ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO ÓLEO ESSENCIAL EXTRAÍDO DA CASCA DA LARANJA PÊRA FRENTE ÀS BACTÉRIAS DA FAMÍLIA ENTEROBACTEREACEA

Ana Luísa Ribeiro Martins GOULART, Hellen Gonçalves VIEIRA, Júlia Candido MAGALHÃES, Maria Isadora Pereira LIMA & Jessica Rohem Gualberto CRETON*

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Fluminense, campus Itaperuna, Rio de Janeiro, Brasil.

*Autor para correspondência: jessica.creton@iff.edu.br

DOI: <http://dx.doi.org/10.18571/acbm.178>

RESUMO

Óleos essenciais são compostos voláteis extraídos de uma grande variedade de plantas e frutos e caracterizam-se por terem alto ponto de ebulição, além de sabor e odor característicos. Para extrair esses compostos voláteis, são usadas diversas técnicas, porém a mais utilizada é a destilação por arraste a vapor. Dentre os compostos mais extraídos atualmente temos o eugenol – obtido do cravo da índia ou manjerição, o timol – orégano e o limoneno – laranja e alguns outros frutos cítricos. O óleo essencial obtido da casca da laranja pêra é constituído de cerca de 90% de limoneno (C₁₀H₁₆) – hidrocarboneto cíclico insaturado pertencente à família dos terpenos, que apresenta odor cítrico e aparência incolor. Os OES apresentam grande utilidade nas indústrias farmacêuticas e alimentícia, além de possuírem atividade contra certos microrganismos da família Enterobacteraceae como, por exemplo, a bactéria *Escherichia Coli* – bactéria gram-negativa responsável por infecções urinárias. Comumente, o óleo essencial obtido nesse procedimento possui certa quantidade de água, o que torna necessário uma extração com solventes orgânicos para que se tenha um óleo com maior teor de pureza. Este trabalho teve por objetivo investigar a atividade antibacteriana do limoneno extraído da casca da laranja pêra, comprada em supermercados do Município de Itaperuna, por meio da destilação por arraste a vapor.

Palavras-chave: Limoneno; Óleo Essencial; Antibactericida.

ABSTRACT

Essential Oils are volatile compounds extracted from a wide variety of plants and fruits and are characterized by a high boiling point and a characteristic taste and odor. In order to extract these volatile compounds, several techniques are used, but steam distillation is the most common. Among the most extracted compounds is eugenol - obtained from clove or basil, thymol - oregano and limonene - orange and some other citrus fruits. The essential oil obtained from the pear orange peel is composed of about 90% limonene (C₁₀H₁₆) - an unsaturated cyclic hydrocarbon compound belonging to the family of terpenes, which has a citrus odor and a colorless appearance. OES have great utility in the pharmaceutical and food industries, other than having effects against certain microorganisms such as *Escherichia coli* - gram-negative bacteria belonging to the family Enterobacteraceae - responsible for urinary and intestinal infections. Usually, the essential oil obtained in this procedure has a certain amount of water, which must be extracted with organic solvents to have an oil with higher purity. The objective of this work was to investigate the antibacterial activity of limonene extracted from the peel of the orange pear, purchased in supermarkets in the municipality of Itaperuna, by steam distillation.

Keywords: Limonene; Essential Oils; Antibactericide.

1 Introdução

Os óleos essenciais (OES) são obtidos de flores, cascas de frutos, folhas, cascas de árvore, raízes, sementes e entre outros, estes possuem em sua estrutura compostos predominantemente com alto ponto de ebulição e volatilidade, caracterizando-se também por outras características singulares como o sabor e odor (SANTURIO et al., 2011; SIMÕES et al., 1999).

A obtenção desses componentes voláteis pode ser realizada por meio de diversas técnicas, tais como a hidrodestilação, a destilação por arraste a vapor, extração a frio e a quente com solvente, CO₂ supercrítico e muitas outras, entretanto os procedimentos mais comuns realizados são a hidrodestilação e a destilação por arraste a vapor (CASSEL e VARGAS, 2006; FRANCO et al., 2005; SCHANBERG KHAN, 2002). Esta última foi a técnica escolhida para realização deste trabalho.

O óleo essencial obtido da casca da laranja pêra, cujo constituinte principal é o limoneno (C₁₀H₁₆) (Figura 1), institui uma matéria-prima de grande importância na área industrial, utilizado na produção de cosméticos, na indústria farmacêutica e alimentícia, sendo geralmente o componente de ação terapêutica das plantas medicinais. (SILVA et al., 2014). Dentre suas ações medicinais, temos sua ação inibitória sobre bactérias do tipo *Escherichia Coli* e *Staphylococcus aureus*, cujo efeito inibitório está relacionado, principalmente a alteração da permeabilidade e integridade da membrana celular bacteriana (LAMBERT et al., 2001; TRAJANO et al., 2009).

Figura 1: Estrutura do Limoneno.

A família Enterobacteraceae reúne bactérias do tipo bacilo, gram-negativas e que em sua maioria se encontra no organismo humano, seja como constituinte da flora intestinal natural ou como agente infeccioso, causando infecções urinárias, intestinais e septicemia. São compreendidas nesta família 30 gêneros de bactérias, totalizando cerca de 120 espécies diferentes, tendo como principais gêneros da família: *Escherichia*, *Shigella*, *Edwardsiella*, *Salmonella*, *Citrobacter* e *Enterobacter* (ATAIDE e ABADE, 2015; SANTOS et al., 2009).

As bactérias desta família podem também ser encontradas em solo e na água, o que faz com que algumas delas possam contaminar o organismo humano através de sua ingestão. Nem todas as bactérias da família Enterobacteraceae são capazes de causar doenças quando em contato com o organismo. Algumas precisam da presença de determinados parasitas, mas mesmo assim é necessárias boas práticas de higienização de alimentos, evitar o consumo de carnes malcozidas e de água não tratada a fim de evitar o possível contágio de Enterobactérias (ABREU e CABRAL, 2005; MILLEZI et al., 2013).

Por conta disso, o uso do óleo essencial é visto como fonte de prevenção eficaz e de baixo custo contra tais tipos de bactérias pois as cascas de laranja (fonte da matéria-prima para obtenção deste óleo) são geralmente descartadas e não reutilizadas posteriormente. Sendo assim, torna-se um material de fácil acesso e barato para que se produza este óleo a nível industrial.

Desta forma, o trabalho realizado objetivou verificar a ação antibacteriana do óleo essencial obtido da casca da laranja pêra por meio da destilação por arraste a vapor frente às bactérias da família Enterobactereacea.

2 Material e Métodos

2.1 Obtenção da matéria prima para a obtenção do óleo essencial

As laranjas pêra foram compradas em supermercados na cidade de Itaperuna, estado do Rio de Janeiro no período de setembro de 2016 a fevereiro de 2017.

2.2 Extração do óleo essencial da casca da laranja pêra

Após descascadas, as cascas das laranjas pêras foram cortadas em pequenos pedaços, pesadas e então colocadas em um balão volumétrico de fundo redondo de 500 mL.

O processo de destilação por arraste a vapor ocorre pelo fato de a pressão total de vapor de uma mistura de líquidos imiscíveis ser igual à soma da pressão de vapor dos componentes puros individuais, assim uma mistura de compostos com alto ponto de ebulição, como o limoneno que apresenta o ponto de ebulição em torno de 176°C, pode ser destilada à temperatura de aproximadamente 100°C, que é o ponto de ebulição da água. (RUSSEL, 1994).

No processo de destilação por arraste a vapor, um erlenmeyer contendo 500 mL de água destilada, suspenso por um tripé e sustentado por uma placa de amianto que dissipa o calor, é aquecido por meio de uma chama do bico de Bunsen.

O erlenmeyer é vedado com uma rolha perfurada onde se encaixa uma extremidade de uma pequena mangueira de silicone. O aquecimento da água faz com que esta se torne vapor ao chegar a 100° C, este vapor é levado a um balão de fundo redondo de 500 mL, que contém em seu interior as cascas de laranjas pêra já preparadas, por meio da mangueira de silicone que por sua vez, é encaixada em uma entrada da junta conectante ângulo 75°.

A junta conectante de ângulo 75° é ligada a uma junta conectante adaptadora que permite um encaixe para o termômetro, assim a mangueira de silicone segue passando dentro de ambas as juntas. O vapor de água ao entrar em contato com as cascas de laranja arrasta consigo os compostos voláteis contidos nela, que serão posteriormente condensados uma vez que a junta conectante de ângulo 75° está encaixada em uma das extremidades do condensador.

Assim, os componentes voláteis se direcionam ao condensador de bola– em que são ligadas duas mangueiras de alimentação, onde em uma delas entra água fria (parte inferior) e em outra sai água quente (parte superior) – a fim de que passem do estado de vapor para o estado líquido, o que promoverá a formação do óleo essencial desejado, que é coletado em um balão de fundo redondo de 250 mL conectado a outra extremidade do condensador Allihn (bola) por meio de uma unha.

2.3 Confirmação e identificação do limoneno nas amostras obtidas

A fim de confirmar a presença de limoneno nas amostras obtidas durante a extração, pegou-se uma pequena porção da amostra bruta de óleo essencial e realizou-se o teste de Bayer, que consiste no gotejamento de uma solução pouco concentrada de permanganato de potássio (KMnO₄), - neste procedimento foi utilizada uma solução de concentração de 0,0025 mol/L.

Em tal teste, pode-se observar uma possível descoloração da solução de permanganato de potássio, que de rosa passa a ser castanho escuro, confirmando a presença do limoneno na amostra bruta de óleo essencial (GUIMARÃES et al.,2000).

A descoloração da solução de permanganato de potássio (KMnO₄) ocorre quando este reage com compostos insaturados como o limoneno, formando o óxido de manganês IV (MnO₂),

que possui coloração castanha. Na Figura 4, pode-se observar esta reação química, também conhecida como oxidação de alcenos.

Figura 4: Reação entre o limoneno e o permanganato de potássio.

2.4 Purificação do óleo obtido através da purificação com solventes

Com a finalidade de se obter um óleo essencial com maior teor de pureza, realizou-se uma extração múltipla com solvente, que consiste em extrair determinado constituinte de uma fase aquosa através do contato dessa fase com uma fase orgânica, denominada solvente (MORAIS, 2014).

Neste procedimento, o solvente orgânico utilizado foi o hexano (C_6H_{14}) - composto de densidade $0,685g/cm^3$ de concentração 97% v/v. Os volumes de amostra bruta obtidas foram então extraídos resultando em uma fase aquosa e outra fase orgânica (constituente do limoneno e do solvente hexano).

Essa purificação foi feita em triplicata para cada amostra, usando cerca de 15mL de hexano em cada vez. Após esse processo, a mistura obtida de óleo essencial e hexano, foi deixada em repouso na capela por tempo suficiente para ocorrer toda a evaporação do solvente.

2.5 Verificação da atividade antibacteriana do óleo essencial obtido da casca da laranja pêra

Preparou-se uma suspensão de Ágar Eosina Azul de Metileno (EMB) *Himedia*® (35,96 g de Ágar EMB para cada 1000 mL de água destilada) – meio ligeiramente seletivo para bactérias da família Enterobacteriaceae.

O Ágar EMB foi colocado juntamente com a água destilada em um erlenmeyer e aquecido com movimento constante até se obter uma suspensão translúcida levemente arroxeadas então, placas de Petri foram preenchidas com quantidade suficiente desta suspensão.

Em seguida, realizou-se o mesmo procedimento, porém usando o Ágar Nutriente *Himedia*® (28,0 g de Ágar Nutriente para cada 1000 mL de água destilada), levando ao aquecimento nas mesmas condições até se obter uma suspensão translúcida incolor.

Após o plaqueamento, estas foram colocadas na auto-clave com a finalidade de se esterilizar tal material. Ao retirá-las da auto-clave e aguardar seu resfriamento, coletou-se com o uso de um swab bactérias de vasos sanitários dos banheiros do Instituto Federal Fluminense campus Itaperuna.

Após higienização da bancada com uma solução de hipoclorito de concentração 3% v/v e álcool 70%, essas bactérias foram semeadas na placa de Petri contendo meio de cultura EMB por meio do esgotamento simples, a fim de se obter as bactérias desejadas para esse trabalho. Esse meio de cultura foi então deixado na estufa durante 48 horas a uma temperatura de aproximadamente $35,5^{\circ}C$.

Ao obter as bactérias da família Enterobacteriaceae através do meio seletivo EMB, estas foram transferidas para as placas de Petri contendo Ágar Nutriente. Em uma placa colocou-se com o auxílio da alça bacteriológica apenas as bactérias e em outra placa aplicou-se além das bactérias o óleo essencial de modo a cobrir toda a placa de Petri.

Posteriormente, após deixar a placa na estufa sob as mesmas condições já citadas, observou-se visualmente o crescimento de colônias de bactérias desta família.

3 Resultados e discussões

A Tabela 1 apresenta a massa de casca de laranja pêra usada em cada uma das 3 análises. Em cada análise utilizou-se a casca de duas laranjas pêra média.

Tabela 1: Massa das amostras de casca de laranja pêra.

Análise	Massa da amostra (g)
1	84,52 g
2	89,71 g
3	94,27 g

O óleo essencial extraído da casca da laranja pêra é constituído majoritariamente do composto limoneno, sendo este o componente responsável pelo aroma da fruta. Ao avaliar a composição química do óleo obtido, calculou-se um rendimento médio de 1,20%, este rendimento foi calculado considerando o volume da amostra bruta como 100%. Os rendimentos individuais obtidos em cada análise podem ser observados na Tabela 2, assim como os volumes antes e após a extração com solventes. O tempo necessário para que todo o solvente orgânico evaporasse foi de 72 horas.

Tabela 2: Volume das amostras antes e após a extração com solventes, bem como o rendimento obtido.

Análise	Volume (mL) da amostra bruta	Volume (mL) de óleo após a extração	Rendimento
1	37 mL	0,5 mL	1,35%
2	25 mL	0,35 mL	1,40%
3	115 mL	1,00 mL	0,87%

As extrações através da destilação por arraste a vapor duraram cerca de 4 horas. Na Tabela 3, pode-se observar o momento em que a água começou a ferver, atingindo temperatura equivalente a 100°C (temperatura necessária para ocorrer o processo) e o momento em que foram obtidos os primeiros volumes de óleo.

Tabela 3: Detalhes sobre a destilação por arraste a vapor

Análise	Momento que a água atingiu 100°C	Produção da primeira gota de óleo
1	15 minutos após o início	25 minutos após o início
2	40 minutos após o início	54 minutos após o início
3	20 minutos após o início	45 minutos após o início

Observou-se que o início de fervura da água está diretamente relacionado com a potência da chama do bico de Bunsen, pois o volume inicial de água chegará mais rapidamente à temperatura de ebulição quanto maior for a energia disponibilizada pela chama, o que por sua vez interfere diretamente no tempo em que se alcançará o primeiro volume de óleo.

Os volumes obtidos do óleo bruto são bem diferentes. Este fato se deve à vedação realizada entre as conexões do destilador por arraste a vapor. As conexões que ficaram completamente vedadas não apresentaram escapamento de vapor de água ou do composto de interesse, acarretando ao final da destilação um volume maior e maior eficiência do sistema.

Na realização do teste de Bayer, inferiu-se que o limoneno estava presente em todas as amostras brutas de óleo, uma vez que houve a descoloração da solução de permanganato de potássio (KMnO₄) – que se tornou castanho escuro.

As bactérias da família Enterobacteraceae obtidas no meio seletivo EMB, após o crescimento, foram transferidas para as placas de Petri contendo Ágar Nutriente. Em uma placa colocou-se com o auxílio da alça bacteriológica apenas as bactérias (Figura 1A) e em outra placa aplicou-se além das bactérias o óleo essencial de modo a cobrir toda a placa de Petri (Figura 1B).

Figura 7: Meio de cultura Ágar Nutriente com bactérias da família *Enterobacteraceae*: (A) ausência do óleo essencial e (B) presença do óleo essencial.

Nas placas em que não havia óleo essencial (OE), percebeu-se crescimento de bactérias, (Figura 1A) enquanto que nas placas em que havia o OE constatou-se efeito inibitório deste em frente as bactérias (Figura 1B).

Com o crescimento de bactérias da família Enterobacteraceae somente no meio de cultura Ágar Nutriente onde não havia a presença do óleo essencial, comprova-se visualmente a atividade antibacteriana do óleo essencial, limoneno, extraído das cascas de laranjas pêra compradas em supermercados de Itaperuna, RJ, em meios de cultura Ágar Nutriente.

4 Conclusão

Inferiu-se, portanto, que o limoneno sendo o constituinte majoritário, torna-se o responsável pela ação inibitória do óleo essencial da casca da laranja pêra sobre bactérias da família Enterobacteraceae, podendo ser utilizado como antisséptico.

Porém, recomenda-se investigações quanto a concentração de letalidade (concentração mínima inibitória) e a efetividade dessa substância em outras cepas bacterianas.

Sugerem-se novos estudos quanto a atividade antibacteriana de óleos essenciais constituídos de outros compostos frente a diferentes bactérias, visto que estes estudos comprovam a eficácia desses materiais.

5 Referências

ABREU, S. C.; CABRAL, M. M. W. Análises microbiológicas de placas de corte de madeira para identificação de bactérias pertencentes ao grupo das Enterobacteraceae. **Revista Científica da Universidade de Franca**, v. 5, p. 132-138, 2005.

ATAIDE, L. A.; ABADE, S. M. M. Enterobactérias Resistentes a Carbapenêmicos: Estudo em Hospital Universitário. **Journal of infection control**, v. 4, p. 4-18, 2015.

CASSEL, E.; VARGAS, R. M. F. Experiments and modeling of the Cymbopogonwinterianus essential oil extraction by steam distillation. **Journal of the Mexican Chemical Society**, v. 50, p. 126-129, 2006.

FRANCO, J.; NAKASHIMAA, T.; FRANCO, L.; BOLLER, C. Composição química e atividade antimicrobiana in vitro do óleo essencial de Eucalyptuscinerea F. Mull. exBenth., Myrtaceae, extraído em diferentes intervalos de tempo. **Revista brasileira de farmacognosia**, v. 15, p. 191-194, 2005.

GUIMARÃES, P.I.C.; OLIVEIRA, R.E. C.; ABREU, R. G. Extraíndo óleos essenciais de plantas. **Química Nova na Escola**, v. 11, p. 45-46, 2000.

LAMBERT, R. J. W.; SKANDAMIS, P. N.; COOTE, P. J.; NYCHAS, G.-JE. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. **Journal of Applied Microbiology**, v.91, p.453-462, 2001.

MILLEZI, A. F.; BAPTISTA, N. N.; CAIXETA, D. S.; ROSSONI, D. F.; CARDOSO, M. G.; PICOLLI, R. H. Caracterização e atividade antibacteriana de óleos essenciais de plantas condimentares e medicinais contra Staphylococcus aureus e Escherichia coli. **Revista brasileira de plantas medicinais**, v. 15, p. 373-379, 2013.

MORAIS, C. A.; ALBUQUERQUE, R. O.; LADEIRA, A.C.Q. Processos Físicos e Químicos Utilizados na Indústria Mineral. N8, p. 9-17, 2017.

RUSSEL, J. B. **Química Geral**. Vol. 1. 2.ed. São Paulo: Pearson Makron Books, 1994.

SANTOS, A. C. M.; ZIDKO, A.C.M.; PIGNATARI, A.C.C.; GALES, A.C.; SILVA, R. M. A virulência de Escherichia coli patogênica extra-intestinal (ExPEC) em relação à idade e ao sexo do hospedeiro. **O Mundo da Saúde**, v. 33, p. 392-400, 2009.

SANTURIO, D.F.; COSTA, M. M.; MABONI, G.; CAVALHEIRO, C. P.; SÁ, M. F.; POZZO, M.; ALVES, S. H.; FRIES, L. L. M. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais de condimentos frente a amostras de Escherichia coli isoladas de aves e bovinos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 41, p. 1051-1056, 2011.

SCHANEBERG, B.T.; KHAN, I. A. Comparison of extraction methods for marker compounds in the essential oil of lemon grass By GC. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 1345-1349, 2002.

SILVA, F. F. M.; MOURA, L. F.; BARBOSA, P. T.; FERNANDES, A. B. D.; BERTINI, L. M.; ALVES, L. A. Análise da composição química do óleo essencial de capim santo (Cymbopogon citratus) obtido através de extrator por arraste com vapor d'água construído com materiais de fácil aquisição e baixo custo. **HOLOS**, v. 4, p. 144-152, 2014.

SIMÕES, O. M. C.; SCHENKEL, R. P.; GOSMANN, G.; MELLO, P. C. J.; MENTZ, A. L.; PETROVICK, P. R. Farmacognosia da planta medicamento. 6.ed. Florianópolis: Editora da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1999.

TRAJANO, V.N.; LIMA, E. O.; SOUZA, E. L.; TRAVASSOS, A. E. R. Propriedade antibacteriana de óleos essenciais de especiarias sobre bactérias contaminantes de alimentos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, p. 542-545, 2009.