

Estudo químico e de atividade antibacteriana de extratos e óleo essencial de *Citrus x limonia*

Chemical and antibacterial activity study of *Citrus x limonia* extracts and essential oil

SILVA, M.G.; NUNAN. E.A.; ROCHA, M.P.*

Centro Universitário UNA, Campus Guajajaras, Rua dos Guajajaras, 175 - Centro, Belo Horizonte - MG, 30180-100.

*Correspondence: *marina.pereira@prof.una.br

RESUMO

A crescente resistência bacteriana e a dificuldade de produção de novos antimicrobianos por via diretamente sintética estimulou a comunidade científica a explorar outras fontes na busca por novos agentes terapêuticos. Dentre as alternativas encontradas, as plantas medicinais e os produtos naturais, são uma fonte promissora na busca por novos agentes antimicrobianos, devido a sua constante utilização popular no tratamento de diversas doenças associadas. A espécie *Citrus x limonia* pertencente à família Rutaceae é caracterizada como sendo um fruto doce com gomos ácidos, fenômeno que acontece em decorrência do efeito da polinização natural do limão doce pelo limão azedo. Porém poucas informações desta espécie constam na literatura sobre sua química e atividade biológica. Neste contexto, o trabalho visa explorar o potencial químico e biológico do extrato etanólico, acetato de etila e do óleo essencial da espécie obtidos através das folhas e casca do fruto pelos métodos de maceração, partição e hidrodestilação de acordo com os metabólitos secundários existentes, identificados pela cromatografia em camada delgada (CCD) frente à inibição do crescimento microbiano das bactérias *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli* pelo método de disco-difusão. Os extratos apresentaram em sua composição química cumarinas e flavonoides em CCD. Na avaliação da potencial atividade antimicrobiana foi observada principalmente inibição dos microrganismos pelo óleo essencial. Já os extratos avaliados não apresentaram atividade promissora, nas condições experimentais utilizadas. Neste contexto, a potencial atividade antimicrobiana dos extratos estão relacionadas com a composição do óleo essencial, sendo promissor na busca por novas abordagens terapêuticas, com ação antimicrobiana.

Palavra-chave: atividade antimicrobiana, extração de metabólitos secundários, identificação de metabólitos secundários

ABSTRACT

The increasing bacterial resistance and the difficulty of producing new antimicrobials by direct synthetic way stimulated the scientific community to explore other sources in the search for new therapeutic agents. Among the alternatives found, medicinal plants and natural products are a promising source in the search for new antimicrobial agents, due to their constant popular use in the treatment of several associated diseases. The *Citrus x limonia* species belonging to the Rutaceae family is characterized as a sweet fruit with acid buds, a phenomenon that occurs as a result of the natural pollination effect of sweet lemon by sour lemon. However, little information of this species is found in the literature about its chemistry and biological activity. In this context, the work aims to explore the chemical and biological potential of the ethanolic extract, ethyl acetate and essential oil of the species obtained through the leaves and peel of the fruit by maceration, partition and hydrodistillation methods according to the existing secondary, metabolites identified by slender layer chromatography (CCD) against inhibition of microbial growth of *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* bacteria by the disc diffusion method. The extracts presented in their chemical composition



coumarins and flavonoids in CCD. In the evaluation of potential antimicrobial activity was observed mainly inhibition of microorganisms by the essential oil. The extracts evaluated did not show promising activity under the experimental conditions used. In this context, the potential antimicrobial activity of the extracts is related to the composition of the essential oil, promising the search for new therapeutic approaches with antimicrobial action.

Key words: antimicrobial activity, extraction of secondary metabolites, identification of secondary metabolites

INTRODUÇÃO

A utilização de espécies vegetais para fins terapêuticos é uma prática medicinal conhecida na humanidade desde a antiguidade e sendo muito utilizada ao redor do mundo até os dias atuais (CAETANO et. al., 2015). Nos últimos anos vários pesquisadores desenvolveram estudos sobre a atividade biológica de plantas medicinais orientados em sua maioria pelo uso popular para o tratamento de diversas enfermidades (ZAGO, 2018).

Os microrganismos vêm se mostrando cada vez mais resistentes as terapias antimicrobianas e tornando-se um dos problemas de saúde mais relevantes nos últimos anos (LOUREIRO et. al., 2016). A resistência bacteriana acarretou ao longo do tempo na necessidade por obtenção de novas fontes antimicrobianas e no Brasil o uso de plantas medicinais tem recebido muitos destaques devido ao crescimento de sua utilização para fins medicinais e sua grande biodiversidade (ESTEVAM et. al., 2016).

O grupo de bactérias estudadas é caracterizado como sendo bactérias Gram-negativo (*Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*) e Gram-positivo (*Staphylococcus aureus*). Nos últimos anos, observou-se o surgimento da resistência bacteriana causada pelo uso indiscriminado e/ou contínuo dos antimicrobianos. A dificuldade em relacionar um microrganismo a determinada doença acabou culminando no uso indevido nos agentes antimicrobianos, o que leva a uma das causas da problemática resistência bacteriana (BASSO et. al., 2016).

A espécie vegetal *Citrus x limonia* é popularmente conhecido como limão capeta ou laranja capeta e família botânica Rutaceae. São caracterizados por arvores espinhentas, semidecídua, de copa aberta e irregular, de caule tortuoso com casca acinzentada, de 3 a 6 m de altura. Suas folhas são simples, alternas, aromáticas, com glândulas medindo de 6 a 10 cm de comprimento, com pecíolo não alado. Flores grandes, bancas, perfumadas, reunidas em cimeiras axilares. Seus frutos são do tipo baga, de formato elipsoide, geralmente pequeno mamilo apical, de superfície um pouco rugosa de cor verde-amarela, com poucas sementes (LORENZI; MATOS, 2002).

Na composição química de espécies do gênero *Citrus* são encontrados os metabólitos secundários flavonoides, óleos voláteis, cumarinas e pectinas. Esses compostos estão diretamente envolvidos nos processos de defesa das plantas frente a parasitas, irradiação solar e proteção de fatores terrestres (CAMPELO et. al., 2013).

No presente trabalho foram investigados alguns metabólitos secundários que fazem parte da composição química da espécie *Citrus x limonia* e avaliou-se uma possível atividade antimicrobiana dos extratos: etanólico, acetato de etila, e do óleo essencial do *Citrus x limonia* contra as cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 8739, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 e *Escherichia coli* ATCC 6538.

METODOLOGIA

Obtenção do material vegetal

Foram colhidas amostras de folhas e frutos de *Citrus*



x limonia originárias de plantação, sem adição de agrotóxicos e afins localizada na cidade de Ibitiré/ Minas Gerais-Brasil. Para obtenção dos extratos foi utilizada a técnica extração por maceração à frio e partição. O óleo essencial foi obtido pelo processo de hidrodestilação. As folhas da árvore foram submetidas ao processo de secagem e em moinho de facas foram pulverizadas visando otimizar o processo extrativo através do aumento da superfície de contato do pó. Após o processo foi obtido uma quantidade de 22,650g de folhas pulverizadas.

Preparo dos derivados vegetais

O extrato etanólico foi obtido pelo processo de extração por maceração à frio de modo exaustivo. Foi utilizado como solvente o etanol a 99% (SIMÕES et. al., 2007). Em um béquer de 500mL foi colocado 22,650g das folhas pulverizadas e adicionado 300mL de álcool 99% por 10 minutos. Este processo foi realizado por mais duas vezes. Após esse período o extrato foi filtrado. O solvente foi submetido a evaporação e em seguida o extrato foi colocado em dessecador por um período de 24 horas para diminuição do teor de umidade. Obteve-se um rendimento de 4,28% de extrato.

O extrato em acetato de etila foi produzido utilizando 0,5459g do extrato etanólico. Em um béquer foi adicionado 50mL de água e 50mL de metanol e colocado em banho no ultrassom para dissolução do extrato. O processo de extração utilizado foi a partição (SIMÕES et. al., 2007). Em um funil de separação colocou-se a solução do extrato e adicionou-se 100ml de acetato de etila. Foram separadas as fases aquosa e orgânica e o processo foi repetido por mais duas vezes. A fração acetato de etila foi submetida a secagem para diminuição do teor de umidade em dessecador por um período de 24 horas. Obteve-se um rendimento de 47,07% de extrato.

Para a obtenção do óleo essencial foram seguidos os padrões preconizados pela Farmacopeia

Brasileira (2010). Foram utilizadas as cascas do *Citrus x limonia* provenientes da mesma árvore, de onde foram colhidas as folhas para o preparo dos primeiros extratos. O processo de obtenção foi por hidrodestilação utilizando-se Clevenger. O total de 188,35g de cascas foram cortadas em tamanhos pequenos e colocadas em um balão de fundo redondo e foram adicionados aproximadamente 250mL de água destilada e perlas de vidro. O balão foi disposto em uma manta aquecedora e acoplado ao aparelho Clevenger por um período de 1 hora e 30 minutos. Obteve-se um rendimento de 0,8mL de óleo essencial.

Identificação de cumarinas e flavonoides por CCD

A identificação de flavonoides e cumarinas nos extratos etanólicos e em acetato de etila foram realizadas pelo método de cromatografia em camada delgada (CCD) seguindo padrões preconizados pela Farmacopeia Brasileira (2010). Os extratos foram preparados na concentração de 5 mg/mL em metanol. Os padrões utilizados foram rutina (Sigma) para flavonoides e cumarinas (Sigma), ambos na concentração de 1 mg/mL em metanol. Em cromatoplaça de sílica foram aplicadas pequenas frações das amostras com auxílio de capilar. Para cada placa realizada foram aplicados os dois extratos e padrão correspondente a classe de metabólitos a ser identificada. As placas foram eluídas em cuba cromatográfica com fase móvel de acetato de etila, ácido fórmico e água (100:11:27) para flavonoides, e éter de etila e tolueno (10:90) saturado com ácido acético 10% para cumarinas. Os reveladores utilizados foram cloreto de alumínio (flavonoides) e hidróxido de potássio (cumarinas).

Avaliação da potencial atividade antibacteriana de *Citrus x limonia*

A pesquisa da potencial atividade antibacteriana dos extratos e óleo essencial foi avaliada pelo método de difusão em ágar utilizando discos para colocar os extratos em contato com cepas padrões: *Escherichia*



coli ATCC 6538, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 e *Staphylococcus aureus* ATCC 8739.

Preparo da suspensão bacteriana

Foram utilizadas cepas padrões de *Escherichia coli* ATCC 6538, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 e *Staphylococcus aureus* ATCC 8739 fornecidas pelo Laboratório de Controle de Qualidade da Faculdade de Farmácia da UFMG. As cepas foram mantidas sob refrigeração e repiques foram feitos a partir das culturas primárias.

Realizou-se o repique de cepas bacterianas em meio ágar caseína soja (OXOID®) por um período de 24 horas e temperatura de 37°C. Para preparação da suspensão bacteriana com concentração 10⁶/mL, foi utilizada a escala McFarland (tubo nº2- grau 0,5). O tubo da escala foi obtido com 0,2 mL de solução de cloreto de bário e 9,8 mL de ácido sulfúrico a 1% definindo assim o padrão de turvação. Para cada bactéria foi feita uma suspensão estoque transferindo com alça de cultivo da cultura de microrganismo de 24h para salina (10 mL) até obter turvação semelhante ao tubo da Escala MacFarland. A partir da suspensão estoque foram pipetadas 100 µL para cada placa. A distribuição do inóculo nas placas foi feita com alça de Drigaski.

Pesquisa de atividade antibacteriana dos extratos pelo método de difusão em ágar

Para o método de difusão em ágar foi utilizado o meio ágar Mueller Hinton (KASVI®). As placas de Petri de 90mm x 15mm foram divididas em quatro quadrantes para estabelecer o lugar a serem colocados os discos e respectivas soluções dos extratos, óleo essencial, controle positivo do método (disco impregnado com cloranfenicol 30 mg) e controle negativo (diluyente). Para cada extrato foram feitas três placas sendo que em cada uma têm-se dois discos da amostra, um disco com cloranfenicol e o com o diluyente (branco).

As soluções dos extratos etanólico e acetato de etila foram preparados em álcool 99% v/v na concentração

0,5mg/mL. O óleo essencial foi aplicado diretamente aos discos estéreis. Os discos utilizados para o teste foram de 6mm e foram impregnados com 20 µL de cada amostra (extrato etanólico, acetato de etila e óleo essencial). Após impregnação dos discos com os extratos alcoólicos, estes foram colocados em estufa de cultura para evaporação do diluyente por 1 hora e 30 minutos. Para o disco que chamou-se de branco foi colocado somente álcool a 99% (20 µL). Após a semeadura, as placas foram incubadas em estufa a 37°C pelo período de 24 horas. Após o período de incubação foi realizada a leitura dos resultados. Foi avaliada a presença de halos de inibição em volta dos discos com extratos, óleo essencial e padrão de cloranfenicol. A medida dos halos foi realizada com paquímetro e os resultados expressos em milímetros como média ± desvio padrão.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise da cromatografia em camada delgada (CCD) sob lâmpada de raio UV (366 nm e 254nm) revelaram a presença pronunciada de cumarinas nos dois extratos (acetato de etila e etanólico) e uma pequena fração para flavonoides no extrato etanólico. Os valores do fator de retenção (RF) encontrados na CCD de cumarinas foram respectivamente 0,532 e 0,692 para extrato de acetato de etila e etanólico sendo o segundo RF semelhante ao do padrão de cumarinas 0,690.

Na avaliação do potencial de atividade antimicrobiana, observou-se pelos resultados obtidos que o óleo essencial apresentou atividade antibacteriana para todos os microrganismos testados (Tabela 1). Porém a média dos halos de inibição da atividade do óleo essencial foi maior para a *Pseudomonas aeruginosa* (14,01 mm) em relação à média obtida para as outras bactérias testadas em que foram observadas as médias de 8,42 mm e 10,16 mm respectivamente para *S. aureus* e *E. coli*. Mas se desconsiderarmos o dado (24,82 mm ±15,69) obtido para a *Pseudomonas*,

a média reduziria para 11,85mm ±2,33. Que se mostra mais coerente com variação menor dos halos entre as placas.

Os extratos etanólico e em acetato de etila apresentaram atividade pouco relevante dentro das condições do experimento (Tabelas 2 e 3). O método de difusão funcionou de acordo ao que

pode ser visto pelos resultados do controle positivo do método (Cloranfenicol 30 mg) que apresentou halos significativos para todas as bactérias ensaiadas. E os discos com diluente não apresentaram halos de inibição mostrando que o diluente não interferiu na formação dos halos de inibição observados.

Tabela 1 - Valores de halos de inibição (mm) obtidos

para óleo essencial e cloranfenicol (30 mg) frente à *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*

Réplica	<i>E. coli</i>	Padrão	<i>P.aeruginosa</i>	Padrão	<i>S.aureus</i>	Padrão
1°	12,10	32,24	10,70	18,44	10,06	24,07
	8,55		8,55		8,02	
2°	9,40	31,32	13,35	13,49	SI	27,60
	11,17		14,54		SI	
3°	9,08	32,20	24,82	10,50	8,68	26,32
	10,66		12,10		6,93	
Média	10,16	31,92	14,01	14,14	8,42	25,99
Desvio padrão	1,37	0,52	5,69	4,01	1,31	1,74

*SI: Sem inibição.

Tabela 2 - Valores de halos de inibição (mm) extrato de acetato de etila e cloranfenicol (30 mg) frente à *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*

Réplica	<i>E. coli</i>	Padrão	<i>P.aeruginosa</i>	Padrão	<i>S.aureus</i>	Padrão
1°	SI	28,58	SI	9,81	6,74	22,58
	SI		SI		7,19	
2°	SI	32,52	6,89	10,10	8,13	25,29
	SI		7,79		6,99	
3°	SI	28,44	7,12	11,36	6,35	22,95
	SI		7,07		7,43	
Média	-	29,85	7,22	10,42	7,14	24,46
Desvio padrão	-	2,32	0,39	0,82	0,61	1,47

*SI: Sem inibição.

Tabela 3 - Valores de halos de inibição (mm) extrato etanólico e cloranfenicol (30 mg) frente à *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*

Réplica	<i>E. coli</i>	Padrão	<i>P.aeruginosa</i>	Padrão	<i>S.aureus</i>	Padrão
1º	6,95	28,29	SI	10,49	7,40	26,08
	6,34		SI		7,11	
2º	SI	28,21	SI	11,05	6,81	24,31
	SI		SI		6,50	
3º	7,26	30,15	7,11	9,44	6,95	22,99
	6,58		7,14		6,85	
Média	7,78	28,98	7,12	10,32	6,94	24,46
Desvio padrão	0,41	1,03	0,02	0,81	0,30	1,55

*SI: Sem inibição.

A melhor atividade antibacteriana relacionada ao óleo essencial encontrada, neste estudo, corrobora com diversos relatos na literatura, que destacam os óleos essenciais de diferentes espécies como substâncias promissoras para inibição de diferentes cepas de microrganismos como *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus* (XAVIER et. al., 2016), *Pseudomonas aeruginosa*, *Echerichia coli* e *Staphylococcus aureus* (SANTOS et. al., 2017; MEDEIROS et. al., 2019).

Os dados a respeito das sensibilidades das bactérias ao óleo essencial sugerem que a *Pseudomonas aeruginosa*, seguido pela *Escherichia coli* apresentaram o melhor resultado diante do *Staphylococcus aureus*. Podemos levar ainda em consideração, que as bactérias Gram-negativos são menos susceptíveis à ação de antibacterianos por apresentarem uma membrana externa envolvendo a parede celular que reprime a difusão de compostos hidrofóbicos através de sua camada lipossacarídica, apresentando por tanto um resultado melhor em comparação a ação de antibacterianos sobre os gram-positivos (SANTOS et. al., 2017).

O potencia dos óleos essências contra as diferentes

bactérias pode ser explicado devido à hidrofobicidade de sua composição química (MIRANDA et.al., 2016). Na composição química dos óleos essenciais dos limões em geral são encontrados os terpenoides citral, linalila e linalol, altamente hidrofóbicos (SILVA, et. al., 2009) o que lhes permitem partição com os lipídeos presentes na membrana celular e mitocôndria das bactérias, causando assim perturbação das estruturas celulares e aumentando a permeabilidade da membrana, provocando o vazamento de moléculas essenciais à sua sobrevivência e levando as mesmas a morte (MIRANDA et. al., 2016).

São descritos na literatura, atividade para as mesmas bactérias, de extrato de folhas em álcool hidratato a 96%, macerado de folhas secas e suco *in natura* do endocarpo de *Citrus limon* (L.) Burn (EVERTON et. al., 2018). Os resultados para o extrato etanólico e em acetato de etila, não apresentaram neste estudo, atividade antibacteriana significativa, os halos podem ser considerados pequenos e sem muitas perspectivas, ao menos em relação à concentração estudada. A diferença existente entre os dois extratos, uma vez que o extrato em acetato de etila é mais rico em metabólitos do que o extrato etanólico, não apresentou grandes diferenças em relação ao halo de



inibição das bactérias estudadas. Logo os resultados para os dois extratos foram poucos expressivos e a diferença de seletividade de ambos não apresentou valores de inibição heterogêneos.

O estudo realizado é de modo qualitativo o que impossibilita a obtenção de dados exatos a respeito de teor dos compostos de cada amostra que foi eficaz. Para a determinação da concentração inibitória mínima de cada amostra é necessário quantificar a quantidade presente de cumarinas, flavonoides e terpenos em cada amostra (NASCIMENTO et. al., 2007).

É sabido que o *Citrus x limonia* é resultado de um cruzamento entre as espécies mencionadas e é provável que os resultados obtidos no experimento atual, mesmo que pequenos, sejam relacionados pela composição química do fruto que está presente em ambas às espécies originárias do cruzamento, que apresentam atividade contra os mesmo tipos de bactérias comuns a todos os experimentos.

CONCLUSÃO

O estudo acerca da atividade antibacteriana do *Citrus x limonia* inclui na literatura uma espécie ainda não explorada pela comunidade científica, visto a pouca informação que consta a respeito da mesma. O estudo inclui novas informações a respeito da composição química da espécie e seu potencial diante de algumas cepas bacterianas. No entanto, a espécie vegetal investigada pode contribuir com a descoberta e desenvolvimento de novas terapias antimicrobianas, porém sua química detalhada e sua atividade biológica, devem ser melhor investigadas.

Também é importante explorar e avaliar o potencial do óleo essencial em geral frente à inibição microbiana, visto que, os estudos em sua maioria são muito positivos e pode garantir futuramente uma nova alternativa na busca de novas terapias antimicrobianas. Faz-se necessário um estudo a

respeito de sua concentração mínima bactericida (CMB) e concentração mínima inibitória (CMI).

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

BASSO, M.E.; PULCINELLI, R.S.R.; AQUINO, A.R.C.; SANTOS, K.F. Prevalência de infecções bacterianas em pacientes internados em uma unidade de terapia intensiva (UTI). RBAC, 48(4): 383-388, 2016.

CAETANO, N.L.B.; FERREIRA, T.F.; REIS, M.R.O.; NEO, G.G.A.; CARVALHO, A.A. Plantas medicinais utilizadas pela população do município de Largato-SE, Brasil – ênfase em pacientes oncológicos. Rev. Bras. Pl. Med, 17(4): 748-756, 2015.

ESTEVAM, E.B.B.; SILVA, E.M.; MIRANDA, M.L.D.; ALVES, J.M.; PEREIRA, P.S.; SILVA, F.G.; ESPERANDIM, V.R.; MARTINS, C.H.G.; AMBROSIO, M.A.L.V.; TÓFOLI, D.; JUNIOR, L.R.A.; ALVES, C.C.F. Avaliação das atividades antibacterianas, tripanocida e citotóxica do extrato hidroalcoólico das raízes de *Tradescantia silamontana* Matuda (Veludo branco) (Commelinaceae). Rev. Bras. Pl. Med, 18(2): 425-422, 2016.

EVERTON, G.O.; SILVA, M.G.S.; TELES, A.M.; MOUCHREK, A.N. Atividade antioxidante e antimicrobiana das folhas e frutos de *Citrus limon* (L.) Burn (Limão siciliano). Rev. Cub. Plant. Med., 23(4), 2018.

FARMACOPEIA BRASILEIRA. 5. ed. Brasília: Agência Nacional De Vigilância Sanitária, 2010.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A.; Plantas medicinais no Brasil: Nativas e Exóticas. 2 ed.: Plantarum. 470-471, 2002.

LOUREIRO, R.J.; ROQUE, F.; RODRIGUES, A.T.; HERDEIRO, M.T.; RAMALHEIRA, E. O uso de antibióticos e as resistências bacterianas: breves notas sobre a sua evolução. Rev. Port. Saú. Pub, 34(1): 77-84, 2016.

MEDEIROS, M.A.A.; ALVES, M.S.; SIMÃO, K.L.A.; PEREIRA, C.T.; SIMÃO, B.L.A.; PESSOAS, H.L.F.; DINIZ, M.F.F.M.; FILHO, A.A.O. Avaliação da atividade bacteriana do óleo essencial de *lavandula hybrida* grosso contra cepas de *Escherichia coli*. Rev. Saú. Cie. On., 8(2): 58-65, 2019.

NASCIMENTO, P.F.C.; NASCIMENTO, A.L.C.; RODRIGUES, C.S.; ANTONIOLLI, A.R.; SANTOS, P.O.; JÚNIOR, A.M.B.; TRINDADE, R.C. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais: uma abordagem multifatorial dos métodos. Rev. Bras. Farmacogn., 17 (1): 108-113, 2007.

SANTOS, C.H.S.; PICCOLI, R.H.; TEBALDI, V.M.R. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais e compostos isolados frente aos agentes patogênicos de origem clínica e



alimentar. Rev. Inst. Ado. Lut., 76(1): 1-8, 2017.

SILVA, R.S.; R, C.M.R.; BORGES, M.N.; BLOIS, G.S.O. Óleo essencial de limão no ensaio da cromatografia em camada delgada. Rev. Qui. Nov., 31(8): 2234-2237, 2009.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L A.; PETROVICK, P.R. Farmacognosia da Planta ao Medicamento. 6 ed.: UFRGS , 2007.

XAVIER, M.N.; ALVES, J.M.; CARNEIRO, N.S.; SOUCHIE,

E.L.; SILVA, E.A.J.; MARTINS, C.H.G.; AMBROSIO, M.A.L.V.; EGEA, M.B.; ALVES, C.C.F.; MIRANDA, M.L.D. Composição química do óleo essencial de *Cardiopetalum colophyllum* schlttdl. (Annonaceae) e suas atividades antioxidantes, antibacteriana e antifúngica. Rev. Vir. Qui., 8(5): 1-16, 2016.

ZAGO, L.M.S. Vinte e dois anos de pesquisa sobre plantas medicinais: uma análise cienciométrica. Rev. Edu. Cie. Tec. IFG, 3(1): 157-173, 2018.