

**ANÁLISE DA ATIVIDADE INIBITÓRIA DE EXTRATO HIDROALCOÓLICOS DE
CITRUS AURANTIFOLIA SOBRE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS***

*ANALYSIS OF INHIBITORY ACTIVITY OF HYDROALCOHOLIC EXTRACT OF CITRUS
AURANTIFOLIA OF STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

*ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD INHIBITORIA DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE
CITRUS AURANTIFOLIA DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

**Karen Cristine Santos Galvão, Mariella Vieira Pereira Leão, Célia Regina
Gonçalves e Silva, Silvana Soléo Ferreira dos Santos**

Universidade de Taubaté, Campus Bom Conselho, Laboratório de Microbiologia, Av.
Tiradentes, 500 - Centro - Taubaté - SP - CEP: 12030-180
karencristine13@gmail.com

Recebido em 08/09/2010, Aceito em 22/01/2011

Resumo - *Citrus aurantifolia*, conhecida popularmente por Lima da Pérsia, vem sendo usada medicinalmente. Com o aumento da seleção de microrganismos resistentes, cresce o interesse por novas substâncias com atividade antimicrobiana. O objetivo deste trabalho foi analisar a atividade inibitória de extratos hidroalcoólicos de *Citrus aurantifolia* sobre *Staphylococcus aureus*. Foram preparados extratos do carpo, bagaço e casca de *Citrus aurantifolia* in natura. A atividade inibitória em diferentes concentrações foi avaliada pelo método de diluição em ágar Müller-Hinton. Após reativação, cada cepa de *S. aureus* foi suspensa em solução salina esterilizada (padrão 0,5 da escala de McFarland) e semeada, com o auxílio de um replicador de Steers, nos meios previamente preparados. Depois de incubadas a 37 °C por 24 h, a leitura foi realizada observando-se a presença ou ausência de crescimento no meio. A concentração inibitória mínima para todos os extratos avaliados foi 5%. Os extratos hidroalcoólicos de *Citrus aurantifolia* demonstraram potencial inibitório sobre *S. aureus*.

Palavras-chave: *Citrus aurantifolia*, lima da pérsia, antimicrobiano

Descritores: fitoterapia, plantas medicinais, extratos vegetais.

Abstract - Citrus aurantifolia, popularly known as Lima da Persia, has been used medicinally. With the increased selection of resistant microorganisms, there is growing interest in new substances with antimicrobial activity. The aim of this study was to analyze the inhibitory activity of extracts of Citrus aurantifolia of Staphylococcus aureus. Extracts were prepared carpal pulp and peel of Citrus aurantifolia fresh. The inhibitory activity in different concentrations was evaluated by dilution method in Müller-Hinton agar. After reactivation, each strain of S. aureus was suspended in sterile saline (the standard 0.5 McFarland) and sown with the aid of a Steers replicator, media previously prepared. After incubated at 37 ° C for 24 h, the reading was done by observing the presence or absence of growth in the middle. The minimum inhibitory concentration for all samples analyzed was 5%. The hydroalcoholic extracts of Citrus aurantifolia showed inhibitory potential against S. aureus.

Keywords: Citrus aurantifolia, lime juice, antimicrobial

Descriptors: phytotherapy, plants, medicinal, plant extracts

[Ver dicionário detalhado](#)

Resumen - Citrus aurantifolia, popularmente conocida como Lima da Persia, se ha usado medicinalmente. Con la mayor selección de microorganismos resistentes, hay un creciente interés en las nuevas sustancias con actividad antimicrobiana. El objetivo de este estudio fue analizar la actividad inhibitoria de los extractos de Citrus aurantifolia de Staphylococcus aureus. Los extractos se obtuvieron del carpo, frescos bagazo y corteza de Citrus aurantifolia. La actividad inhibidora en diferentes concentraciones se evaluó por el método de dilución en agar Müller-Hinton. Después de reactivación, cada cepa de S. aureus fue suspendido en solución salina estéril (el estándar de 0,5 McFarland) y se siembra con la ayuda de un replicador de Steers, los medios de comunicación previamente preparado. Después se incubaron a 37 ° C durante 24 h, la lectura se realizó mediante la observación de la presencia o ausencia de crecimiento en el medio. La concentración inhibitoria mínima para todas las muestras analizadas fue de 5%. Los extractos hidroalcohólicos de Citrus aurantifolia mostraron capacidad inhibitoria frente a S. aureus.

Palabras clave: Citrus aurantifolia, jugo de limón, los antimicrobianos

Descriptores: fitoterapia, plantas medicinales, extractos vegetales.

Introdução

Citrus aurantifolia, conhecida popularmente por Lima da Pérsia, vem sendo usada como anti-espasmódico, anticoagulante, auxiliar no tratamento de depressão e alcoolismo, entre outros.

É utilizada em especial no sul da África, onde substitui medicamentos tradicionais para diversas doenças, como dor de estômago e problemas de pele. O suco tem alto potencial para o tratamento de doenças infecciosas quando utilizado sozinho ou em combinação com outras plantas.

Há resistência de estafilococos, em especial *Staphylococcus aureus*, aos antibióticos normalmente usados. Os manipuladores de alimentos, assim como a população em geral, é portadora do microrganismo, que está presente no couro cabeludo, pele e mucosas. Há ocorrência de inúmeras intoxicações por *S. aureus* enterotoxigênico. Apesar de ser considerado da microbiota residente da orofaringe humana, em indivíduos debilitados pode causar endocardite, artrite bacteriana e meningite. *S. aureus* pode causar grande variedade de infecções como furúnculos, síndrome da pele queimada, pneumonia, osteomielite, amigdalite, enterocolite e infecções urogenitais, entre outras. Em engenharia de alimentos esta espécie apresenta grande importância por sua capacidade de causar intoxicações alimentares, pois produz potente enterotoxina. O objetivo do presente trabalho foi analisar a

atividade inibitória do suco e de extratos aquosos e hidroalcoólicos do carpo, bagaço e casca de *Citrus aurantifolia* sobre *Staphylococcus aureus*.

Material e métodos

Frutos de *Citrus aurantifolia* (lima da Pérsia) foram colhidos em uma fazenda de Natividade da Serra – SP e processados no laboratório de Microbiologia da UNITAU.

Preparo dos extratos:

Três quilos de *Citrus aurantifolia* foram lavados em água corrente com auxílio de escova, higienizadas em solução de hipoclorito de sódio (200 ppm) por 15 minutos e enxaguadas em água corrente para a remoção de resíduos do hipoclorito.

Depois de higienizados, os frutos foram descascados com uma faca esterilizada e a casca separada em Becker esterilizado. Dois quilos do fruto descascado tiveram seus grumos cortados ao meio, para separação do carpo e bagaço que foram reservados em Becker esterilizado, um quilo do bagaço e da casca foi seco em estufa a 45 °C por cinco dias e o restante congelado. A polpa e o suco foram congelados até o preparo dos extratos.

Extrato hidroalcoólico:

Para cada parte retirada do fruto, 50g foram misturadas, em frasco âmbar esterilizado, a 250 ml de álcool etílico 80% e agitados vigorosamente por três

minutos. Esta agitação foi realizada cinco vezes por dia durante 12 dias.

Álcool (controle):

Álcool etílico na concentração de 80% foi adicionado a um recipiente âmbar esterilizado e foi submetido à agitação vigorosa por três minutos, cinco vezes ao dia durante 12 dias.

Preparo dos meios adicionados de extrato:

Após esse período, a tubos de ensaio foi adicionado a 0,76 g de agar Müller-

Hinton, água destilada e extrato em quantidades suficientes para que, em 20 mL de meio pronto, atingisse concentrações de 20, 15, 10, 5, 2,5, 1 e 0,5% (Figura 1). Os meios, em tubos, tiveram o pH verificado (todos apresentaram pH 7,0) e depois foram esterilizados em autoclave a 121°C por 15 minutos e então vertidos em placas de Petri.

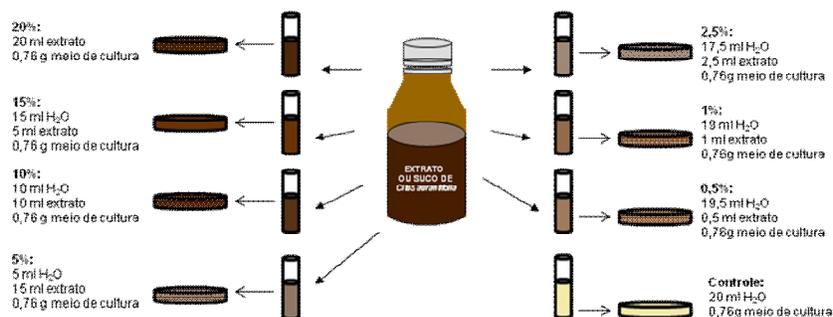


Figura 1 – Preparo dos meios de cultura adicionados de extratos de *Citrus aurantifolia* em diversas concentrações

Foram ainda preparados meios adicionados com álcool 80% nas mesmas proporções utilizadas para o extrato hidroalcoólico e meios sem adição de extratos para controle do crescimento microbiano.

Todos os meios foram preparados em duplicata.

Obtenção de colônias dos microrganismos

Com 24 h de antecedência, uma cepas padrão (ATCC 25923) e 24 cepas de *S. aureus*, oriundas de trabalho anterior, catalogadas e preservadas na coleção de culturas da Universidade de Taubaté (CCUT), foram reativadas em agar BHI (Quadro 1).

Origem das cepas de <i>Staphylococcus aureus</i>	Nº de registro
Cavidade bucal de pacientes com neoplasia de	CCUT 101039, 101040, 101043,

cabeça e pescoço, antes do início de radioterapia	101053, 101056, 101059, 101061
Cavidade bucal de pacientes com neoplasia de cabeça e pescoço depois de submetido a tratamento de 1500 rads	CCUT 101037, 101044, 101050, 101051, 101057, 101066
Cavidade bucal de pacientes com neoplasia de cabeça e pescoço depois de submetido a tratamento de 3000 rads	CCUT 101038, 101046, 101048, 101049, 101055
Cavidade bucal de pacientes com neoplasia de cabeça e pescoço depois de submetido a tratamento de 5000 rads	CCUT 101042, 101045, 101052, 101058, 101062, 101064

Quadro 1- Origem e número de registro das cepas de *Staphylococcus aureus* testadas

Análise de atividade inibitória:

Após incubação por 24 h a 37 °C, para cada cepa foi preparada uma suspensão em 10 mL de solução salina (NaCl a 0,9%) esterilizada, compatível ao padrão 0,5 da escala de McFarland (aproximadamente $1,5 \times 10^8$ cels/ml) para *S. aureus*.

Com auxílio de pipeta automática, as suspensões foram transferidas para um repicador de Steers para serem semeadas nas placas previamente preparadas.

Depois de incubadas a 37 °C por 24h, a leitura foi realizada observando-se a presença ou ausência de crescimento no meio.

Resultados

Os meios contendo extratos hidroalcoólicos inibiram todas as cepas de *S. aureus*, na concentração de 5% conforme mostrado na tabela 1.

Tabela 1: Percentual de cepas de *S. aureus* inibidas pelos extratos hidroalcoólicos de *C. aurantifolia*

Extrato	Percentual de cepas inibidas			
	0,5%	1%	2,5%	5%
Álcool Controle	0	0	0	0
Casca	0	0	0	100
Suco	0	0	0	100
Bagaço	0	0	0	100
Carpo	0	0	0	100

Discussão

O presente trabalho avaliou extratos de diferentes partes da fruta, observando

que os extratos hidroalcoólicos da casca, suco, carpo e bagaço inibiram 100% das cepas testadas de *S. aureus*. Os resultados do estudo de Meléndez e Capriles também demonstraram que o extrato do fruto de *Citrus aurantifolia* inibiu 94% dos *Staphylococcus aureus* testados.

Taiwo et al. verificaram a atividade inibitória de extratos de *Citrus aurantifolia* sobre *E. coli*, *Klebsiella* spp., *Staphylococcus* spp., *Proteus* spp. e *Pseudomonas* spp. Os extratos inibiram 44% dos estafilococos e 69% das bactérias Gram-negativas. O extrato aquoso do suco possuía 33% de atividade contra estafilococos, no presente trabalho o extrato hidroalcoólico do suco demonstrou maior eficácia, inibindo 100% das cepas de estafilococos na concentração de 5%.

Aibinu et al. testaram extratos de lima da Pérsia com diferentes solventes (uma bebida típica de álcool obtido de palmeiras, uma bebida conhecida como

Seaman's Schnapps 40% de álcool, água, etanol e seiva de palmeira) preparados da mesma forma como são utilizados pela população local da Nigéria (Africa), e demonstraram que mesmo em diversos solventes, todos os extratos a 5% possuem atividade antimicrobiana contra fungos, leveduras, bactérias Gram positivas, Gram negativas e anaeróbias. No presente trabalho também foi observado um ótimo potencial em extratos hidroalcoólicos.

Conclusão

Extratos hidroalcoólicos de carpo, bagaço, casca e suco de *Citrus aurantifolia* demonstraram potencial inibitório sobre *S. aureus*.

Agradecimentos

Programa de Iniciação Científica UNITAU e funcionários do laboratório de microbiologia.

Referências

AIBINU I. et al. Evaluation of the antimicrobial properties of different parts of *Citrus aurantifolia* (lime fruit) as used locally. **African Journal of Traditional, Complimentary and Alternative Medicines**. 2007, 4(2): 185-195.

IARIA ST. et al. Pesquisa de *Staphylococcus aureus* enterotoxigênico nas fossas nasais de manipuladores de alimentos em hospitais, São Paulo, 1976. **Rev. Saúde Pública**. São Paulo. 1980, 14,,: 93-100.

LANDUCCI LF. Atividade inibitória de extratos vegetais do cerrado brasileiro sobre microrganismos bucais. 2005. 105F. Tese (doutorado em biopatologia bucal, area biopatologia bucal) – Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista, São José dos Campos.

MELÉNDEZ PA. & CAPRILES, V.A. Antibacterial properties of tropical plants from Puerto Rico. **Phytomedicine**. 2006, 13: 272-276.

RADDI MSG. et al. Staphylococcus aureus: Portadores entre manipuladores de alimentos. **Rev. Saúde pública**. São Paulo. 1988, 22(1): 36-40.

SIQUEIRA RS. Manual de microbiologia de alimentos. Rio de Janeiro: Embrapa. 1995, p159.

TAIWO SS. et al. *In vitro* Antimicrobial Activity of Crude Extracts of *Citrus aurantifolia* Linn and *Tithonia diversifolia* Poaceae on Clinical Bacterial Isolates. **International Journal of Tropical Medicine**, 2007, 2(4): 113-117.

TAVARES W. Bactérias gram-positivas problemas: resistência do estafilococo, do enterococo e do pneumococo aos antimicrobianos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. Brasil. 2000, 33(3): 281-301.

UENO M, JORGE AOC. Bacilos Gram-negativos. In: JORGE AOC. **Princípios de microbiologia e imunologia**. São Paulo: Ed. Santos. 2006, 65-84.