação das suspensões de eritrócitos (Ht 0,15%) em solução isotônica (PBS) com diferentes concentrações do óleo essencial (0,6; 1,0; 2,0; 4,0; 5,0 e 10,0 µL mL<sup>-1</sup>). Após incubação (60 minutos a 37 °C), as amostras foram centrifugadas por 5 minutos a 1500 x g (Fanem Baby®I Modelo 206 BL) e a concentração de hemoglobina no sobrenadante, determinada espectrofotometricamente a 412 nm (Shimadzu UV-160 1 PC). Foram realizadas medidas em triplicatas para cada concentração do óleo essencial e também para os seguintes controles: no primeiro (c1), foram utilizados eritrócitos em PBS (controle de hemólise mecânica) e, no segundo (c2), foram utilizados eritrócitos em água destilada (controle de hemólise total) (PRETÉ et al., 2011).

O efeito hemolítico (% de hemólise) foi acompanhado medindo a concentração de hemoglobina no sobrenadante, de acordo com a equação abaixo:

$$\% \text{ hemólise} = \frac{A_a - A_{c1}}{A_{c2} - A_{c1}} \times 100$$

Em que  $A_a$ ,  $A_{c1}$  e  $A_{c2}$  são respectivamente as absorvâncias da amostra, dos controles c1 e c2 em 412 nm.

Para a avaliação dos dados da porcentagem de hemólise, o experimento foi disposto em delineamento inteiramente casualizado (DIC) em esquema fatorial (6 x 6), sendo 6 (3 óleos essenciais, 2 padrões e sua mistura) e 6 concentrações (0,6; 1,0; 2,0; 4,0; 5,0 e 10,0 µL mL<sup>-1</sup>), com 3 repetições. O

programa estatístico utilizado foi o Sistema de Análise de Variância para Dados Balanceados - Sisvar (FERREIRA, 2011), sendo os dados submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade. Os resultados foram plotados em gráficos de barras com os valores de porcentagem de hemólise em relação às concentrações analisadas, empregando o software GraphPad Prism versão 5.01.

### **2.6.2 Avaliação da oxidação da hemoglobina**

Adicionalmente ao teste hemolítico em meio isotônico, foram realizadas varreduras nos comprimentos de onda de 500 a 700 nm, para avaliar se houve a oxidação da hemoglobina (PRETÉ et al., 2011).

O Ht 0,15% totalmente hemolisado em água foi incubado com diferentes concentrações dos óleos essenciais (0,6; 1,0; 2,0; 4,0; 5,0 e 10,0  $\mu\text{L mL}^{-1}$ ). Após incubação de 60 minutos a 37°C, as amostras foram centrifugadas por 5 minutos a 1500 x g (Fanem Baby®I Modelo 206 BL) e a absorbância da hemoglobina presente no sobrenadante, determinada espectrofotometricamente nos comprimentos de onda de 500 a 700 nm (Shimadzu UV-160 1 PC). Os resultados foram plotados em gráficos bidimensionais, empregando o software Origin 8, sendo no eixo y a absorbância das amostras e no eixo x os comprimentos de de 500 a 700 nm.

### **3 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### **3.1 Atividade citotóxica *in vitro***

Pelos dados descritos na Figura 1, observa-se que quando aumenta a concentração das amostras, há um aumento na porcentagem de células inviáveis, verificando, assim, um efeito dose-dependente. Entretanto, esse comportamento mostra-se diferente entre as amostras (óleos essenciais, citral, limoneno, limoneno+citral), o que pode ser confirmado pela interação significativa observada entre os fatores, amostras versus concentrações ( $P < 0,05$ ).

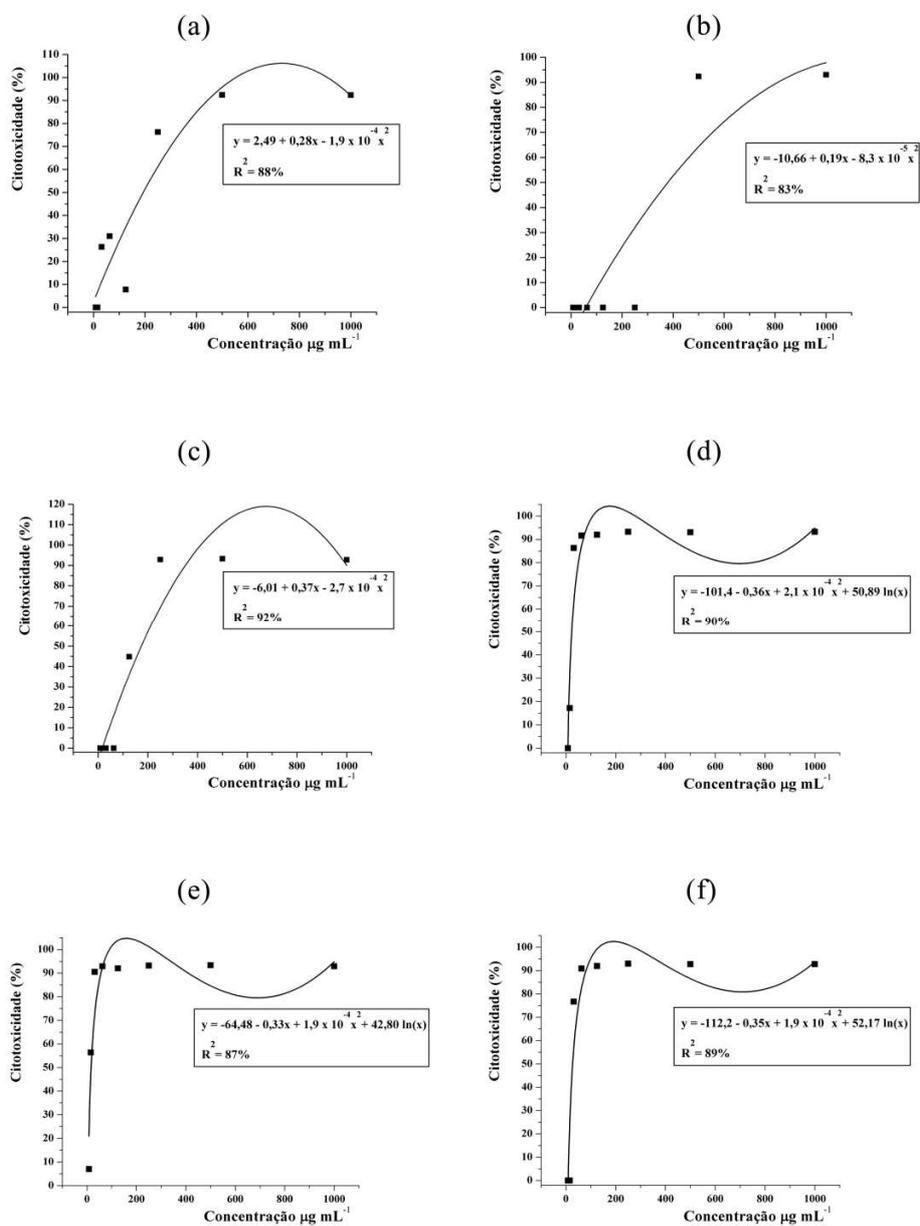


Figura 1 Atividade citotóxica de três óleos essenciais do gênero *Citrus*, dos padrões citral e limoneno e da sua mistura (citral + limoneno) sobre Células Vero. (a) Limão-taiti (b) Limão-verdadeiro (c) Laranja (d) Limoneno) (e) Citral e (f) Mistura (citral + limoneno)

Verificou-se, por meio das equações de regressão dos seis tratamentos, que o  $CC_{50}$  do óleo essencial do limão-verdadeiro foi o maior, seguido do limão-taiti, laranja, mistura (cital + limoneno), limoneno e do cital.

Tabela 1 Valores do  $CC_{50}$  dos três óleos essenciais do gênero *Citrus*, dos padrões cital e limoneno e da sua mistura (cital + limoneno) sobre Células Vero

Óleos Essenciais	$CC_{50}$ ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )
<i>Citrus aurantifolia</i>	193,0
<i>Citrus limon</i>	380,0
<i>Citrus sinensis</i>	173,7
Limoneno	23,0
Cital	16,5
Limoneno + Cital	26,7

Legenda:  $CC_{50}$  (Concentração efetiva para inibição de 50% das células Vero)

Quanto maior o valor de  $CC_{50}$ , menos ativo é o composto contra a linhagem de célula analisada. Percebeu-se, então, de acordo com os resultados apresentados, que o padrão limoneno, o padrão cital e a mistura (cital + limoneno) tiveram valores próximos entre eles, não havendo um efeito sinérgico entre na mistura do cital com o limoneno.

Segundo Gomes et al. (2014), os componentes químicos encontrados nos óleos essenciais das cascas dos três frutos cítricos foram bastante semelhantes, havendo diferenças pequenas nos constituintes minoritários. Apesar de o componente limoneno ter sido encontrado em quantidade significativa em todas as cascas dos frutos (limão-taiti 52%, limão-verdadeiro 53% e laranja 76%), a atividade citotóxica do padrão, comparada com as dos óleos essenciais diferiu-se bastante. Provavelmente isso ocorreu devido ao fato de o padrão ser uma molécula única e os óleos essenciais serem uma mistura de vários compostos, exercendo os compostos minoritários no óleo essencial um efeito antagônico diante dos compostos majoritários. Deba et al. (2008)

descrevem que os componentes minoritários têm um importante papel na atividade antimicrobiana do óleo essencial, resultado do sinergismo ou antagonismo deles com os componentes majoritários.

Patil et al. (2010) demonstraram efeitos citotóxicos de alguns monoterpenos obtidos a partir do *C. aurantifolia* em diferentes células cancerosas humanas, incluindo adenocarcinoma e células do cólon. Anteriormente, os mesmos autores, utilizando o método de MTT, observaram que o óleo essencial de limão-taiti apresentou efeitos citotóxicos dose-dependentes ( $6,25 \mu\text{g mL}^{-1}$  a  $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) em carcinoma de células do cólon. Os autores atribuíram essa citotoxicidade à presença dos diferentes monoterpenos do óleo essencial (PATIL et al., 2009).

Há diversos estudos publicados sobre óleos essenciais do gênero *Citrus*, demonstrando a presença de compostos químicos biologicamente ativos, bem como compostos altamente tóxicos. Essa toxicidade parece estar estreitamente relacionada com o aumento de sua concentração, como visto no trabalho. De forma semelhante (JOMAA et al., 2012), utilizando o óleo essencial das cascas do limão-verdadeiro, observou-se que à medida que ocorreu um aumento na concentração do óleo essencial, ocorreu também um aumento na sua citotoxicidade diante das linhagens de células de carcinoma.

Silva et al. (2008), avaliando o potencial citotóxico do óleo essencial das folhas de *Casearia sylvestris* contra as células Vero, observaram um  $\text{CC}_{50}$  de  $310,1 \mu\text{L mL}^{-1}$ . Esse resultado corrobora com os do presente estudo, pois avaliando sua identificação e quantificação, observou-se que o óleo essencial de *C. sylvestris* apresentava como constituintes majoritários monoterpenos e sesquiterpenos.

A atividade citotóxica dos óleos essenciais provavelmente está relacionada à lipofilicidade de seus constituintes químicos, que devido à sua interação com a membrana citoplasmática atravessa a parede celular, rompendo

as estruturas das diferentes camadas de polissacarídeos, ácidos graxos e fosfolipídios, atingindo vários alvos ao mesmo tempo, levando, assim, à morte celular (BAKKALI et al. 2008).

### 3.2 Atividade hemolítica e avaliação da oxidação da hemoglobina por ação de diferentes tratamentos

A Figura 2 apresenta o efeito dos óleos essenciais em diferentes concentrações (0,6; 1; 2; 4; 5; 10  $\mu\text{L mL}^{-1}$ ) em eritrócitos, em condições de osmolaridade e pH fisiológicos (PBS e pH 7,4). Verifica-se que, nas concentrações mais elevadas, os óleos essenciais apresentaram um efeito hemolítico, na sua maioria, próximo a 100%.

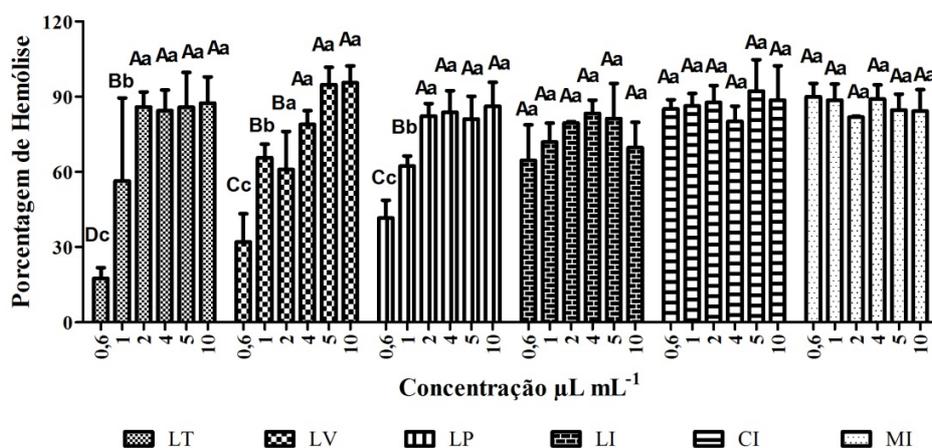


Figura 2 Efeito da concentração dos óleos essenciais sobre eritrócitos íntegros (Ht 0,15%), incubados em solução isotônica (PBS, pH 7,4) a 37°C. Médias seguidas da mesma letra, sendo a minúscula a comparação dentro de cada tratamento e a maiúscula a comparação entre as concentrações de cada tratamento, não diferem significativamente entre si a 5% de probabilidade, pelo teste de Scott-Knott.

Legenda: LT = limão-taiti; LV = limão-verdadeiro; LP = laranja; LI = limoneno); CI = citral; MI = mistura (citral + limoneno)

Na análise do perfil hemolítico (Figura 2), observou-se por meio da análise de variância que houve uma interação significativa ( $P>0,01$ ) entre as concentrações utilizadas e os tratamentos (óleos essenciais, citral, limoneno, limoneno + citral). Provavelmente, isso ocorreu por que as amostras não se comportaram de maneira semelhante em relação aos resultados da atividade hemolítica, quando relacionado com as diferentes concentrações. Nota-se que os óleos essenciais de limão-taiti, limão-verdadeiro e laranja apresentaram um comportamento semelhante, pois com o aumento da concentração do óleo essencial, verificou-se uma potencialização do efeito hemolítico. Na concentração  $0,6 \mu\text{L mL}^{-1}$ , observa-se que a membrana eritrocitária foi capaz de absorver uma quantidade de óleo essencial sem que a lise ocorresse. Mas a partir da concentração de  $1 \mu\text{L mL}^{-1}$ , a membrana saturou e a lise começou a ocorrer. E nas concentrações mais altas (2; 4; 5;  $10 \mu\text{L mL}^{-1}$ ), observa-se que a membrana já está completamente desestruturada, ocorrendo, assim, a lise total da célula. Diferentemente desse comportamento observa-se para os padrões (citral e limoneno) e sua mistura (citral + limoneno) que efeito hemolítico já se apresenta alto nas primeiras concentrações utilizadas, mantendo-se constante até as concentrações mais elevadas, ocorrendo, assim, também, a lise total da célula.

Tariku et al. (2011), pesquisando o potencial hemolítico dos óleos essenciais extraídos das cascas de *Artemisia absinthium* L. e tubérculos de *Echinops kebericho* Mesfin, observaram um forte efeito, pois esses apresentaram lise em 50% das células eritrocitárias nas concentrações de  $1,52 \mu\text{L L}^{-1}$  e  $2,62 \mu\text{L L}^{-1}$ . Os mesmos autores encontraram, da mesma forma, para os óleos essenciais extraídos das folhas de *Artemisia abyssinica* e de *Satureja punctata* ssp. *punctata* altas atividades hemolíticas nas concentrações de  $0,35 \mu\text{L L}^{-1}$  e  $1,52 \mu\text{L L}^{-1}$ , respectivamente (TARIKU et al., 2010). Essa forte ação hemolítica pode ocorrer em decorrência da lipofilicidade dos constituintes químicos dos óleos essenciais. Esses compostos podem reagir com as partes lipídicas das

membranas celulares, tornando-as mais permeáveis, culminando, assim, na lise celular (BAKKALI et al., 2008).

As Figuras 3, 4, 5, 6, 7 e 8 referem-se ao controle do dano oxidativo da hemoglobina, em que se utilizaram concentrações crescentes (0,6; 2; 3; 4; 5; 10  $\mu\text{L L}^{-1}$ ) dos óleos essenciais, seus padrões (citral e limoneno) e sua mistura (citral + limoneno). Para todos os tratamentos, utilizou-se o conteúdo celular de uma suspensão de hemáceas de Ht 0,15%.

A hemoglobina, como molécula “marcadora”, é liberada em solução devido à saturação da membrana e, como consequência, sua ruptura; entretanto, a medida de lise eritrocitária pode ser afetada, devido à hemoglobina ser oxidada pela substância utilizada, alterando suas propriedades ópticas. Isso pôde ser observado neste trabalho, pois em concentrações mais elevadas dos tratamentos observou-se que a hemoglobina apresentou coloração escura, havendo uma co-sedimentação, indicando uma desnaturação proteica. Devido a essa observação, investigou-se a oxidação da hemoglobina por ação das diferentes concentrações dos tratamentos utilizados.

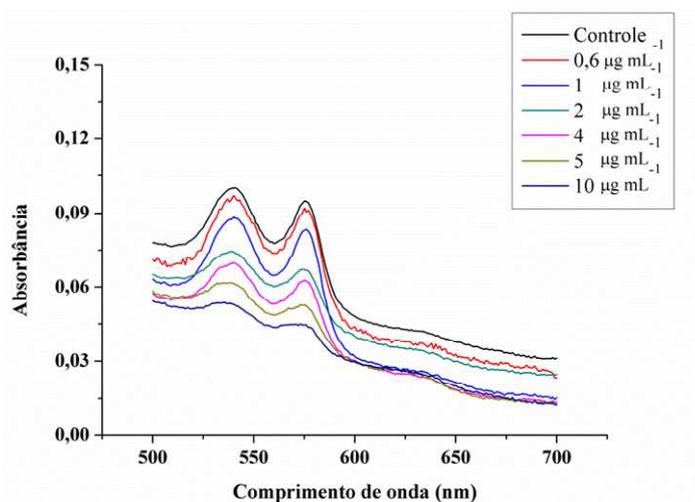


Figura 3 Espectros de absorção (500-700 nm) de hemoglobina purificada (20  $\mu\text{M}$ ) frente às diferentes concentrações do limão-taiti em tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 7,4 a 37°C

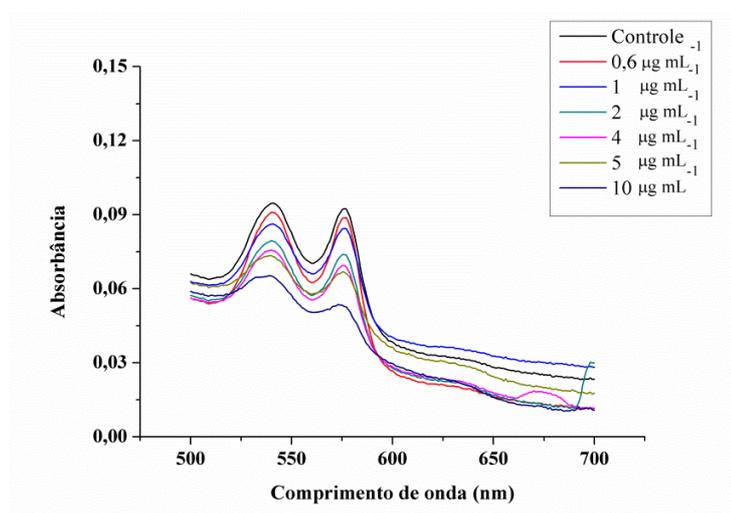


Figura 4 Espectros de absorção (500-700 nm) de hemoglobina purificada (20 μM) frente às diferentes concentrações do limão-verdadeiro em tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 7,4 a 37°C

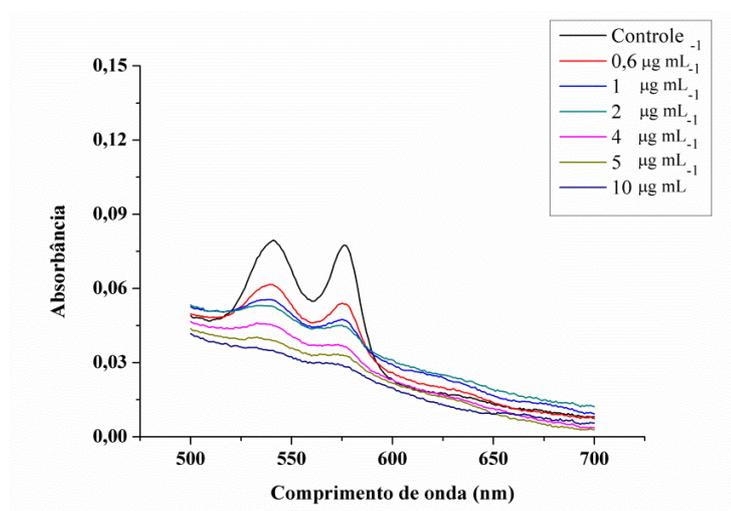


Figura 5 Espectros de absorção (500-700 nm) de hemoglobina purificada (20 μM) frente às diferentes concentrações da laranja em tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 7,4 a 37°C

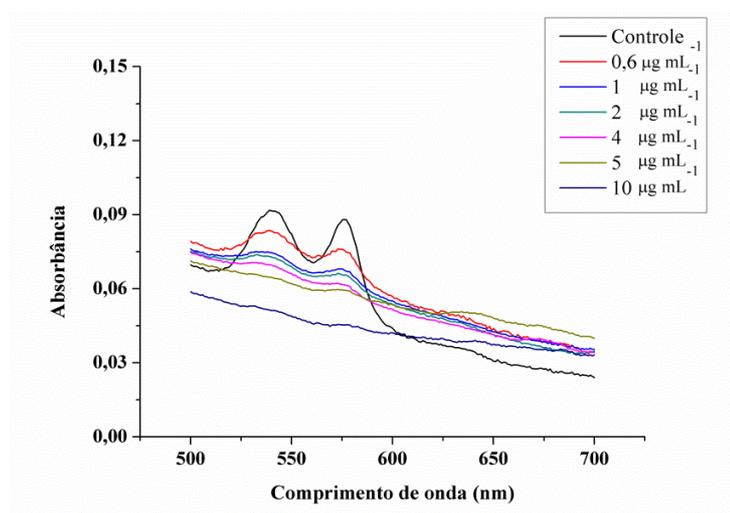


Figura 6 Espectros de absorção (500-700 nm) de hemoglobina purificada (20  $\mu\text{M}$ ) frente às diferentes concentrações do limoneno em tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 7,4 a 37°C

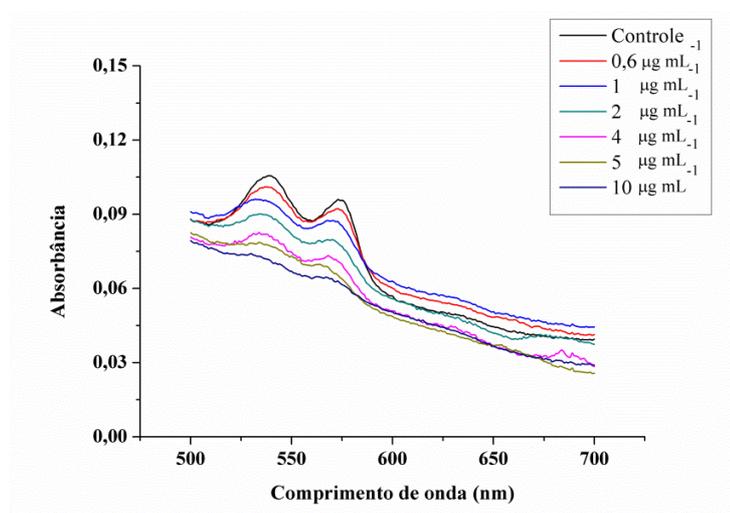


Figura 7 Espectros de absorção (500-700 nm) de hemoglobina purificada (20  $\mu\text{M}$ ) frente às diferentes concentrações do citral em tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 7,4 a 37°C

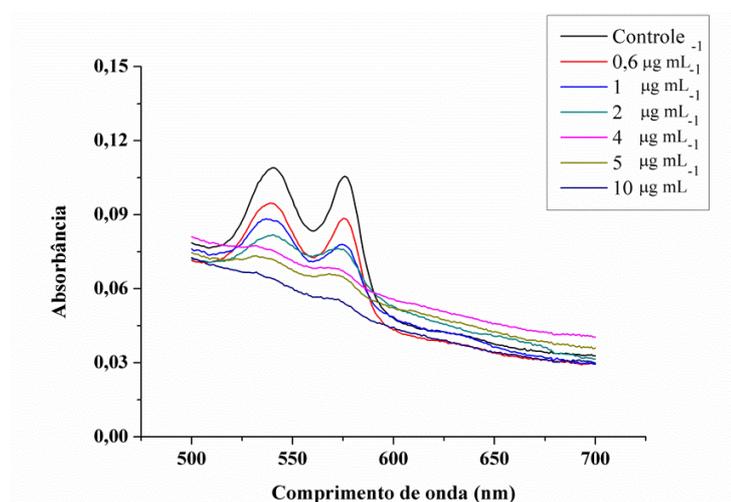


Figura 8 Espectros de absorção (500-700 nm) de hemoglobina purificada (20 µM) frente às diferentes concentrações da mistura (citral + limoneno) em tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 7,4 a 37°C

Observa-se por meio das Figuras 3, 4, 5, 6, 7 e 8 uma alteração espectral da hemoglobina, ou seja, ocorreu uma perda de absorbância nos picos de 540 e 576 nm e aparecimento de um pico em 630 nm. Essa variação que acompanha a oxidação da hemoglobina foi observada quando se aumentou a concentração dos tratamentos utilizados. Na concentração de 10 µL L<sup>-1</sup> de todos os tratamentos, observa-se uma oxidação completa da oxi-Hb devido às alterações observadas no referidos picos.

A oxidação da hemoglobina por ação das últimas concentrações de todos os tratamentos foi o motivo de não se notar 100% da lise nos ensaios hemolíticos (Figura 2). A hemoglobina oxidada deve formar hemicromos (precursores dos corpúsculos de Heiss) (PLATT & FALCONE, 1995), que são insolúveis e formam os “botões”. Isso foi observado nos precipitados das amostras submetidas a altas concentrações dos tratamentos. Como a hemólise é medida pela absorbância da hemoglobina em solução, as leituras mais baixas são

erroneamente interpretadas como indicativas de menos hemólise. A observação visual de “botões” e a coloração diferenciada da hemoglobina (mais escura) foi o primeiro indicativo de oxidação. Assim, fica evidente o efeito oxidante das concentrações mais elevadas dos tratamentos sobre a hemoglobina.

#### 4 CONCLUSÕES

A atividade citotóxica dos seis tratamentos foi elevada, sendo dos padrões maiores que a dos três óleos essenciais. Observou-se em todas as amostras um efeito dose-dependente, ou seja, à medida que aumentou a concentração, a citotoxicidade aumentou.

Pode-se afirmar, por meio do estudo hemolítico, que os padrões (cital e limoneno) e sua mistura (cital + limoneno) possuíram maior efeito em baixas concentrações (0,6 e 1,0  $\mu\text{L mL}^{-1}$ ) do que os três óleos essenciais. Percebeu-se também que o efeito oxidante dos seis tratamentos sobre a hemoglobina foi gradativo, observando maior atividade para concentrações mais elevadas.

## REFERÊNCIAS

ADAMS, R. P. **Identification of essential oils components by gas chromatography/mass spectroscopy**. 4th ed. Carol Stream: Allured, 2007. 804 p.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ. **Farmacopeia brasileira**. 5. ed. São Paulo, 2010. 1, p. 198-199.

BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 46, n. 2, p. 446-475, feb. 2008.

BARDON, S.; PICARD, K.; MARTEL, P. Monoterpenes inhibit cell growth, cell cycle progression and cyclin D1 gene expression in human breast cancer cell lines. **Nutrition and Cancer**, Cambridge, v. 32, p. 1-7, jul. 1998.

BIZZO, H. R. et al. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 3, p. 588-594, maio/jun. 2009.

DEBA, F. et al. Chemical composition and antioxidant, antibacterial and antifungal activities of the essential oils from *Bidens pilosa* Linn. Var. *Radiata*. **Food Control**, Guildford, v. 19, n. 4, p. 346-352, apr. 2008.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n.6, p. 1039-1042, 2011.

GUIMARÃES, L. G. L. et al. Influência da luz e da temperatura sobre a oxidação do óleo essencial de capim-limão (*Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf). **Química Nova**, São Paulo, v. 31, n. 6, p. 1476-1480, nov./dez. 2008.

GOMES M. S. et al. Use of essential oils of the genus *Citrus* as biocidal agents **American Journal of Plant Science**, Delaware, v. 5, p. 299-305, feb. 2014.

JOMAA, S. et al. The Cytotoxic Effect of Essential Oil of Syrian *Citrus limon* Peel on Human Colorectal Carcinoma Cell Line (Lim1863). **Middle East Journal of Cancer**, Shiraz, v. 3, n.1, p. 15-21, 2012.

MALHEIROS, S. V. P.; DE PAULA, E.; MEIRELLES, N. C. Contribution of trifluoperazine/lipid ratio and drug ionization to hemolysis. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v.1373, p.332-340, 1998.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunology Methods**, Amsterdam, v. 65, p. 55–63, 1983.

PATIL, J. R. et al. Apoptosis-mediated proliferation inhibition of human colon cancer cells by volatile principles of *Citrus aurantifolia*. **Food Chemistry**, London, v. 114, p. 1351-1358, 2009.

PATIL, J. R. et al. Characterization of *Citrus aurantifolia* bioactive compounds and their inhibition of human pancreatic cancer cells through apoptosis. **Microchemical Journal**, New York, v. 94, p. 108-117, 2010.

PERON, A.P. et al. Avaliação mutagênica das plantas medicinais *Baccharis trimera* Less. e *Solanum melongena* L. em células de medula óssea de ratos Wistar. **Revista Brasileira Biociências**, Porto Alegre, v.6, p.127-130, 2008.

PIMENTEL, F. A. et al. Ação fungitóxica do óleo essencial de *Tanaecium nocturnum* (Barb. Rodr.) Bur. e K. Shum sobre o *Aspergillus flavus* isolado da castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa*). **Acta Amazônica**, Manaus, v. 40, n. 1, p. 213-220, mar. 2010.

PRETÉ, P. S. C. et al. Multiple stages of detergent-erythrocyte membrane interaction-A spin label study. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1808, p. 164-170, 2011.

PLATT, O. S.; FALCONE, J. F. Membrane-protein interactions in sickle red-blood-cells - evidence of abnormal protein-3 function. **Blood**, New York, v. 86, p.1992-1998, 1995.

SILVA, S. L.; CHAAR, J. S.; FIGUEIREDO, P. M. S.; YANO, T. Cytotoxic evaluation of essential oil from *Casearia sylvestris* Sw on human cancer cells and erythrocytes. **Acta Amazonica**, Manaus, v. 38, n. 1, p. 107-112, 2008.

SIMONI, I.C. et al. Avaliação da citotoxicidade de biflavonóides isolados de *Ouratea spectabilis* (OCHINACEAE) em células de córnea de coelho Sirq. Arq. **Instituto de Biologia**, São Paulo, v. 69, n.4, p. 95-97, out./dez., 2002.

TARIKU, Y. et al. In vitro Evaluation of Antileishmanial Activity and Toxicity of Essential Oils of *Artemisia absinthium* and *Echinops kebericho*. **Chemistry & Biodiversity**, Zurich, v.8, p. 614-623, 2011.

TARIKU, Y. et al. Essential-Oil Composition, Antileishmanial, and Toxicity Study of *Artemisia abyssinica* and *Satureja punctata* ssp. *punctata* from Ethiopia. **Chemistry & Biodiversity**, Zurich, v.7, p. 1009-1018, 2010.

VEIGA Jr., V.F.; PINTO, A.C.; MACIEL, M.A.M. Plantas Mediciniais:Cura Segura?. **Química Nova**, São Paulo, v. 28, n. 3, p. 519-528, may/ june, 2005.

**ARTIGO 3**

**AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIOXIDANTES DOS ÓLEOS  
ESSENCIAIS DE TRÊS ESPÉCIES DO GÊNERO *CITRUS*  
UTILIZANDO DIVERSAS METODOLOGIAS**

## RESUMO

Atualmente existe um grande interesse no estudo dos óleos essenciais atuando como antioxidante devido, principalmente, às descobertas sobre o efeito dos radicais livres no organismo. Diante disso, no presente estudo, avaliou-se a atividade antioxidante de três espécies do gênero *Citrus*, limão-taiti (*Citrus aurantifolia*), limão-verdadeiro (*Citrus limon*) e laranja (*Citrus sinensis*). Diversas metodologias foram utilizadas: TBARS e lipossomas avaliaram a prevenção da peroxidação lipídica utilizando dois substratos lipídicos (gema de ovo e lipossomas); DPPH, TEAC, radicais hidroxila e radicais de óxido nítrico, avaliaram a capacidade de captura destes radicais pelo antioxidante. Também foi determinada a capacidade de inibição da enzima lipoxigenase, indicando potencial anti-inflamatório e antioxidante. E também a atividade antioxidante por meio da capacidade de redução do complexo de molibdênio e da capacidade de manutenção da coloração da emulsão  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico devido à cooxidação do  $\beta$ -caroteno pelo ácido linoleico submetido à oxidação intensa. Verificou-se pelos métodos TBARS e Lipossomas que todos os óleos essenciais tiveram um efeito pró-oxidante, ou seja, além de não protegerem o substrato lipídico da oxidação, eles também oxidaram. Já para a avaliação da capacidade de captura dos radicais, somente o método de DPPH não apresentou atividade antioxidante. No entanto, para os outros métodos, obtiveram-se resultados antagônicos. Isso demonstra a importância da utilização de vários métodos de avaliação da atividade antioxidante, pois métodos diferentes fornecem resultados diferentes. Com relação ao método da oxidação do sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico, verificou-se que o  $IC_{50}$  dos três óleos essenciais foram acima de  $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Para o método do fosfomolibdênio, observou-se por meio da análise de variância que não houve diferença significativa ( $P < 0,05$ ) entre os óleos essenciais analisados. Com isso, pode-se observar que os três óleos essenciais testados apresentaram atividade antioxidante positiva em algumas metodologias utilizadas e, em outras, não. Isso pode ser devido à influência e diferença de diversos fatores inerentes a cada metodologia que influenciam na atividade antioxidante.

Palavras-chave: Radicais livres. Peroxidação lipídica. Atividade anti-inflamatória.

## ABSTRACT

Currently there is great interest in the study of essential oils acting as an antioxidant, mainly due to discoveries about the effect of free radicals in the body. Therefore in the present study evaluated the antioxidant activity of three species of the genus *Citrus*, limes (*Citrus aurantifolia*), lemon (*Citrus limon*), orange (*Citrus sinensis*). Several methods were used, TBARS Liposomes was assessed measuring the capacity for preventing lipid peroxidation using two lipidic substrats (egg yolk and liposomes), DPPH, TEAC, hydroxyl radical and nitric oxide radicals, assessing the ability of these radicals capture antioxidant. The ability to inhibit lipoxygenase enzyme was also determined, indicating anti-inflammatory and antioxidant potential. We also determined the antioxidant activity through the ability to reduce the molybdenum complex and the ability to maintain the emulsion  $\beta$ -caroteno/ linoleic acid coloring due to the co-oxidation of  $\beta$ -carotene by the linoleic acid submitted to intense oxidation. It was found by the TBARS and Liposomes methods that all essential oils had a pro-oxidant effect, ie, addition of not protecting the lipid substrate from oxidation, they also oxidized. As for the evaluation of the ability to capture the radicals, only the DPPH assay showed no antioxidant activity. However, for other methods were obtained conflicting results. This demonstrates the importance of using multiple methods of evaluation of antioxidant activity, because different methods provide different results. With respect to the  $\beta$ -Carotene bleaching method, it was found that the  $IC_{50}$  of the three essential oils were above  $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ . And for phosphomolybdenum method was observed by analysis of variance there was no significant difference ( $P < 0.05$ ) between essential oils analyzed. Thus, we can observe that the three essential oils tested showed positive antioxidant activity in some methodologies used and not others. This may be due to several factors inherent in each methodology that influence the antioxidant activity.

Keywords: Free radicals. Lipid peroxidation. Anti-inflammatory activity.

## 1 INTRODUÇÃO

O interesse pelo estudo das substâncias antioxidantes e por radicais livres tem se intensificado cada vez mais, principalmente após as descobertas dos efeitos maléficos dos últimos no organismo. Os antioxidantes, de uma forma geral, são definidos como uma família heterogênea de moléculas que, presentes em baixas concentrações, comparativamente às biomoléculas que supostamente protegeriam, podem prevenir ou reduzir a extensão do dano oxidativo (OLIVEIRA et al., 2009; MIGUEL, 2010).

Normalmente as plantas são capazes de produzir antioxidantes para controlar o estresse oxidativo causado pela radiação solar e oxigênio atmosférico, entre outros fatores. Dessa forma, os produtos naturais podem representar fontes promissoras de novos compostos com atividade antioxidante.

A partir dos anos 80, com a comprovação dos efeitos maléficos dos antioxidantes sintéticos (DURÁN & PADILLA, 1993), tornou-se evidente o interesse em substituí-los por antioxidantes naturais. Em vista disso, várias pesquisas têm sido realizadas com o objetivo de verificar o potencial antioxidante dos óleos essenciais (ANDRADE et al., 2013; LIMA et al., 2012, GUIMARAES et al., 2011).

Os óleos essenciais são compostos voláteis caracterizados, geralmente, pelo forte odor, sendo misturas complexas de diversos compostos, podendo conter em sua constituição cerca de 20 a 60 componentes em concentrações muito diferentes. São caracterizados, na maioria das vezes, por dois ou três componentes em concentrações bastante elevadas, ou seja, compostos majoritários (20-70%), em comparação com os outros componentes presentes em pequenas quantidades (BAKKALI et al., 2008).

Os óleos essenciais do gênero *Citrus* estão entre os mais comercializados no mundo e isso se deve principalmente às indústrias de sucos,

que aproveitam a casca da fruta para a produção do óleo essencial, agregando valor, assim, ao resíduo (BIZZO; HOVELL; REZENDE, 2009).

Objetivou-se neste trabalho avaliar a atividade antioxidante dos óleos essenciais das cascas de três espécies do gênero *Citrus* (*Citrus aurantifolia*, *Citrus limon* e *Citrus sinensis*), utilizando nove metodologias diferentes.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Coleta do material vegetal e extração do óleo essencial

Os materiais vegetais, limão-taiti (*C. aurantifolia*), limão-verdadeiro (*C. limon*) e laranja (*C. sinensis*) foram coletados em uma propriedade próxima à cidade de Lavras, a uma latitude 21°26'27 sul e 44°39'27 oeste, com altitude de 1049 metros, no período da manhã, nos meses de março e abril de 2012. O processo de extração dos óleos essenciais foi realizado no Laboratório de Química Orgânica - Óleos Essenciais do Departamento de Química da Universidade Federal de Lavras, MG. O método utilizado foi o de hidrodestilação, utilizando um aparelho de Clevenger modificado (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, ANVISA, 2010). A extração foi realizada em triplicata por um período de 2 horas.

### 2.2 Identificação e quantificação química dos óleos essenciais

A análise quantitativa e a identificação dos constituintes dos óleos essenciais foram realizadas no Departamento de Química da Universidade Federal de Sergipe (UFS).

As análises quantitativas dos óleos essenciais foram realizadas em um cromatógrafo gasoso equipado a um detector de ionização de chamas (DIC) Shimadzu GC-17A, sob as seguintes condições operacionais: coluna capilar de sílica fundida ZB-5MS (5% dimetilpolisiloxano) com 30 m x 0,25 mm i.d. x 0,25 µm de filme, usando He como gás de arraste com fluxo de 1,2 mL min<sup>-1</sup>. A temperatura foi mantida a 50°C por 2 min, depois aumentada 4°C min<sup>-1</sup>, até atingir 200°C. Em seguida, aumentada 15°C min<sup>-1</sup>, até atingir 300°C, mantendo-se essa temperatura constante por 15 min; a temperatura do injetor foi 250°C e a

temperatura do detector (ou interface), de 280°C. Foi injetado um volume de 0,5 µL da mistura reacional dissolvida em acetato de etila.

A análise qualitativa dos óleos essenciais foi realizada em cromatógrafo a gás acoplado a espectrômetro de massa CG/EM (Shimadzu, modelo QP 5050A), equipado com coluna capilar de sílica fundida (J&W Scientific ) (5%-fenil-95%-dimetil-polisiloxano) de 30 m x 0,25 mm i.d., 0,25 µm de filme, usando He como gás de arraste, com fluxo de 1,2 mL min<sup>-1</sup>. As condições cromatográficas da análise foram as mesmas utilizadas para CG-DIC. As condições do EM foram detector de captura iônica operando por impacto eletrônico e energia de impacto de 70 eV; velocidade de varredura 1.000; intervalo de varredura de 0,50 fragmentos/s e fragmentos detectados na faixa de 40 a 500 Da. Utilizou-se também, para a identificação dos constituintes, a comparação de seus índices de retenção com os da literatura (ADAMS, 2007). Para o cálculo do índice de retenção, foi utilizada a equação de Van den Dool e Kratz 1963 em relação a uma série homóloga de n-alcenos (nC<sub>9</sub>-nC<sub>18</sub>). Também foram utilizadas duas bibliotecas, NIST107 e NIST21, que permitem a comparação dos dados dos espectros com aqueles existentes nas bibliotecas.

### **2.3 Avaliação da atividade antioxidante**

As atividades antioxidantes dos óleos essenciais de três representantes do gênero *Citrus* (limão-taiti, limão-verdadeiro e laranja) foram realizadas no Laboratório de Química Orgânica - Óleos Essenciais do Departamento de Química da Universidade Federal de Lavras, MG e no Laboratório de Ciências das Plantas da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade do Algarve, Faro – Portugal.

A atividade antioxidante dos óleos essenciais foi avaliada medindo-se a capacidade de prevenir a peroxidação lipídica utilizando dois substratos lipídicos

(gema de ovo e lipossomas) e também avaliando a capacidade de captura dos radicais DPPH, ABTS, radicais hidroxila e radicais de óxido nítrico. A capacidade para inibir a enzima lipoxigenase também foi realizada, sugerindo, assim, uma atividade antioxidante e anti-inflamatória. Também foi determinada a atividade antioxidante por meio da capacidade de redução do complexo de molibdênio e da capacidade de manutenção da coloração da emulsão  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico devido a cooxidação do  $\beta$ -caroteno pelo ácido linoleico submetido à oxidação intensa. A atividade antioxidante dos óleos essenciais foi comparada com as atividades de alguns antioxidantes padrões (BHT, ácido ascórbico, trolox, NDGA, eugenol e manitol).

### **2.3.1 Atividade antioxidante do radical livre DPPH**

A avaliação da atividade antioxidante por meio do método do sequestro dos radicais livres DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) foi realizada de acordo com as metodologias de Lopes-Lutz et al. (2008) e Guimarães et al. (2011), seguidas de pequenas modificações. Uma solução metanólica de DPPH foi preparada na concentração de  $40 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Para a avaliação, 2,7 mL da solução de DPPH foram adicionados em tubos de ensaio, seguidos da adição de 0,3 mL de cada diluição de óleo essencial em metanol (250, 200, 150, 100, 50;  $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). Em paralelo, o controle negativo foi preparado contendo todos os reagentes, exceto o óleo essencial. Para a comparação das atividades os padrões BHT e ácido ascórbico foram avaliados. Após 60 minutos, leituras foram realizadas utilizando o espectrofotômetro (Shimadzu UV-160 1PC) no comprimento de onda de 517 nm (TEPE et al., 2005). A atividade antioxidante (AA%) foi calculada usando a seguinte equação:

$$AA\% = [(A_{CN} - A_{Amo}) / A_{CN}] * 100$$

Em que:

$A_{Amo}$  = Absorbância do DPPH com a amostra.

$A_{NC}$  = Absorbância do DPPH com o metanol.

A concentração efetiva para a avaliação da atividade antioxidante em 50% ( $EC_{50}$ ) foi estimada por meio da equação de regressão.

### 2.3.2 Ensaio do $\beta$ -caroteno/Ácido Linoleico

A avaliação da atividade antioxidante utilizando o ensaio do  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico foi realizada de acordo com as metodologias apresentadas por Andrade et al. (2013) e Lopes-Lutz et al. (2008), com modificações. Inicialmente foi preparada uma solução contendo 60  $\mu$ L de ácido linoleico, 600 mg de Tween 20, 6 mg de  $\beta$ -caroteno e 30 mL de clorofórmio. Todo o clorofórmio foi removido utilizando um evaporador rotatório com um banho a 50°C (Büchi Rotavapor R 114). Posteriormente, 150 mL de água destilada saturada com oxigênio foram acrescentados na mistura sob agitação constante. Em tubos de ensaio, 2,7 mL dessa solução foram adicionados para 0,3 mL de cada diluição do óleo essencial em metanol (250, 200, 150, 100, 50, 25  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>) e o controle negativo constituído de apenas metanol. Para a comparação das atividades, os padrões BHT e ácido ascórbico (controles positivos) foram avaliados. A absorbância foi medida imediatamente no espectrofotômetro (Shimadzu UV-160 1PC) a 470 nm. Depois da leitura da absorbância inicial, os tubos foram incubados em um banho-maria a 50°C, ao abrigo de luz, para a reação de oxidação, e a segunda leitura foi realizada após 60 minutos de incubação. Todas as leituras foram realizadas em triplicata.

De acordo com Lopez-Lutz et al. (2008), a atividade antioxidante (AA%) foi calculada como porcentagem de atividade após 60 min de incubação, por meio da seguinte equação:

$$AA\% = [1 - (A_{Am0} - A_{Am}) / (A_{CN0} - A_{CN})] * 100$$

Em que:

$A_{Am0}$  = Absorbância no início da incubação com a amostra

$A_{Am}$  = Absorbância depois de 1 hora de incubação com a amostra

$A_{CN0}$  = Absorbância no início da incubação com o etanol

$A_{CN}$  = Absorbância depois de 1 hora de incubação com o etanol

As amostras foram lidas contra um branco que continha a emulsão menos o  $\beta$ -caroteno. A concentração efetiva para a avaliação da atividade antioxidante em 50% ( $EC_{50}$ ) foi estimada pela equação de regressão.

### **2.3.3 Atividade antioxidante equivalente ao Trolox (TEAC)**

A formação do cátion radical ABTS ((2,2-azinobis-[3-etil-benzotiazolin-6-ácido sulfônico]) foi realizada de acordo com Antunes et al. (2010) e Guerreiro et al. (2013). Para o ensaio, 10  $\mu$ L de óleo essencial foram adicionados a 990  $\mu$ L da solução do radical ABTS $\bullet$ +. A absorvância foi monitorizada espectrofotometricamente a 735 nm, durante 6 min (Shimadzu 160-UV). A absorção de uma amostra contendo a mesma quantidade de etanol e uma solução do radical ABTS $\bullet$ + atuaram como controle negativo. A porcentagem de inibição do radical ABTS $\bullet$ + pelas amostras foi calculada de acordo com a seguinte equação:

$$\% \text{ Efeito de captação do radical} = [(A_{\text{CN}} - A_{\text{Am}}) / A_{\text{CN}}] * 100$$

Em que:

$A_{\text{CN}}$  = Absorbância do controle negativo

$A_{\text{Am}}$  = Absorbância da amostra

Os valores foram comparados com uma curva para várias concentrações de Trolox e os valores expressos em equivalentes de Trolox  $\mu\text{mol por (mL)}$  de óleo essencial.

#### **2.3.4 Determinação da capacidade de remoção do óxido nítrico**

A formação do óxido nítrico (NO) ocorreu a partir da decomposição espontânea do nitroprussiato de sódio (NPS) em tampão fosfato 20 mM (pH 7,4). Uma vez gerado, o NO interage com o oxigênio para produzir íons nitrito, que foram medidos pela reação de Griess (BASU & HAZRA, 2006). Neste ensaio, a solução de NPS (10 mM) em tampão de fosfato (PBS, pH = 7,4) foi misturada com os óleos essenciais ( $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) e com o padrão eugenol (controle positivo) ( $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). Em seguida foram incubados a  $37^\circ\text{C}$  durante 60 min na luz. A metade dessa solução foi misturada com igual quantidade do reagente de Griess, e essa solução foi incubada a  $25^\circ\text{C}$  durante 5 minutos no escuro. A absorvância do cromóforo (cor-de-rosa) foi lida a 535 nm e todos os testes foram realizados em triplicata. O percentual da capacidade de inibição (I%) foi calculado por meio da equação:

$$I(\%) = (A_{\text{CN}} - A_{\text{Am}}) / (A_{\text{CN}}) \times 100,$$

Em que:

$A_{\text{CN}}$  = Absorbância do controle negativo

$A_{\text{Am}}$  = Absorbância da amostra

### 2.3.5 Radical hidroxil

O ensaio de atividade captadora do radical OH• foi realizado de acordo com Dandlen et al. (2010) e Boulanouar et al. (2013). A mistura de reação foi preparada com 10 mM de FeSO<sub>4</sub> • 7H<sub>2</sub>O, 10 mM de EDTA, 10 mM de 2-desoxirribose, 0,1 M de tampão fosfato e dos óleos essenciais do gênero *Citrus* (concentração final de 1% p/v) em um tubo de ensaio, totalizando um volume de 1,8 mL. Posteriormente, 200 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foram adicionados à mistura, a qual foi incubada a 37°C durante 2 horas. Após, 1 mL de ácido tricloroacético (3%) e 1 mL de ácido tiobarbitúrico (1%) foram adicionados ao tubo de ensaio, que foi aquecido em banho-maria (95°C) durante 10 min. Depois de esfriar até a temperatura ambiente, a sua absorvância foi medida a 532 nm em um espectrofotômetro (Shimadzu UV-160). A atividade de inibição do radical OH• (I%) foi calculada utilizando a seguinte equação:

$$I(\%) = [(A_{CN} - A_{Am}) / A_{CN}] \times 100$$

Em que:

A<sub>CN</sub> = Absorvância do controle negativo

A<sub>Am</sub> = Absorvância da amostra

Os testes foram realizados em triplicata. O padrão manitol foi utilizado como controle positivo (concentração final de 0,05% p/v).

### 2.3.6 Inibição da atividade da lipoxigenase

O ensaio da 5-lipoxigenase é um teste de verificação da atividade antioxidante dos óleos essenciais e é utilizado também como uma indicação da atividade anti-inflamatória dos mesmos. Esse teste foi realizado de acordo com o

método relatado por Miguel et al. (2014), com modificações. A reação foi iniciada por adição de 5 µL da solução da lipoxigenase (0,054 g em 1 mL de tampão de borato 0,2 M , pH 9 ) a 955 µL de tampão de borato, 20 µL de amostra e 20 µL de ácido linoleico (0,001 M). Todos os óleos essenciais foram testados na concentração de 10 µL mL<sup>-1</sup> diluídos 1:1 em Tween 20. Utilizou-se o ácido nordihidroguaiarético (NDGA) como controle positivo e sua atividade antioxidante foi avaliada nas concentrações (3 mg mL<sup>-1</sup>, 1,5 mg mL<sup>-1</sup>, 0,75 mg mL<sup>-1</sup>; 0,375 mg mL<sup>-1</sup>; 0,1875 mg mL<sup>-1</sup>; 0,0937 mg mL<sup>-1</sup>; 0,0468 mg mL<sup>-1</sup>; 0,0234 mg mL<sup>-1</sup>; 0,0117 mg mL<sup>-1</sup>). A absorbância foi lida a cada minuto por 5 minutos e a porcentagem de inibição da enzima, utilizando os óleos essenciais, foi comparada com a curva das concentrações do NDGA. A inibição da enzima lipoxigenase (I%) foi calculada utilizando a seguinte equação:

$$I (\%) = [(A_{CN} - A_{Am}) / A_{CN}] \times 100$$

Em que:

$A_{CN}$  = Absorbância do controle negativo

$A_{Am}$  = Absorbância da amostra

### 2.3.7 Método do TBARS

As atividades antioxidantes dos óleos essenciais de *Citrus* foram determinadas medindo-se a oxidação dos lipídeos da gema do ovo, como descrito por Bounatirou et al. (2007). O material lipídico (gema de ovo) foi utilizado na concentração de 10% (p/v) em KCl (1,15% p/v). Essa solução foi homogeneizada por 30 segundos, colocada em um ultrassonicador por 5 minutos e, posteriormente armazenada a 4°C. Para o ensaio, 500 µL da solução lipídica 10% (p/v) foram adicionados a 50 µL de óleo essencial diluído em 50 µL de metanol (concentração final 0,8% p/v). Em seguida, adicionaram-se 400 µL de

água destilada para completar o volume para 1 mL. Posteriormente, adicionaram-se 1,5 mL de ácido acético 20% (pH 3,5) e 1,5 mL de TBA (Ácido tiobarbitúrico) 0,8% (p/v) em dodecilsulfato de sódio 1,1% (p/v). Para o controle negativo, utilizaram-se 100 µL de metanol e, para o controle positivo, utilizou-se o BHT (concentração final 0,015% p/v). Essa mistura foi levada ao vortex para melhor homogeneização e aquecida por 1 h no banho-maria a 95°C. Após o resfriamento das amostras (temperatura ambiente), colocaram-se 2,5 mL de butan-1-ol em cada tubo de ensaio e centrifugou-os por 10 min a 3000 x g. A absorbância do sobrenadante foi medida a 532 nm, utilizando um espectrofotômetro Shimadzu 160-UV. Todos os valores foram expressos em porcentagem da atividade antioxidante (%AA), calculados por meio da fórmula.

$$\%AA = [(A_{CN} - A_{Am}) / A_{CN}] \times 100$$

Em que:

$A_{CN}$  = Absorvância do controle negativo

$A_{Am}$  = Absorvância da amostra

### 2.3.8 Lipossomas

A atividade antioxidante dos óleos essenciais foi avaliada utilizando o método descrito por Boulanouar et al. (2013), com modificações. Os lipossomas foram obtidos a partir de 1 g de lecitina em 250 mL de clorofórmio. Removeu-se totalmente o clorofórmio utilizando um evaporador rotatório a 50°C e, posteriormente essa solução foi submetida ao fluxo de gás nitrogênio, por 30 s. Os lipossomas foram novamente levados a um evaporador rotatório por duas horas, até à secura completa da solução. Foram adicionados a essa solução 200 mL de tampão fosfato (pH 7,4) a qual foi mantida a 4°C. Para o experimento, 200 µL da suspensão de lipossomas foram incubadas com 10 µL de óleo

essencial (concentração final 0,42% p/v), 100  $\mu\text{L}$   $\text{FeCl}_2$  (6 mM) e 50  $\mu\text{L}$  de ácido ascórbico (0,1 mM). Essa mistura foi incubada durante 1h a 35°C. Após, resfriou-se até a temperatura ambiente. Posteriormente, foram adicionados 2,0 mL TBA (0,6% p/v) e a mistura foi novamente incubada durante 10 min a 95°C. Depois de resfriar novamente (temperatura ambiente), o ensaio foi realizado conforme relatado acima para método TBARS. O BHT foi utilizado como controle positivo (concentração final 0,005% p/v).

### 2.3.9 Complexo fosfomolibdênio

Uma alíquota de 0,1 mL das soluções dos óleos essenciais (limão-taiti, limão-verdadeiro e laranja) diluídos em etanol ( $0,02 \text{ mg mL}^{-1}$ ) foram adicionados em um tubo de ensaio com 1 mL de solução de reagente (ácido sulfúrico 0,6 M, 28 mM de fosfato de sódio, molibdato de amônio e 4 mM). Os tubos foram tampados e incubados em um banho-maria a 95°C durante 60 min. Após o resfriamento dos tubos de ensaio, fazer a leitura a 695 nm *versus* um branco (solução contendo 1 mL da solução do reagente e 0,1 mL de etanol). Os valores da capacidade antioxidante dos óleos essenciais foram comparados com uma curva para várias concentrações de ácido ascórbico (26; 13; 6,5; 3,25; 1,625; 0,8125  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) e os resultados, expressos em equivalentes mg de ácido ascórbico por mL de óleo essencial (PRIETO; PINEDA; AGUILAR, 1999).

### 2.4 Análises Estatísticas

Para os testes de DPPH e  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico, foram feitas as análises de variância, seguida pelo Teste F, para verificar o efeito das concentrações sobre a atividade antioxidante deles, e análise de regressão para avaliar os efeitos de cada concentração sobre a atividade antioxidante de cada

amostra. Para ambos os testes, utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado (DIC), em esquema fatorial (5 X 6), sendo cinco amostras analisadas (limão-taiti, limão-verdadeiro, laranja, BHT e ácido ascórbico) e seis concentrações (250, 200, 150, 100, 50, 25  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), com três repetições. As análises foram realizadas utilizando o programa Sisvar (FERREIRA, 2011) e, por meio da análise de regressão, foi calculada a concentração efetiva para a avaliação da atividade antioxidante de 50% ( $\text{EC}_{50}$ ).

Com relação aos testes TEAC, TBARS, lipoxigenase, capacidade de remoção do óxido nítrico, lipossomas, radical hidroxil e fosfomolibdênio, foram também feitas as análises de variância, seguida pelo teste F, para verificar se houve diferença entre as amostras, de acordo com a aplicação de cada metodologia utilizada. Para os testes citados anteriormente, utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado (DIC), com três repetições.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Pelo método da captura do radical livre DPPH, os óleos essenciais em estudo não apresentaram atividade antioxidante, na faixa de concentrações utilizadas. Já entre os antioxidantes padrões testados, o ácido ascórbico ( $IC_{50}$  44,36  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) e o BHT ( $IC_{50}$  48,84  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) apresentaram atividades próximas (Tabela 1).

Tabela 1 Atividade antioxidante dos óleos essenciais de *C. aurantifolia*, *C. limon* e *C. sinensis* e dos antioxidantes padrões BHT e ácido ascórbico, por meio dos métodos sequestro dos radicais DPPH e inibição da oxidação do sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico

Óleos Essenciais	DPPH	$\beta$ -caroteno/ácido linoleico
	* $CI_{50}$ ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	* $CI_{50}$ ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )
<i>C. aurantifolia</i>	NI	>500
<i>C. limon</i>	NI	>500
<i>C. sinensis</i>	NI	>500
BHT	48,84	< 25
Ácido Ascórbico	44,36	118,15

\* $CI_{50}$  = Concentração de inibição de 50%; NI = não apresentou inibição de acordo com as concentrações utilizadas.

Esse método tem como objetivo avaliar a capacidade das substâncias utilizadas em doar hidrogênio radicalar a esse radical. Ele se baseia no descoramento de uma solução composta por radicais DPPH• de cor violeta, para uma solução composta pelo composto DPPH de cor amarela (FIGURA 1).

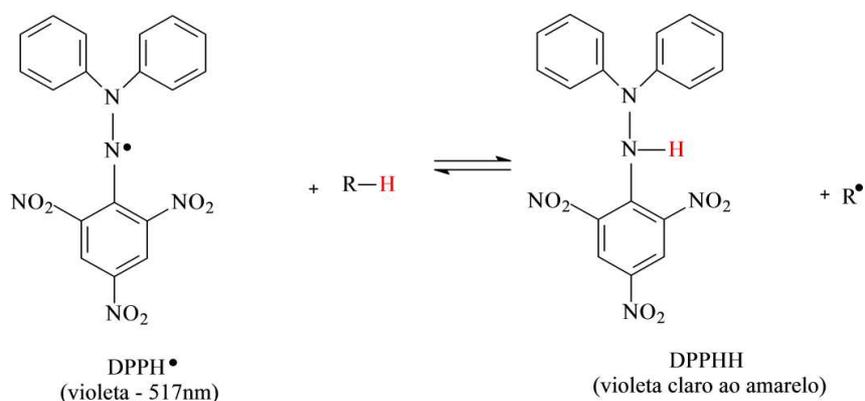


Figura 1 Estabilização do radical DPPH• por um antioxidante

O fato de os três óleos essenciais do gênero *Citrus* não apresentarem atividade antioxidante perante a metodologia que avalia a redução do radical estável DPPH pode ser justificado devido a não facilidade de doação de um hidrogênio por parte dos compostos presentes nos óleos essenciais, para neutralizar o radical DPPH. Essa ausência de atividade antioxidante pode estar relacionada com a constituição química dos óleos essenciais utilizados no presente estudo. Segundo Gomes et al. (2014), os óleos essenciais de limão-taiti, limão-verdadeiro e laranja apresentaram na sua constituição química, como componente majoritário, o composto limoneno (52%, 53% e 76%, respectivamente) (FIGURA 2), existindo diferenças pequenas nos constituintes minoritários.



Figura 2 Estrutura química do limoneno

Devido à composição química ser predominantemente de limoneno, ocorre então uma baixa atividade antioxidante, ou nenhuma atividade antioxidante, quando se utiliza o método de DPPH, pois compostos hidrocarbônicos apresentam grande dificuldade para doar elétrons para estabilização do radical. Corroborando com o trabalho, estudos de Choi et al. (2000), avaliando a atividade antioxidante de diversos óleos essenciais do gênero *Citrus*, por meio do método de DPPH, relatam que a alta atividade antioxidante, apresentada por alguns deles, pode ter sido causada pela composição dos óleos essenciais que possuem um teor elevado de terpenos, com a exceção do limoneno e do mirceno. Posteriormente, Sacchetti et al. (2005) também citam que os óleos essenciais que apresentavam predominância de compostos monoterpênicos as atividades antioxidantes pelo método de DPPH eram quase ineficazes.

De acordo com os resultados obtidos na avaliação da atividade antioxidante dos óleos essenciais, pelo método da oxidação do sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico, verificou-se por meio das equações de regressão dos três óleos essenciais (Figura 3) que o  $IC_{50}$  dos óleos essenciais de *C. aurantifolia*, *C. limon* e *C. sinensis* foram acima de  $500 \mu\text{g mL}^{-1}$  (Tabela 1). Foi observado um aumento da atividade antioxidante com o aumento da concentração, revelando, assim, um efeito dose-dependente sobre a atividade antioxidante dos óleos essenciais (FIGURA 3). Com relação à atividade antioxidante dos padrões BHT e ácido ascórbico, pode-se observar que o  $IC_{50}$  do primeiro foi menor do que o  $IC_{50}$  do segundo. Isso pode ser explicado segundo Kulisic et al. (2004) devido aos antioxidantes polares permanecerem mais na fase aquosa da emulsão e, conseqüentemente, mais diluídos na fase lipídica, acarretando assim uma menor eficiência.

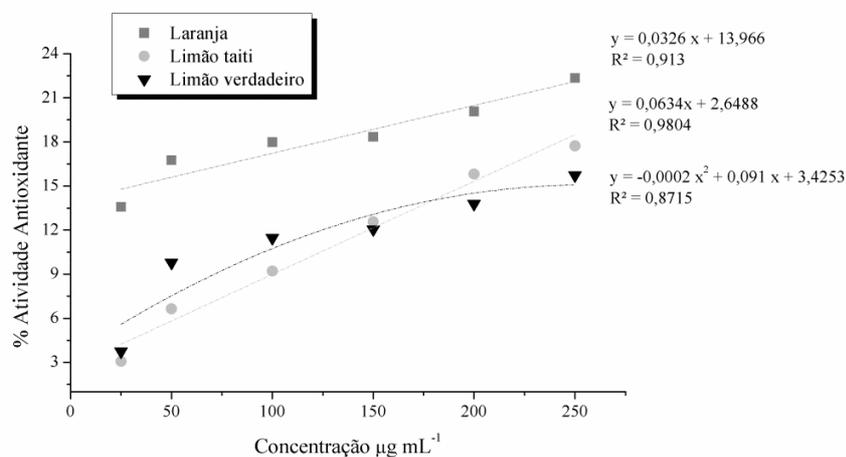


Figura 3 Porcentagem da atividade antioxidante dos óleos essenciais de limão-taiti, limão-verdadeiro e laranja, pelo método da oxidação do sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico

Segundo Andrade et al. (2013), óleos essenciais ricos em terpenos apresentam melhores valores de atividade antioxidante pelo método  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico do que pelo método de DPPH, pelo fato de o primeiro método ser mais específico para antioxidantes lipofílicos. Esse fato corrobora com os dados deste trabalho, visto que nas mesmas concentrações, pelo método de DPPH, os óleos essenciais não apresentaram atividade antioxidante.

Diversos métodos de análise antioxidante foram desenvolvidos para avaliação do potencial antioxidante por meio da atividade antirradicalar da substância em estudo. O resultado depende da especificidade do radical pelos reagentes da reação de cada método (ADOM et al., 2002). No presente estudo, pode-se perceber que, dependendo do método utilizado, a atividade antirradicalar foi diferente. De acordo com as análises da porcentagem de captura do óxido nítrico, o óleo essencial de limão-verdadeiro apresentou o maior resultado entre os óleos essenciais (62,53%) (TABELA 2). Já para o teste da porcentagem de inibição do radical hidroxil, o mesmo óleo essencial foi o que apresentou o

menor resultado (13,17%) (TABELA 2). Os resultados acima demonstram a importância da utilização de vários métodos de avaliação da atividade antioxidante, pois métodos diferentes fornecem diferentes resultados. Segundo Becker et al. (2004), diversos fatores influenciam a atividade antioxidante, como a estrutura física do sistema de ensaio, a natureza do substrato para oxidação, a interação entre os compostos utilizados, o modo de iniciar a oxidação, entre outros.

Tabela 2 Atividade antioxidante dos óleos essenciais de *C. aurantifolia*, *C. limon* e *C. sinensis* e dos antioxidantes padrões eugenol e manitol, por meio dos métodos TEAC, capacidade de captura do óxido nítrico e por inibição do radical hidroxil

<b>Óleos Essenciais</b>	<b>TEAC <math>\mu\text{mol mL}^{-1}</math></b>	<b>Captura do Óxido nítrico (%)</b>	<b>Inibição do Radical hidroxil (%)</b>
<i>C. aurantifolia</i>	0,92 A	55,61 A	36,37 C
<i>C. limon</i>	0,86 A	62,53 A	13,17 D
<i>C. sinensis</i>	0,56 B	42,06 B	53,64 B
Eugenol	-	67,91 A	-
Manitol	-	-	58,48 A

Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem significativamente entre si a 5% de probabilidade, pelo teste de Scott-Knott.

Da mesma forma que o método de DPPH, o método do TEAC é baseado no descoramento de uma solução composta por radicais catiônicos  $\text{ABTS}^{\cdot+}$  de cor azul/verde. Esse método é aplicável tanto para antioxidantes lipofílicos, quanto para antioxidantes hidrofílicos (MACDONALD-WICKS et al., 2006). Pode-se perceber pelos resultados do método referido que os óleos essenciais de *C. aurantifolia* e *C. limon* foram os que obtiveram maiores atividades antioxidantes, 0,92 e 0,86  $\mu\text{mol mL}^{-1}$ , respectivamente. O mesmo ocorreu quando se aplicou o método da captura do óxido nítrico; os óleos essenciais de

*C. aurantifolia* (55,61%) e *C. limon* (62,53%) foram os que obtiveram maiores atividades antioxidantes.

Estudando o óleo essencial de *Citrus unshiu*, obtido das cascas do fruto, resíduo de uma companhia de processamento de alimentos, Yang et al. (2009) encontraram resultados elevados também diante do ensaio da captura do radical óxido nítrico. Os autores encontraram valores acima de 35% para as concentrações que variaram de 6,125  $\mu\text{g mL}^{-1}$  a 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Esse potencial está diretamente ligado à atividade anti-inflamatória, pois o NO participa do processo inflamatório, sendo um potente vasodilatador (CERQUEIRA & YOSHIDA, 2002). Yoon et al. (2009), avaliando o óleo essencial de *Abies koreana*, que apresentou como componentes majoritários o limoneno e o acetato de bornila, encontraram também um efeito inibitório sobre o mediador pró-inflamatório óxido nítrico.

A atividade anti-inflamatória pode ser avaliada também por meio da atividade da enzima lipoxigenase. Essa enzima catalisa a adição de uma molécula de oxigênio a ácidos graxos insaturados formando peróxidos, iniciando, assim, a deterioração oxidativa. Mais precisamente, essa enzima participa da formação da cascata do ácido araquidônico (composto lipídico), formando, assim, produtos responsáveis pela ação pró-inflamatória (WEI; SHIBAMOTO, 2010).

De acordo com os resultados encontrados neste trabalho (FIGURA 4), observou-se que os três óleos essenciais do gênero *Citrus*, na concentração de 10 $\mu\text{L mL}^{-1}$ , apresentaram alta atividade inibitória da enzima lipoxigenase, indicando um elevado efeito antioxidante e anti-inflamatório, similar ao padrão NDGA (0,03  $\text{mg mL}^{-1}$ ), que é um composto conhecido inibidor da enzima lipoxigenase (BLECHA et al., 2007).

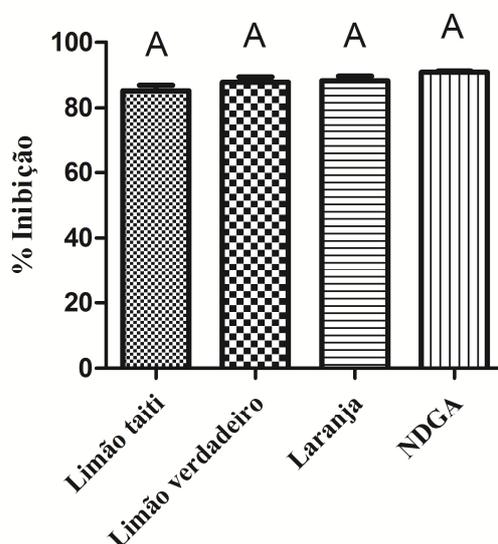


Figura 4 Percentual da inibição da enzima lipoxigenase diante dos óleos essenciais de limão-taiti, limão-verdadeiro e laranja. Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si a 5% de probabilidade, pelo teste de Scott-Knott.

Wei e Shibamoto (2010), estudando o efeito anti-inflamatório de 20 óleos essenciais comerciais, encontraram também uma elevada atividade sobre a enzima lipoxigenase. O óleo essencial de *Citrus aurantium*, que apresentou como componente majoritário o composto limoneno (93%), na concentração de  $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ , apresentou uma porcentagem de atividade anti-inflamatória de aproximadamente 20%. Corroborando com o trabalho, Baylac e Racine (2003), avaliando a inibição da enzima lipoxigenase por meio de alguns óleos essenciais e extratos aromatizantes, encontraram para os óleos essenciais de *C. sinensis*, *C. limon* e para o padrão NDGA uma forte atividade inibitória da enzima e, conseqüentemente, forte atividade anti-inflamatória.

A oxidação lipídica foi avaliada utilizando mais de um método, pois essa oxidação ocorre em várias etapas, produzindo, assim, diversas substâncias. No

ensaio que avalia a atividade antioxidante sobre a formação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico, todos os óleos essenciais em estudo apresentaram um efeito pró-oxidante, ou seja, além de não protegerem o substrato lipídico da oxidação, eles se oxidaram (FIGURA 5). Em outras palavras, os componentes químicos dos óleos essenciais foram oxidados, formando, assim, compostos reativos com o ácido tiobarbitúrico, resultado em atividades antioxidantes negativas.

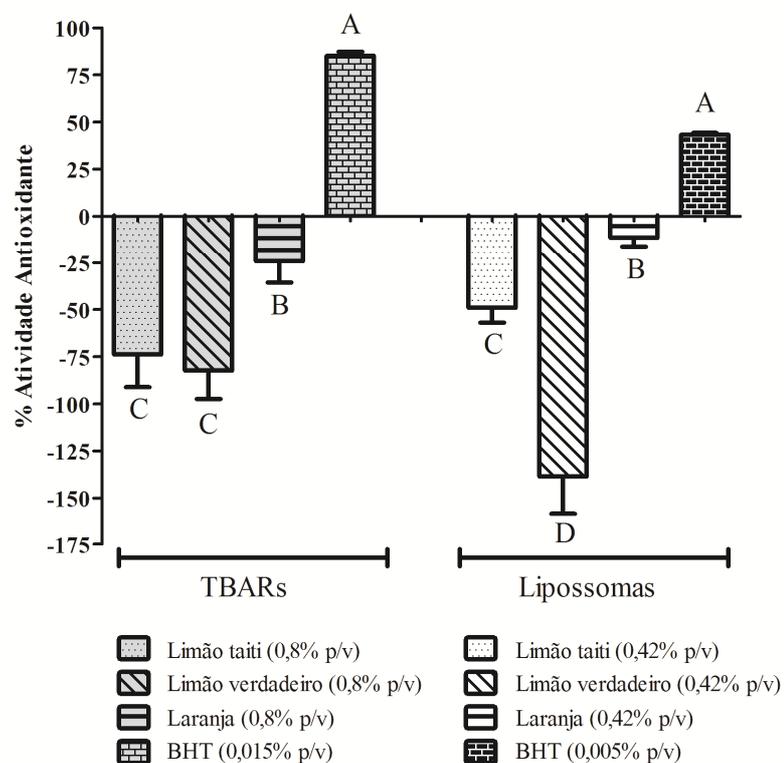


Figura 5 Percentual da atividade antioxidante dos óleos essenciais de limão-taiti, limão-verdadeiro e laranja por meio dos métodos TBARs e lipossomas. Médias seguidas da mesma letra, não diferem significativamente entre si a 5% de probabilidade, pelo teste de Scott-Knott.

Corroborando com os dados deste trabalho, Baratta et al. (1998), avaliando as propriedades antioxidantes de alguns óleos essenciais comerciais, também observaram que o óleo essencial de limão nas concentrações de 500, 750 e 1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$  apresentou uma atividade pró-oxidante diante do método TBARs.

Da mesma forma que o método TBARs, observou-se para o método lipossomas uma atividade pró-oxidante dos três óleos essenciais. Isso já era esperado, pois as condições dos dois ensaios foram similares e o que variou foi apenas a fonte lipídica (FIGURA 5).

Avaliou-se também a atividade antioxidante por meio da redução de Molibdênio (VI) para Molibdênio (V). A solução-teste inicial apresentou coloração amarela, tornando-se verde à medida que a solução de fosfato de molibdênio se reduziu com a ação do antioxidante. De acordo com os resultados, do limão-taiti (0,09  $\text{g mL}^{-1}$ ), limão-verdadeiro (0,06  $\text{g mL}^{-1}$ ) e laranja (0,08  $\text{g mL}^{-1}$ ), observou-se, por meio da análise de variância, que não houve diferença significativa ( $P < 0,05$ ) entre os óleos essenciais analisados. Ozkan, Simsek e Kuleasan (2007), estudando a atividade antioxidante do óleo essencial de *Satureja cilicica* in vitro, utilizando o método de redução do molibdênio, observou uma maior atividade antioxidante, aproximadamente 100 vezes maior que a do presente trabalho. Isso pode ser explicado pelo fato de o óleo essencial de *S. cilicica* apresentar diferentes componentes majoritários, como o timol (22.76%) e carvacrol (18.90%), que são compostos com excelentes atividades antioxidantes já relatadas na literatura (GUIMARÃES et al., 2010; KULISIC et al., 2004).

#### 4 CONCLUSÕES

Pode-se observar que os três óleos essenciais testados apresentaram atividade antioxidante positiva nas metodologias do  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico, TEAC, capacidade de remoção do óxido nítrico, inibição do radical hidroxil, inibição da atividade da lipoxigenase e fosfomolibdênio. Já para os testes da captura do radical livre DPPH, TBARS e lipossomas, não ocorreu atividade antioxidante, havendo ainda nos dois últimos testes uma ação pró-oxidante. Essa diferença entre os resultados das metodologias utilizadas pode ser devido a diversos fatores, como a diversidade de substâncias existentes na composição química do óleo essencial, a estrutura física do sistema de ensaio, a natureza do substrato para oxidação, a interação entre os compostos utilizados, o modo de iniciar a oxidação, entre outros. Portanto, uma abordagem com múltiplos ensaios é altamente aconselhável, garantindo, assim, uma melhor comparação dos resultados e abrangendo uma vasta gama de aplicações possíveis.

**REFERÊNCIAS**

ADAMS, R. P. **Identification of essential oils components by gas chromatography/mass spectroscopy**. 4th ed. Carol Stream: Allured, 2007. 804 p.

ADOM, K.K; LIU, R.H. Antioxidant activity of grains. **Journal Agriculture Food Chemistry**, London, v.50, n.21, p.6182-6187, 2002.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ. **Farmacopeia brasileira**. 5. ed. São Paulo, 2010. 1, p. 198-199.

ANDRADE, M. A. et al. Chemical Composition and Antioxidant Activity of Essential Oils from *Cinnamodendron dinisii* Schwacke and *Siparuna guianensis* Aublet. **Antioxidants**, Basel, v. 2, n. 4, p. 384-397, 2013.

ANTUNES, M.D.C. et al. Effects of posthar-vest application of 1-MCP and postcutting dip treatment on the quality and nutritional properties of fresh-cut kiwifruit. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Davis, v.58, p. 6173–6181, 2010.

BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 46, n. 2, p. 446-475, 2008.

BARATTA, M. T. et al. Antimicrobial and antioxidant properties of some commercial essential oils. **Flavour and Fragrance Journal**, Chichester, v.13, n. 4, p. 235-244, 1998.

BASU, S. & HAZRA, B. Evaluation of nitric oxide scavenging activity, in vitro and ex vivo, of selected medicinal plants traditionally used in inflammatory diseases. **Phytotherapy research**, London, v. 20, n. 10, p. 896-900, 2006.

BAYLAC, S.; RACINE, P. Inhibition of 5-lipoxygenase by essential oils and other natural fragrant extracts. **International Journal of Aromatherapy**, Cambridge, v. 13, n. 2, p. 138-142, 2003.

BECKER, E. M.; NISSEN, L. R.; SKIBSTED, L. H. Antioxidant evaluation protocols: Food quality or health effects. **European Food Research and Technology**, Berlin, v. 219, n. 6, p. 561-571, 2004.

BIZZO, H. R.; HOVELL, A. N.; REZENDE, C. M. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 3, p. 588-594, maio/jun. 2009.

BLECHA, J. E. et al. Inhibition of IGF-1R and lipoxygenase by nordihydroguaiaretic acid (NDGA) analogs. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, New York, v. 17, n. 14, p. 4026-4029, 2007.

BOULANOUAR, B. et al. Antioxidant activities of eight Algerian plant extracts and two essential oils. **Industrial Crops and Products**, v. 46, p. 85-96, 2013.

BOUNATIROU, S. et al. Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities of the essential oils isolated from Tunisian *Thymus capitatus* Hoff. et Link. **Food chemistry**, London, v. 105, n. 1, p. 146-155, 2007.

CERQUEIRA, N. F.; YOSHIDA, W. B. Óxido nítrico: revisão. **Acta Cirúrgica Brasileira**, São Paulo, v. 17, p. 417-423, 2002.

CHOI, H. S. et al. Radical-scavenging activities of citrus essential oils and their components: detection using 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Davis, v. 48, n. 9, p. 4156-4161, 2000.

DANDLEN, S. A. et al. Antioxidant activity of six Portuguese thyme species essential oils. **Flavour and fragrance journal**, Chichester, v. 25, n. 3, p. 150-155, 2010.

DURÁN R. M.; PADILLA, R. B. Actividad antioxidante de los compuestos fenólicos. **Grasas y Aceites**, Sevilla, v.44, n.2, p.101-106, 1993.

FARMACOPEIA BRASILEIRA, BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Farmacopeia brasileira. 5. ed. Brasília: Anvisa, 2010. v. 1, p. 198-199.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, 2011.

GOMES, M. S. et al. Use of Essential Oils of the Genus Citrus as Biocidal Agents. **American Journal of Plant Sciences**, Delaware, v. 5, p. 299-305, feb. 2014.

GUERREIRO, A. C. et al. The effect of temperature and film covers on the storage ability of *Arbutus unedo* L. fresh fruit. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 159, p. 96-102, 2013.

GUIMARÃES, A. G. et al. Bioassay-guided Evaluation of Antioxidant and Antinociceptive Activities of Carvacrol. **Basic & clinical pharmacology & toxicology**, Copenhagen, v. 107, n. 6, p. 949-957, 2010.

GUIMARAES, L. G. L. et al. Atividades antioxidante e fungitóxicas do óleo essencial de capim-limão e do citral. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 42, p. 464-472, 2011.

KULISIC, T. et al. Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil. **Food chemistry**, London, v. 85, n. 4, p. 633-640, 2004.

LIMA, R. K. et al. Bactericidal and antioxidant activity of essential oils from *Myristica fragrans* Houtt and *Salvia microphylla* HBK. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Chicago, v. 89, n. 3, p. 523-528, 2012.

LOPES-LUTZ, D. et al. Screening of chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of *Artemisia* essential oils. **Phytochemistry**, New York, v. 69, n. 8, p. 1732-1738, 2008.

MACDONALD-WICKS, L. K.; WOOD, L. G.; GARG, M. L. Methodology for the determination of biological antioxidant capacity in vitro: a review. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 86, n. 13, p. 2046-2056, 2006.

MIGUEL, M. G. Antioxidant activity of medicinal and aromatic plants. A review. **Flavour and fragrance journal**, Chichester, v. 25, n. 5, p. 291-312, 2010.

MIGUEL, M. G. et al. Antioxidant, anti-inflammatory and acetylcholinesterase inhibitory activities of propolis from different regions of Morocco. **Food Science and Biotechnology**, Seoul, v. 23, p. 313-322, 2014.

OLIVEIRA, A.C. et al. Fontes vegetais naturais de antioxidantes. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 3, 2009.

OZKAN, G.; SIMSEK, B.; KULEASAN, H.. Antioxidant activities of *Satureja cilicica* essential oil in butter and in vitro. **Journal of food engineering**, Essex, v. 79, n. 4, p. 1391-1396, 2007.

PRIETO, P.; PINEDA, M.; AGUILAR, M. Spectrophotometric Quantitation of Antioxidant Capacity through the Formation of a Phosphomolybdenum

Complex: Specific Application to the Determination of Vitamin E1. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 269, p. 337–341, 1999.

SACCHETTI, G. et al. Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. **Food Chemistry**, London, v. 91, n. 4, p. 621-632, 2005.

TEPE, B.; DAFERERA, D.; SOKMEN, A.; SOKMEN, M.; POLISSIOU, M. Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and various extracts of *Salvia tomentosa* Miller (Lamiaceae). **Food Chemistry**, London, v. 90, p. 333–340, 2005.

WEI, A.; SHIBAMOTO, T. Antioxidant/lipoxygenase inhibitory activities and chemical compositions of selected essential oils. **Journal of agricultural and food chemistry**, Davis, v. 58, n. 12, p. 7218-7225, 2010.

YANG, E. J. et al. Essential oil of citrus fruit waste attenuates LPS-induced nitric oxide production and inhibits the growth of skin pathogens. **International Journal of Agriculture & Biology**, Beijing, v. 11, p. 791-794, 2009.

YOON, W. J. et al. *Abies koreana* essential oil inhibits drug-resistant skin pathogen growth and LPS-induced inflammatory effects of murine macrophage. **Lipids**, Champaign, v. 44, p. 471-476, 2009.