



# Composição química e atividade antimicrobiana do óleo essencial e anatomia foliar e caulinar de *Citrus limettioides* Tanaka (Rutaceae)

Larissa Teodoro Alves Lopes<sup>1</sup>; José Realino de Paula<sup>1\*</sup>; Leonice Manrique Faustino Tresvenzol<sup>1</sup>; Maria Teresa Freitas Bara<sup>1</sup>; Stone de Sá<sup>1</sup>; Pedro Henrique Ferri<sup>2</sup>; Tatiana de Sousa Fiuza<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Goiás

<sup>2</sup>Instituto de Química, Universidade Federal de Goiás

<sup>3</sup>Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás

## RESUMO

*Citrus limettioides* (Rutaceae) é utilizada popularmente para tratamento da sinusite, e também como antitérmica e hipotensora. Este trabalho teve como objetivos: identificar os constituintes dos óleos essenciais da folha e da casca dos frutos de *C. limettioides*; avaliar a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais da folha e da casca dos frutos e realizar o estudo anatômico da folha e caule jovem. Os óleos essenciais foram obtidos por hidrodestilação em aparelho de Clevenger modificado e analisados por CG-EM. A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada utilizando o método de microdiluição em caldo frente a bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e fungos. Para o estudo anatômico foram realizados cortes histológicos a mão livre e as secções foram coradas com azul de Alcian/safranina, reagente de Steinmetz, lugol e analisados em microscopia de luz. O linalol foi o componente majoritário no óleo essencial das folhas (36,88 a 45,15%) e o limoneno no óleo da casca dos frutos (70,60 a 75,18%). O óleo essencial das folhas apresentou CIM de 2000 µg/mL frente às bactérias e nenhuma atividade frente aos fungos. O óleo essencial da casca dos frutos não apresentou atividade antimicrobiana. A folha é hipostomática, predominando os estômatos anomocíticos; o mesofilo é dorsiventral com parênquima paliádico bisseriado e parênquima lacunoso com 11 camadas de células. Cavidades secretoras foram observadas no mesofilo da folha, no pecíolo e no caule, enquanto cristais prismáticos foram identificados em todas as estruturas da folha e do caule. Os dados obtidos no estudo microscópico podem auxiliar na identificação taxonômica desta planta e na avaliação da autenticidade da droga vegetal.

**Palavras-chave:** *Citrus limettioides*. Estudo anatômico. Óleos essenciais. Controle de qualidade. Atividade antimicrobiana.

## INTRODUÇÃO

A família Rutaceae possui 156 gêneros e 1.800 espécies distribuídas por todo o mundo, especialmente em regiões tropicais e temperadas (Costa et al., 2010). Os membros da família Rutaceae são fortemente aromáticos devido à presença de óleos essenciais e possuem importância considerável como fonte de frutas cítricas e algumas ornamentais. Pertencem a essa família os gêneros *Citrus*, *Zanthoxylum*, *Ruta*, *Ptelea*, *Murraya* e *Fortunella* (Perveen & Qaiser, 2005).

Nesta família diversas espécies apresentam constituintes com atividades antimicrobianas e citotóxicas, como *Citrus reticulata* Blanco (Chutia et al., 2009; Yi et al., 2008), *C. sinensis* L. Osbeck, *C. aurantium* L., *C. deliciosa* Tenore, *C. paradisi* Macfad, *C. limon* (L.) Burm.f. (Caccioni et al., 1998), *Ruta graveolens* L. (Ivanova et al., 2005), *Zanthoxylum xanthoxyloides* (Lam.) Waterman (Ngassoum et al., 2003) e *Z. budrunga* Wall (Islam et al., 2001).

*Citrus limettioides* Tanaka é conhecida popularmente como lima-de-bico, lima-doce ou lima-da-pérsia (Lorenzi et al., 2006). Essa espécie pode ser arbustiva ou arbórea, com folhas serrilhadas semelhantes às da laranja, mas de coloração mais pálida; glândulas de óleo proeminentes e pecíolos levemente alados. As flores são brancas e se distribuem isoladamente nas axilas das folhas ou em conjuntos de 2 a 10, nas regiões terminais dos galhos. Os frutos são ovóides, com base arredondada e bico pequeno no ápice, as cascas são ligeiramente rugosas, aromáticas, coloração esverdeada para amarelo-laranja. Os frutos, quando maduros, apresentam polpa amarelo-pálido, geralmente em 10 segmentos, macio, muito suculento, não ácido e levemente amargo (Morton, 1987).

Na Índia o fruto de *C. limettioides* é consumido fresco, cozido e preservado, sendo empregado na medicina popular para reduzir a pressão arterial. No Brasil, é indicado para tratar problemas respiratórios (Viganó et al., 2007), como antitérmico e no tratamento de sinusite (Morton, 1987).

Vasudeva & Sharma (2012) identificaram no óleo das cascas de *C. limettioides* coletadas em Hisa (Índia) 14 compostos químicos, sendo os majoritários o dl-limoneno (89,08%), o β-mirceno (2,93%) e o linalol (2,92%). Por

meio do método de difusão e microdiluição em caldo, verificaram atividade antimicrobiana e antifúngica do óleo essencial das cascas dos frutos com concentração inibitória mínima (CIM) variando de 3,12 µl/ml a 50 µl/ml.

O uso popular da casca do fruto de *C. limettioides* para o tratamento da sinusite e a boa atividade antimicrobiana relatada por Vasudeva & Sharma (2012), motivou este estudo, com amostras coletadas no Brasil.

Segundo a Farmacopeia Brasileira (Brasil, 2010), a identidade, pureza e qualidade de um material vegetal devem ser estabelecidas mediante análises macro e microscópicas. A recomendação é que o material vegetal seja comparado com matéria prima autêntica oriunda de amostra perfeitamente identificada na farmacopeia, pois a autenticidade é o primeiro parâmetro de qualidade de uma droga vegetal.

Para espécies que ainda não estão descritas na farmacopeia, como a *C. limettioides*, mas que são utilizadas popularmente no tratamento de algumas enfermidades, é necessário estabelecer parâmetros para a identificação da planta, bem como da droga vegetal.

Assim, este trabalho teve como objetivos: analisar a composição e variabilidade química dos óleos essenciais da folha e da casca dos frutos de *C. limettioides*, coletados em três cidades de Goiás; avaliar a atividade antimicrobiana do óleo essencial da folha e cascas dos frutos coletados em Nova América/GO; estudar anatomicamente folha e caule jovem de *C. limettioides*, visando contribuir para a identificação taxonômica dessa espécie.

## METODOLOGIA

O material botânico, constituído por folhas, ramos caulinares jovens e cascas dos frutos foi coletado na cidade de Nova América (51,5° 02' 48,4" S e 40° 52' 41,7" W a 635m de altitude), Campestre (16° 46' 01" S e 49° 42' 06" W a 612m de altitude) e Itapuranga (15° 33' 37" S e 49° 56' 39,1" W a 595m de altitude), Estado de Goiás. O material foi identificado pelo professor Doutor José Realino de Paula e uma exsicata foi depositada no herbário da Universidade Federal de Goiás, sob registro nº 41495.

### Obtenção dos óleos essenciais

O material botânico constituído por folhas e cascas dos frutos de *C. limettioides* foi secado à temperatura ambiente, triturado, pesado e submetido, separadamente, à hidrodestilação em um aparelho de Clevenger modificado, por duas horas para obtenção dos óleos essenciais (Adams, 2007; Van Den Dool & Kratz, 1963). O volume de óleo essencial foi medido no tubo graduado do próprio aparelho e o rendimento, em porcentagem, calculado em relação à quantidade inicial de material botânico empregado na extração.

Os óleos essenciais foram analisados por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG/EM), em aparelho Shimadzu modelo QP505A equipado com coluna capilar de sílica fundida (SBP-5, 30m x 0,25mm x 0,25µm), mantendo-se um fluxo de 1 mL/min de hélio, como gás de arraste, e aquecimento com temperatura programada (60°-240°C a 3°C/min; 280°C a 10°C/min e 10 min a 280°C), volume de injeção de 1mL (amostras

diluídas em CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) no modo Split, com uma razão de 1:5 e temperatura do injetor de 225°C. O espectrômetro de massa operou com os seguintes parâmetros: detector de ionização de chama com temperatura de 250°C; energia de ionização de 70 eV, com intervalo de massa entre 40-350 m/z.

A identificação dos componentes do óleo foi baseada no índice de retenção linear (Índice de Kovats), calculado em relação ao tempo de retenção de uma série homóloga de n-alcenos (C<sub>8</sub>-C<sub>32</sub>) (Van Den Dool & Kratz, 1963) e no padrão de fragmentação observados nos espectros de massa, por comparação com amostras autênticas, dados retirados da literatura (Adams, 2007) ou por comparação com uma base de dados-MS computadorizada utilizando a biblioteca NIST.

Para verificar a variabilidade química entre os compostos químicos dos óleos essenciais identificados nas amostras foi utilizado ANOVA comparando os constituintes químicos das amostras das três cidades, com valores de  $p \leq 0,05$  considerados estatisticamente significantes.

### Avaliação da atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana dos óleos essenciais da folha e da casca do fruto das amostras coletadas em Nova América foi avaliada, através da determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM), utilizando o teste de microdiluição seriada em caldo. O ensaio foi realizado conforme descrito pelo CLSI (*Clinical and Laboratory Standart Institute*) para testes de susceptibilidade antimicrobiana de bactérias (aeróbicas) e testes de diluição em caldo para os fungos (CLSI, 2008) utilizando cepas padrão *American Type Culture Collection* (ATCC) e isolados clínicos, conservados no Laboratório de Bacteriologia Médica e no Laboratório de Micologia, do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás.

Nos ensaios foram utilizadas as bactérias Gram-positivas: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *S. aureus* ATCC 6538, *S. epidermidis* ATCC 1229, *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *M. roseus* ATCC 1740; bactérias Gram-positivas esporuladas: *Bacillus cereus* ATCC 14579, *B. subtilis* ATCC 6633; bactérias Gram-negativas: *Escherichia coli* ATCC 11229, *E. coli* 8739, *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048, *E. cloacae* HMA/FT 502, *Serratia marcescens* ATCC 14756, *Salmonella* spp ATCC19430, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *P. aeruginosa* SPM1 e os fungos: *Candida albicans* 02, *C. parapsilosis* 11A, *C. parapsilosis* ATCC 22019, *Cryptococcus neoformans* ATCC 28957, *C. neoformans* var. *gatti*, *C. neoformans* var. *neoformans* L2.

As bactérias foram reativadas por repique em caldo Casoy e, posteriormente em Ágar Casoy inclinado, sendo incubadas a 37°C por 24h. Os fungos foram repicados diretamente em Ágar Sabouraud Dextrose e incubados à temperatura ambiente por 24h às 48h (*Candida* spp) ou por 48h às 72h (*Cryptococcus* sp).

### Determinação da CIM para as bactérias

O meio de cultura utilizado foi o caldo Müller Hinton (MH). Em microplacas estéreis de 96 orifícios com

fundo em “U”, providas de tampa, foram colocados 100 µL de caldo Müller Hinton (MH) em todos os orifícios das colunas 2 a 12. Na coluna 1, da letra A a G foram colocados 200 µL das amostras (óleos essenciais acrescidos de 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) e 0,02% de Tween 80®). Com o auxílio de uma pipeta multicanal, foram realizadas diluições seriadas até a coluna 11, de onde foram descartados 100 µL, obtendo-se concentração de 2000 µg/mL a 1,95 µg/mL. Na linha H foram colocados 200 µL de caldo MH contendo 10% de DMSO e 0,02% de Tween 80® como controle do DMSO e do Tween. Na coluna 12, apenas caldo MH (controle do crescimento microbiano).

Os inóculos bacterianos foram preparados em solução salina estéril (NaCl 0,85%), de modo a se obter uma turvação correspondente à metade da escala 1 de McFarland (leitura em espectrofotômetro a 625 nm com 79,4% a 83,2% de transmitância). Posteriormente, esses inóculos foram diluídos 1:10 em salina, de forma a obter-se uma concentração de células de 10<sup>7</sup> UFC/mL. Em seguida, 5 µL dos inóculos, foram colocados nos orifícios, obtendo-se concentração final de 5 x 10<sup>5</sup> UFC/mL. Nos orifícios da linha G não foram adicionados os microrganismos, pois serviram como controle de esterilidade do meio e das amostras testadas. O experimento foi realizado em duplicata.

Após as inoculações, as microplacas foram tampadas e incubadas a 35°C ± 2°C por 18-24h. Após o período de incubação, foram acrescentados em todos os orifícios 20 µL de cloreto de trifeniltetrazolium (TTC) a 0,5%, e as microplacas foram reincubadas por aproximadamente meia hora. O aparecimento de coloração avermelhada foi considerado prova de crescimento bacteriano. A CIM foi definida como a menor concentração da amostra, em µg/mL, capaz de inibir totalmente o crescimento bacteriano. O mesmo procedimento foi realizado com o padrão sintético linalol PA (Sigma).

### Determinação da CIM para fungos

O meio de cultura utilizado neste ensaio foi o RPMI. Em microplacas estéreis de 96 orifícios com fundo em “U”, providas de tampa, foram colocados 100 µL RPMI em todos os orifícios da coluna 2 até a coluna 12. Na coluna 1, da letra A a G foram colocados 200 µL das amostras (óleos essenciais acrescido de 10% de DMSO e 0,02% de Tween 80®). Com o auxílio de uma pipeta multicanal, foram realizadas diluições seriadas até a coluna 11, de onde foram descartados 100 µL. Adicionou-se 100 µL de cada inóculo nos orifícios, obtendo-se concentração das amostras de 1000 µg/mL a 0,97 µg/mL. Nos orifícios da linha G não foram adicionados os microrganismos, pois serviram como controle de esterilidade do meio e das amostras testadas.

Os inóculos fúngicos foram preparados em solução salina estéril (NaCl 0,85%) suspendendo-os até obtenção de uma turvação correspondente à metade da escala 1 de McFarland (leitura em espectrofotômetro a 530 nm com 83,2% a 85% de transmitância). Posteriormente, foi preparada uma primeira diluição 1:50 e uma segunda diluição de 1:20 ambas em RPMI, de forma a obter uma concentração de células entre 1 a 5 x 10<sup>5</sup> UFC/mL. A diluição final dos inóculos nos orifícios foi de 0,5-0,25 x 10<sup>3</sup> UFC/mL. O experimento foi realizado em duplicata. O

mesmo procedimento foi realizado com o padrão sintético linalol PA (Sigma).

Após as inoculações, as microplacas foram tampadas e incubadas à temperatura ambiente por 48 h para espécies de *Candida* e por 72 h para espécie de *Cryptococcus*. A ocorrência de crescimento fúngico foi verificada visualmente.

### Estudo anatômico

O material botânico constituído por folhas e ramos caulinares jovens foi fixado em FPA 70 (formaldeído, ácido propiônico, álcool etílico 70%) por 48 h e posteriormente conservado em etanol a 70% (Berlyn et al., 1976).

Os cortes transversais e paradérmicos foram realizados à mão livre. Em secção paradérmica, foram realizados cortes da epiderme das faces abaxial e adaxial. Em secção transversal, foram feitos cortes dos ramos caulinares jovens (segundo entrenó) e dos pecíolos e da lâmina foliar (do segundo e terceiro nós) (bordos do ápice, do terço médio e da base; internervura e nervura principal do terço médio da folha). Após o clareamento, empregando solução de hipoclorito de sódio, os cortes foram submetidos à coloração pelo azul de Alcian/safranina 9:1 (Bukatsch, 1972 *apud* Kraus & Arduin, 1997), reagente de Steinmetz (Costa, 2001) e lugol (Johansen, 1940).

Para a microscopia de pó as folhas foram dessecadas em estufa com circulação de ar a 40°C e moídas em moinho de facas com peneira de 12 mesh. Uma pequena quantidade do pó foi colocada em uma lâmina, adicionou-se uma gota do reagente de Steinmetz e cobriu-se com lamínula (Costa, 2001).

Para o descolamento da epiderme, fragmentos da folha fresca com aproximadamente 1 cm<sup>2</sup> foram colocados em uma solução contendo água e ácido nítrico na proporção de 1:1 e aquecidos até ebulição. Quando a epiderme começou a se descolar, os fragmentos foram colocados em água destilada e o restante do mesofilo retirado com auxílio de um pincel. Os fragmentos foram corados com azul de metileno 1% ou fucsina 1%, lavados com água destilada e montados entre lâmina e lamínula utilizando glicerina 50% (Ghouse & Yunus, 1972).

O registro fotográfico das estruturas anatômicas dos cortes e do pó foi realizado em fotomicroscópio (Zeiss-Axiostar plus) com máquina fotográfica digital acoplada (Canon Power Shot G10), utilizando o programa Axion Vision 4.8.

## RESULTADOS

### Óleos essenciais

O linalol foi o componente majoritário do óleo essencial das folhas (36,88% em Campestre, 45,15% em Nova América e 43,41% em Itapuranga) e o limoneno o principal componente do óleo da casca dos frutos (75,06% em Campestre; 75,18% em Nova América e 70,6% em Itapuranga). Os rendimentos dos óleos obtidos da casca dos frutos foram de: 9,9% (Campestre), 10,76% (Nova América) e 5,7% (Itapuranga), enquanto para as folhas

os rendimentos foram: 0,74% (Campestre), 1,02% (Nova América) e 0,81% (Itapuranga). Nas folhas predominaram os monoterpenos oxigenados (variando de 48,38% a 58,18%) e nas cascas dos frutos os hidrocarbonetos monoterpênicos (variando de 76,38% a 83,69%) (Tabela 1).

Tabela 1. Compostos identificados no óleo essencial das folhas e cascas da *Citrus limettioides* e seus respectivos teores expressos em porcentagem.

Constituintes	KI	Folhas			Casca do fruto		
		CA	NA	ITA	CA	NA	ITA
Pineno	939	-	-	-	0,43	0,62	0,34
Sabineno	975	-	-	-	0,49	0,80	0,42
Pineno <math>\alpha</math>-	979	2,87	0,49	-	3,08	4,88	2,96
Mirceno	990	-	2,01	-	1,76	1,92	1,46
Limoneno	1029	21,72	3,54	-	75,06	75,18	70,60
(Z)- $\beta$ -Ocimeno	1037	-	0,80	-	0,12	0,10	0,17
(E)- $\beta$ -Ocimeno	1050	-	1,67	-	0,18	0,17	0,33
Terpinoleno	1088	-	0,41	-	-	0,02	0,10
Linalol	1096	36,88	45,15	43,41	10,03	8,80	11,23
Citronelal	1153	-	1,63	-	-	-	-
Terpinen-4-ol	1177	-	-	-	-	0,22	0,22
$\alpha$ -Terpineol	1188	11,50	8,16	14,77	1,95	1,51	2,58
Octanolacetato	1213	-	-	-	-	0,13	0,12
Formato de Linalol	1216	-	1,70	-	0,29	0,25	0,45
Acetate de Linalol	1257	-	23,66	-	4,90	3,51	5,95
Geranial	1267	-	0,27	-	-	0,18	0,16
Acetato de citroneilil	1352	-	0,07	-	-	-	-
(E)-Cariofileno	1419	-	1,00	-	-	0,14	0,16
$\alpha$ -trans-Bergamoteno	1434	-	0,29	-	-	-	0,31
$\beta$ -Bisaboleno	1505	-	0,41	-	-	0,21	0,51
Hidrocarbonetos monoterpênicos		24,59	8,92	-	81,12	83,69	76,38
Monoterpenos oxigenados		48,38	55,21	58,18	11,98	10,84	14,31
Hidrocarbonetos sesquiterpênicos		-	1,70	-	-	0,35	0,98
Sesquiterpenos oxigenados		-	-	-	-	-	-
Outros		-	25,43	-	5,19	3,76	6,40
Total (%)		72,97	91,26	58,18	98,29	98,64	98,07
Rendimento (% v/p)		0,74	1,02	0,81	9,9	10,76	5,7

CA = Campestre; NA = Nova América; ITA = Itapuranga; (-) = não identificado. KI= Índice de Kovats

Não foi observada variabilidade química significativa entre os componentes majoritários das amostras coletadas nas três cidades, após aplicação da ANOVA.

**Atividade antimicrobiana**

O óleo essencial das folhas inibiu o crescimento de todas as bactérias na concentração de 2000  $\mu\text{g/mL}$ , mas não inibiu o crescimento dos fungos. O óleo essencial das cascas do fruto não mostrou atividade antimicrobiana. O padrão sintético de linalol apresentou CIM de 2000  $\mu\text{g/mL}$  contra a maioria das bactérias, com exceção de *Micrococcus luteus*, *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes* e *E. cloacae* e não inibiu o crescimento dos fungos testados (Tabela 2).

Tabela 2 Concentração Inibitória Mínima ( $\mu\text{g/mL}$ ) observada no teste de suscetibilidade antibacteriana e antifúngica para o óleo essencial das folhas e cascas da *Citrus limettioides*.

Microorganismos	OF	OC	LL
<b>Bactérias Gram-positivas</b>			
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	2000	-	2000
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	2000	-	2000
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12229	2000	-	2000
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 9341	2000	-	-
<i>Micrococcus roseus</i> ATCC 1740	2000	-	2000
<b>Bactéria Gram-positivas esporuladas</b>			
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579	2000	-	2000
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	2000	-	2000
<b>Bactérias Gram-negativas</b>			
<i>Escherichia coli</i> ATCC 11229	2000	-	-
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	2000	-	-
<i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 13048	2000	-	-
<i>Enterobacter cloacae</i> (Isolado clínico) HMA/FT 502	2000	-	-
<i>Serratia marcescens</i> ATCC 14756	2000	-	2000
<i>Salmonella</i> spp ATCC 19430	2000	-	2000
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	2000	-	2000
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (Isolado clínico) SPM1	2000	-	2000
<b>Fungos</b>			
<i>Candida albicans</i> (Isolado clínico) 02	-	-	-
<i>Candida parapsilosis</i> (Isolado clínico) 11A	-	-	-
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019	-	-	-
<i>Cryptococcus neoformans</i> ATCC 28957	-	-	-
<i>Cryptococcus neoformans</i> var. neoformans	-	-	-
<i>Cryptococcus neoformans</i> var. gatti (Isolado clínico)	-	-	-

OF = óleo essencial das folhas, OC = óleo essencial das cascas, LL = óleo essencial do controle linalol e (-) = Sem inibição do crescimento.

**Estudo anatômico**

Em secção paradérmica, a epiderme das faces adaxial e abaxial apresentam células de tamanhos variados, com paredes espessas e onduladas, contendo cristais prismáticos (Figuras 1A, 1B). Os estômatos evidenciados apenas na face abaxial são anomocíticos (Figura 1B).

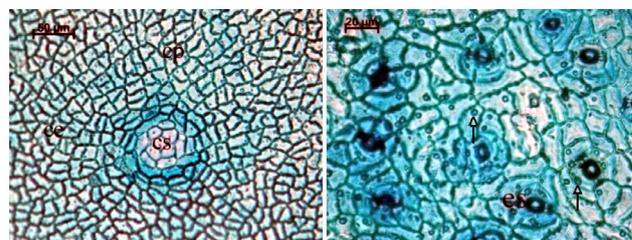


Figura 1. Secções paradérmicas da epiderme das folhas de *Citrus limettioides*. A- face adaxial. B- face abaxial. ce: células epidérmicas; cristais prismáticos (setas); es: estômato anomocítico; cs: cavidade secretora. Coloração: azul de Alcian/safranina.

Em secção transversal, o mesofilo é dorsiventral com epiderme unisseriada, cutícula espessa e idioblastos com cristais prismáticos tanto na epiderme da face adaxial quanto adjacente a ela (Figuras 2A, 2B). O parênquima paliádico é bisseriado, enquanto o lacunoso possui até 11 camadas de células (Figuras 2A, 2B). Cavidades secretoras

são encontradas tanto no parênquima paliçádico próximo à epiderme da face adaxial, quanto no parênquima lacunoso próximo à epiderme da face abaxial (Figuras 1A, 2B). Observa-se sistema vascular do tipo colateral, envolto por bainha, com calota esclerenquimática externa ao floema.

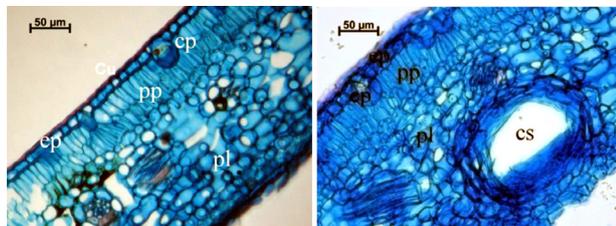


Figura 2. Cortes transversais da região da internervura do terço mediano de *Citrus limettioides*. ep: epiderme; cu: cutícula espessa; pp: parênquima paliçádico; pl: parênquima lacunoso; cp: cristais prismáticos; cs: cavidade secretora. Coloração: azul de Alcian/safranina.

Nos bordos do ápice, do terço médio e da base, a epiderme é unisseriada com cutícula espessa, subjacente à epiderme tem-se o colênquima anular e feixes vasculares envolvidos por anel esclerenquimático (Figura 3A), cavidades secretoras (Figura 3B), e cristais prismáticos próximos à epiderme (Figura 3C).

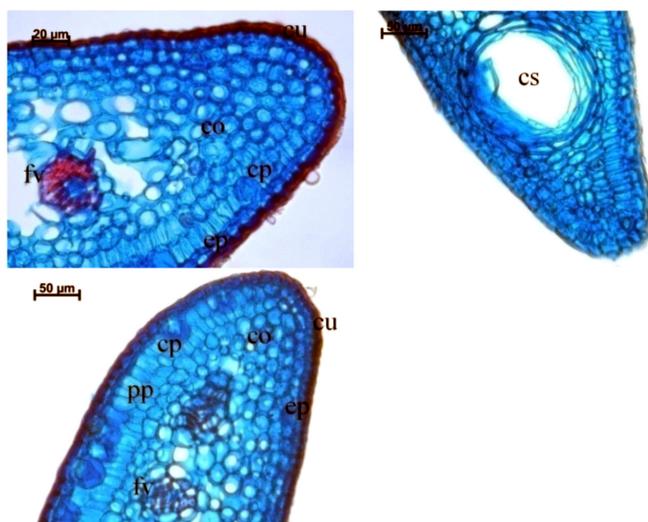


Figura 3. Cortes transversais do bordo foliar de *Citrus limettioides*. A- bordo do ápice. B- bordo do terço mediano. C- bordo da base. cu: cutícula espessa; ep: epiderme unisseriada; cp: cristais prismáticos; co: colênquima; fv: feixe vascular; cs: cavidade secretora; pp: parênquima paliçádico. Coloração: azul de Alcian/safranina.

A nervura principal é biconvexa (Figura 4A). Observou-se epiderme unisseriada, com cristais prismáticos próximos a ela (Figura 4B), seguido de colênquima e parênquima cortical (Figura 4A). O sistema vascular central está disposto de forma circular com floema secundário externo ao xilema secundário e primário, envolto por calotas (Figura 4A) ou bainha esclerenquimática (Figura 4C); o parênquima medular apresenta células de tamanhos variados contendo cristais prismáticos (Figura 4C).

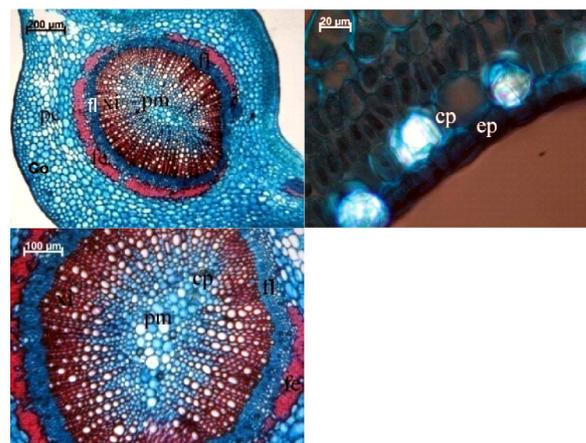


Figura 4. Cortes transversais da nervura principal do terço mediano da folha de *Citrus limettioides*. A- visão geral. B- cristais prismáticos sob luz polarizada. C- feixe vascular central. ep: epiderme unisseriada; cp: cristal prismático; pc: parênquima cortical; fe: fibras esclerenquimáticas; fl: floema secundário; xi: xilema secundário; pm: parênquima medular; Co: colênquima. Coloração: azul de Alcian/safranina.

O pecíolo apresenta formato circular. A epiderme é unisseriada, seguida do colênquima e do parênquima cortical. Observam-se cavidades secretoras próximas à epiderme (Figura 5A) e muitos cristais prismáticos (Figuras 5A e 5C). O sistema vascular central é circular com floema secundário externo ao xilema secundário e primário, envolto por bainha esclerenquimática (Figura 5B). Na região do floema, observam-se cristais prismáticos (Figura 5C). A região medular apresenta células parenquimáticas com formato arredondado, contendo cristais prismáticos (Figura 5A).

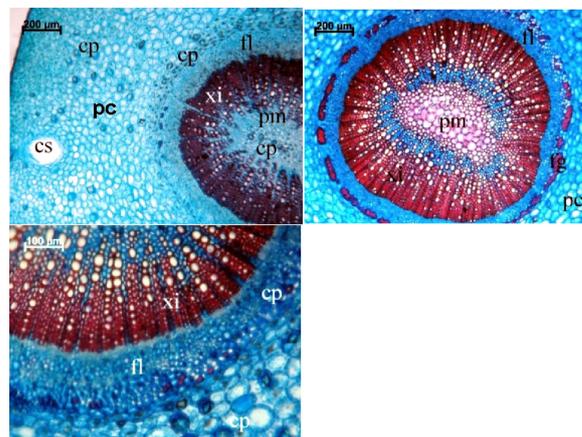


Figura 5. Cortes transversais do pecíolo de *Citrus limettioides*. A- aspecto geral. B- aspecto geral da região central. C- detalhe do feixe vascular central. pc: parênquima cortical; cp: cristais prismáticos; cs: cavidade secretora; fg: fibras gelatinosas; fl: floema secundário; xi: xilema secundário; pm: parênquima medular. Coloração: azul de Alcian/safranina.

O ramo caulinar em crescimento secundário apresenta, em secção transversal, aspecto circular. A epiderme é unisseriada com cutícula delgada (Figura 6A). Observa-se colênquima com até seis camadas de células e parênquima cortical com cristais prismáticos

(Figura 6B), podendo apresentar cavidades secretoras próximas à epiderme (Figura 6A). O floema secundário encontra-se externo ao xilema secundário e primário e contém cristais prismáticos (Figura 6A). Observam-se calotas esclerenquimáticas externas ao floema (Figura 6A). O parênquima medular apresenta células de tamanhos variados (Figuras 6C e 6D) com cristais prismáticos.

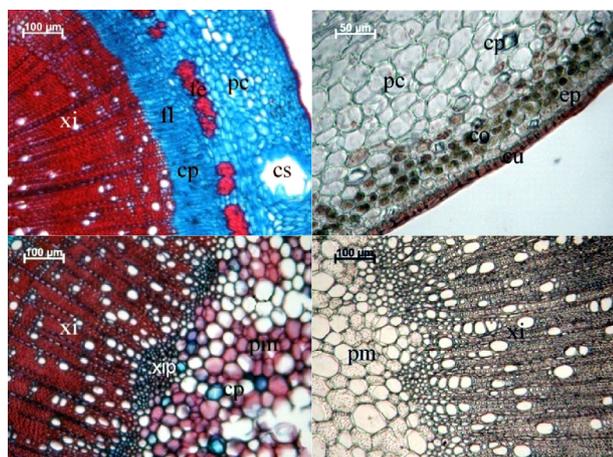


Figura 6. Cortes transversais dos caules de *Citrus limettioides*. A- visão geral do caule. B- epiderme unisseriada. C e D- detalhe do xilema e parênquima medular. cu: cutícula; ep: epiderme unisseriada; co: colênquima; pc: parênquima cortical; cp: cristais prismáticos; cs: cavidade secretora; fe: fibras esclerenquimáticas; fl: floema secundário; xi: xilema secundário; xip: xilema primário; pm: parênquima medular. Coloração 6A e 6C: azul de Alcian/safranina; 6B: Steinmetz e 6D: Lugol.

A análise microscópica do pó das folhas de *C. limettioides* revelou a presença de cristais prismáticos (Figura 7A) e elementos traqueais do xilema primário com espessamento helicoidal (Figura 7B).

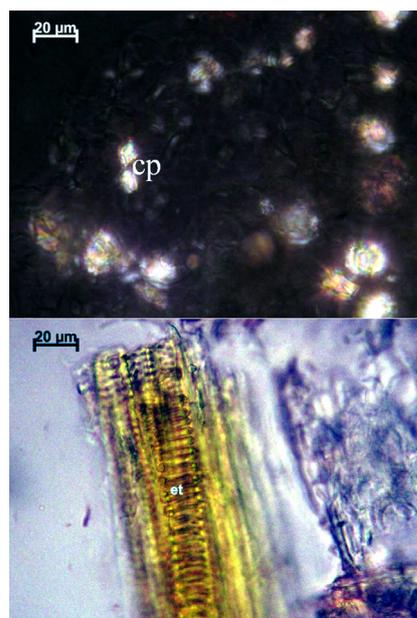


Figura 7. Microscopia do pó das folhas de *Citrus limettioides*. A- cristais prismáticos (cp) sob luz polarizada. B- elemento traqueal do xilema primário com espessamento helicoidal (et). Coloração: Steinmetz.

## DISCUSSÃO

Nos óleos essenciais das folhas de *C. limettioides* coletadas em Nova América, Campestre e Itapuranga (GO), observou-se alta porcentagem de monoterpenos oxigenados, enquanto nos óleos das cascas dos frutos, alta porcentagem de hidrocarbonetos monoterpênicos. Dados semelhantes foram relatados para o óleo das cascas do fruto da *Citrus aurantium* L. por Botelho et al. (2009).

Nesse estudo, o linalol foi o componente majoritário do óleo das folhas coletadas nas três cidades e o segundo componente em maior quantidade nos óleos da casca dos frutos de *C. limettioides*. Esse composto foi encontrado no óleo essencial das folhas da *Teclea nobilis* Delile (1,6%) (Adnan, 2001), da *Zanthoxylum syncarpum* Tull (2-6,7%) (Vieira et al., 2009) e no óleo essencial das sementes da *Zanthoxylum armatum* (57%) (Tiway et al., 2007), todas da família Rutaceae.

O linalol apresenta atividade anti-inflamatória e antinociceptiva em camundongos, efeito sedativo dose-dependente, ação citotóxica contra linhagem de células leucêmicas e de melanoma murino B16 (Henriques et al., 2009). O linalol, juntamente com outros componentes, como o limoneno, o  $\alpha$ -terpineol e o terpin-4-ol, apresentaram atividade larvicida contra três espécies de mosquitos (*Aedes aegypti*, *Anopheles stephensi* e *Culex quinquefasciatus*) o que pode representar uma forma de controle desses insetos (Tiway et al., 2007). O linalol apresentou ação *in vitro* contra as formas promastigota e amastigota de *Leishmania amazonensis*, atividade inseticida contra piolho sendo essas duas últimas ações características também do  $\alpha$ -terpineol, componente presente tanto no óleo das folhas quanto das cascas dos frutos de *C. limettioides* das três cidades estudadas.

O  $\beta$ -pineno foi encontrado nos óleos das folhas e cascas dos frutos de *C. limettioides*. Esse composto foi relatado por Ahmad et al. (2006) no óleo essencial das cascas de *C. sinensis* (5,45%) e de *C. limon* (10,8%).

Os isômeros ocimenes identificados no óleo das folhas coletada em Nova América e no óleo da casca dos frutos de *C. limettioides* das três cidades, foram relatados por Adnan (2001) no óleo das folhas da *Teclea nobilis*, por Vieira (2009) em *Zanthoxylum syncarpum* Tull e por Morales-Saldaña et al. (2007) no óleo das cascas da *C. paradisi*.

O limoneno, componente majoritário nas cascas dos frutos de *C. limettioides*, foi descrito como componente principal dos óleos essenciais de outras espécies do gênero *Citrus*, como *C. sinensis*, *C. limon* (L.), *C. reticulata*, *C. aurantium* e *C. reticulata sinensis* Swingle (Neves et al., 2009). Esse composto é utilizado como matéria-prima na síntese de diversos produtos químicos (Silva Santos et al., 2006) e na agricultura como repelente ao ácaro rajado *Tetranychus urticae* Koch (Botelho et al., 2009).

Foi observada inibição bacteriana pelo óleo das folhas de *C. limettioides* (CIM = 2000  $\mu$ g/mL), o que pode justificar seu uso popular para o tratamento da sinusite. De acordo com a literatura, o limoneno, o linalol, terpinen-4-ol,  $\beta$ -ocimeno e geranial, constituintes presentes do óleo essencial das folhas da espécie estudada, apresentam atividade antimicrobiana (Henriques et al., 2009). Em estudo realizado por Leite et al. (2007) o  $\beta$ -pineno (presente

no óleo essencial das folhas e cascas de *C. limettioides*) mostrou-se efetivo ao inibir as cepas de *Staphylococcus aureus* e *S. epidermidis*. Burt (2004) também encontrou atividade antimicrobiana dos pinenos frente às bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*.

Duarte (2006) relatou atividade antimicrobiana do limoneno e linalol nos óleos essenciais do *Pilocarpus microphyllus* Staff e *P. penatifolius* Lem., Ferronato (2010) evidenciou a sensibilidade da *Pseudomonas aeruginosa* frente a esses dois compostos, que são majoritários dos óleos da folha e casca do frutos de *C. limettioides*, respectivamente. Devido às ações descritas na literatura testou-se o padrão sintético de linalol, componente majoritário do óleo essencial das folhas, e obteve-se CIM de 2000 µg/mL para a maioria das bactérias mostrando que parte da atividade antimicrobiana encontrada para *C. limettioides* se deve à ação sinérgica entre os compostos presentes nos seus óleos essenciais.

Outras espécies da família Rutaceae também apresentaram atividade antimicrobiana como *Citrus medica* Linn. (contra *B. subtilis*, *S. aureus*, *E. coli* e *P. aeruginosa*) (Andrade et al., 2011) e *C. limon* contra quase metade das cepas de *Candida* analisadas, incluindo *C. albicans* e *C. parapsilosis* (Lima et al., 2006)

Em relação aos estudos anatômicos, alguns caracteres observados em *C. limettioides* apresentam valor taxonômico como as cavidades secretoras encontradas na lâmina foliar, pecíolo e caule de *C. limettioides*. Essas estruturas estão descritas na literatura como manchas translúcidas e como cavidades delimitadas por células secretoras, contendo óleos (Solereider, 1908; Metcalfe & Chalk, 1979), estando presentes também em outras espécies da família Rutaceae, como em *Raulinoa echinata* R. S. Cowan, *Pilocarpus goudotianus* Tul. (Gallardo & Jiménez, 2002), *Balfourodendron riedelianum* (Engl.) Engl., *Helietta apiculata* Benth e em cinco espécies de *Metrodorea* (Martins et al., 2008), sendo, portanto estruturas evidentes de espécies da família Rutaceae. Epiderme uniestratificada com cutícula e presença de cristais prismáticos presentes nas folhas e caules de *C. limettioides* também estão presentes nas espécies de *Metrodorea* (Martins et al., 2008) e são comuns nas plantas cítricas (Bronzi, 1981). Embora os estômatos típicos das Rutaceae sejam do tipo paracítico (Metcalfe & Chalk, 1979), nas folhas de *C. limettioides* foram observados estômatos anomocíticos, também relatados em *Raulinoa echinata* (Arioli et al., 2008) e *Pilocarpus microphyllus* Stapf (Oliveira et al., 1996).

Os feixes vasculares centrais circundados por fibras e constituídos por floema externo ao xilema, observados na nervura principal, pecíolo e ramos caulinares jovens da espécie em estudo, também foram encontrados na *Raulinoa echinata* (Gallardo & Jiménez, 2002), *C. sinensis* (Bronzi, 1981), *Balfourodendron riedelianum*, *Helietta apiculata* e em cinco espécies de *Metrodorea* (Martins et al., 2008). Segundo Reed & Dufrenóy (1935) apud Bronzi (1981), o xilema do gênero *Citrus* está arranjado compactamente e possui raios medulares estreitos, consistindo em apenas uma fileira de células, sendo que os feixes vasculares são circundados por uma camada de fibras pericíclicas, assim como observado em *C. limettioides*.

A análise de droga vegetal sempre se inicia pelo estudo morfológico e anatômico, sendo complementada

pelo estudo químico. A identificação pode ser feita por comparação da droga em estudo com a droga padrão ou com monografia especializada (Oliveira & Akisue, 2009).

O linalol foi o componente majoritário do óleo essencial das folhas e o limoneno do óleo essencial da casca dos frutos nas amostras coletadas nas três cidades. O óleo essencial das folhas apresentou CIM de 2000 µg/mL frente às bactérias testadas e não inibiu o crescimento dos fungos; enquanto o óleo essencial da casca dos frutos não apresentou atividade antimicrobiana.

A folha é hipoestomática, com estômatos predominantemente anomocíticos. Cavidades secretoras e cristais prismáticos foram observados nas estruturas das folhas e caules. Os dados obtidos no estudo microscópico podem auxiliar na identificação taxonômica desta planta e na avaliação da autenticidade da droga vegetal.

## ABSTRACT

*Chemical Composition and Antimicrobial Activity of Essential oil and Anatomy of Citrus limettioides Tanaka (Rutaceae) Leaves and Stem*

***Citrus limettioides* (Rutaceae), a sweet lime, is popularly used to treat sinusitis, and as an antipyretic and hypotensive agent. The aim of this study was to identify the constituents of the essential oils from the leaf and fruit peel of *C. limettioides*, test the antimicrobial activity of these essential oils and perform an anatomical study of the leaf and young stem. Essential oils were isolated by steam distillation in a modified Clevenger apparatus and analyzed by GC-MS. The minimum inhibitory concentrations (MIC) against Gram-positive and Gram-negative bacteria and fungi were determined by broth microdilution. Anatomical studies were performed on freehand histological sections, which were stained with Alcian blue / safranin, Steinmetz reagent and lugol and analyzed by light microscopy. Linalol was the major component in the leaf essential oil (36.88 to 45.15%) and limonene in the fruit peel essential oil (70.60 to 75.18%). The essential oil from leaves showed antimicrobial activity against bacteria (MIC 2000 µg/mL) and no activity against fungi. The essential oil from the fruit peel showed no antimicrobial activity. The leaf is hypostomatic with predominance of anomocytic stomata, the mesophyll is dorsiventral with biseriolate palisade and 11 layers of spongy parenchyma cells. Secretory cavities were observed among the mesophyll cells of the leaf, petiole and stem, whilst prismatic crystals were identified in all structures of leaf and stem. The anatomical data obtained in the microscopic study may help in the taxonomic identification of this plant and to verify the authenticity of the drug plant.**

**Keywords:** *Citrus limettioides*. Anatomical study. Essential oils. Quality control. Antimicrobial activity.

## REFERÊNCIAS

Adams RP. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy. 4<sup>th</sup> ed. Carol Stream, Illinois: Allured Publishing; 2007.

- Adnan J. Chemical and biological evaluation of essential oil of *Teclea nobilis* leaf. *Pakistan J Biol Sci.* 2001;4(2):166-8.
- Ahmad MM, Rehman S, Iqbal Z, Anjum FM, Sultan JI. Genetic variability to essential oil composition in four citrus fruit species. *Pak. J Bot.* 2006;38(2):319-24.
- Andrade J, Cardoso MG, Souza PE, Gomes MS, Machado SF, Passos LO. Comparação da caracterização química e da atividade biológica dos óleos essenciais das cascas de *Citrus limonia* e *Citrus medica*. In: 34. Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química; 2011; Florianópolis; Sociedade Brasileira de Química; 2011.
- Arioli T, Voltolini CH, Santos M. Morfoanatomia foliar da reófito *Raulinoa echinata* R.S. Cowan – Rutaceae. *Acta Bot Bras.* 2008;22(3):723-23.
- Berlyn GP, Miksche JP, Sass JE. Botanical microtechnique and cytochemistry. Ames, Iowa: Iowa State University Press; 1976.
- Botelho PS, Moraes MM, Neves IA, Neves RCS, Ribeiro NC, Born FS, Camara CAG. Composição química e ação repelente do óleo essencial da laranja lima (*Citrus aurantium* L.) sobre o ácaro rajado *Tetranychus urticae* Koch. In: 9. Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão (Jepex); 2009; Recife: UFRPE; 2009.
- Brasil. Ministério da Saúde. Farmacopeia Brasileira. 5ª ed. Brasília: Anvisa; 2010. v.1.
- Bronzi LM. Estudo da anatomia foliar de dois cultivares de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck (Rutaceae): cv. folha murcha e cv. Pêra. [Dissertação]. Campinas: Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP; 1981.
- Bukastsch F. Bemerkungen zur doppelfärbung astrablausafranin. *Mikrokosmos.* 1972;61(8):255.
- Burt S. Essential oil: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. *Int J Food Microbiol.* 2004;94(3):223-53.
- Caccioni DR, Guizzardi M, Biondi DM, Renda A, Ruberto G. Relationship between volatile components of citrus fruit essential oils and antimicrobial action on *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum*. *Int J Food Microbiol.* 1998;43(1-2):73-9.
- Chutia M, Bhuyan PD, Pathak MG, Sarma TC, Boruah P. Antifungal activity and chemical composition of *Citrus reticulata* Blanco essential oil against phytopathogens from North East India. *LWT – Food Sci Technol.* 2009;42(3):777-80.
- CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi: approved standard. 2<sup>nd</sup> ed. M38-A2. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008.
- Costa JFO, Juiz P, Pedro AS, David JPL, David JM, Giulietti AM, França F, Santos RR, Soares MBP. Immunomodulatory and antibacterial activities of extracts from Rutaceae species. *Rev Bras Farmacog.* 2010;20(4):502-5.
- Costa AF. Farmacognosia. 3ª ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian; 2001.
- Duarte MCT. Atividade antimicrobiana de plantas medicinais e aromáticas utilizadas no Brasil. *MultiCiência: Rev Interd Centr Núcl Unicamp.* 2006;7:1-16.
- Ferronato R. Análise química e antimicrobiana do óleo essencial de *Helietta apiculata* Benth. (Rutaceae). [Dissertação]. Chapecó: Universidade Comunitária Regional de Chapecó; 2010.
- Gallardo LH, Jiménez ME. Leaf anatomy of *Pilocarpus goudotianus* Tul. (Rutaceae). *Caldasia.* 2002;24(2):269-75.
- Ghouse AK, Yunus M. Preparation of epidermal peels from leaves of Gymnosperms by treatment with hot, 60° GL HNO<sub>3</sub>. *Stain Technol.* 1972;47(6):322-5.
- Henriques AT, Simões-Pires CA, Apel MA. In: Yunes F. Óleos essenciais: importância e perspectivas terapêuticas. Ijtaí: Editora Univali; 2009.
- Islam A, Sayeed A, Bhuiyan MS, Mosaddik MA, Islam MA, Mondal A, Khan GR. Antimicrobial activity and cytotoxicity of *Zanthoxylum budrunga*. *Fitoterapia.* 2001;72(4):428-30.
- Ivanova A, Mikhova B, Najdenski H, Tsvetkova I, Kostova I. Antimicrobial and cytotoxic activity of *Ruta graveolens*. *Fitoterapia.* 2005;76(3-4):344-7.
- Johansen DA. Plant microtechnique. New York: McGraw-Hill Book; 1940.
- Kraus JE, Arduin M. Manual básico de métodos em morfologia vegetal. Seropédica: Editora Universidade Rural; 1997.
- Leite AM, Lima EO, Souza EL, Diniz MFFM, Trajano VN, Medeiros IA. Inhibitory effect of beta-pinene, alpha-pinene and eugenol on the growth of potential infectious endocarditis causing Gram-positive bacteria. *Rev Bras Ciên Farm.* 2007;43(1):121-6.
- Lima IO, Oliveira RAG, Lima EO, Farias NMP, Souza EL. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de *Candida*. *Rev Bras Farmacog.* 2006;16(2):197-201.
- Lorenzi H, Bacher LB, Lacerda MTC, Sartori SF. Frutas brasileiras e exóticas cultivadas: de consumo in natura. Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudos da Flora; 2006.
- Martins TP, Teixeira SP, Groppo M. Anatomia foliar comparada de *Metrodorea* A.St.-Hil. (Rutaceae). In: 16. Simpósio Internacional de Iniciação Científica da USP; 2008; Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo; 2008.
- Metcalfe C, Chalk L. Anatomy of the Dicotyledons. Oxford: Clarendon Press; 1979.

- Morales Saldaña J, Gómez N, Rovira J, Abrahams M. Actividad larvícida de la toronja, *Citrus paradisi* (Rutaceae) sobre dos vectores del dengue. *Rev Peru Biol.* 2007;14(2):297-9.
- Morton JF. Sweet Lime. In: Fruits of warm climates. Miami: Creative Resources Systems; 1987. p. 175-6.
- Neves IA, Neves RCS, Moraes MM, Gomes CA, Botelho PS, Júnior CPA, Camara CAG. Atividade fumigante do óleo essencial de sete espécies de *Citrus* (Rutaceae) sobre *Tetranychus urticae* (ácaro rajado). In: 32. Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química; 2009; Fortaleza: Sociedade Brasileira de Química; 2009.
- Ngassoum MB, Essia-Ngang JJ, Tatsadjieu LN, Jirovetz L, Buchbauer G, Adjoudji O. Antimicrobial study of essential oils of *Ocimum gratissimum* leaves and *Zanthoxylum xanthoxyloides* fruits from Cameroon. *Fitoterapia.* 2003;74(3):284-87.
- Oliveira F, Akisue G, Akisue MK. Farmacognosia. São Paulo: Atheneu; 1996.
- Oliveira F, Akisue G. Fundamentos de farmacobotânica e de morfologia vegetal. 3ª ed. São Paulo: Atheneu; 2009.
- Perveen A, Qaiser M. Pollen Flora of Pakistan -XIV. Rutaceae. *Pak J Bot.* 2005;37(3):495-501.
- Reed HS, Dufrenoy J. The effects of zinc and iron salts on the cell structure of mottled orange leaves. *Hilgardia.* 1935;9(2):113-41.
- Silva Santos A, Bizzo HR, Antunes MAS, D'ávila IA. A participação da indústria óleo-citricola na balança comercial brasileira. *Rev Bras Pl Med.* 2006;8(4):8-13.
- Solereeder H. Systematic anatomy of the dicotyledons. Oxford: Clarendon Press; 1908.
- Tiwary M, Naik SN, Tewary DK, Mittal PK, Yadav S. Chemical composition and larvicidal activities of the essential oil of *Zanthoxylum armatum* DC (Rutaceae) against three mosquito vectors. *J Vector Borne Dis.* 2007;44(3):198-204.
- Van Den Dool H, Kratz PDJA. Generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. *J Chromatog.* 1963;11:463-71.
- Vasudeva N, Sharma T. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil of *Citrus limettioides* Tanaka. *J Pharm Technol Drug Res.* 2012;1:1-7.
- Vieira MGS, Freitas JVB, Lima Neto MN, Gramosa NV, Nunes EP. Constituintes químicos voláteis das folhas e galhos de *Zanthoxylum syncarpum* Tull. *Quím Nova.* 2009;32(2):391-3.
- Viganó J, Viganó JÁ, Cruz-Silva CTA. Utilização de plantas medicinais pela população da região urbana de Três Barras do Paraná. *Acta Sci Health Sci.* 2007;29(1):51-8.
- Yi Z, Yu Y, Liang Y, Zeng B. *In vitro* antioxidant and antimicrobial activities of the extract of *Pericarpium Citri Reticulatae* of a new Citrus cultivar and its main flavonoids. *LWT – Food Sci Technol.* 2008;41(4):597-603.

Recebido em 04 de dezembro de 2012

Aceito para publicação em 23 de abril de 2013

