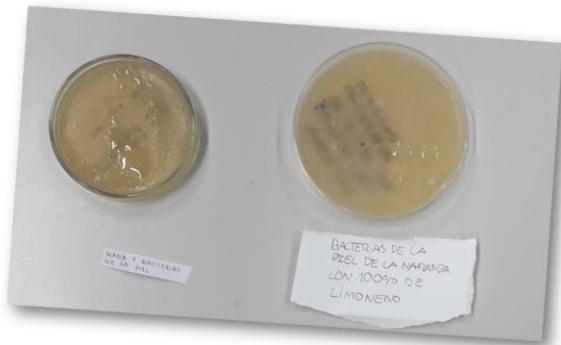


### Atividade adicional

# Ciência cítrica: aprende com limoneno

## Atividade adicional 1: atividade antibacteriana

Muitos óleos essenciais apresentam atividade antimicrobiana.<sup>[1]</sup> Nesta experiência, os alunos podem investigar as propriedades antibacterianas do limoneno. Deve levar cerca de 45 minutos para fazer a montagem, depois, os resultados são registrados após 7 a 14 dias.



Crescimento bacteriano em placa de Petri

*Imagem cortesia dos autores*

### Materiais

- 24 pedaços de algodão
- Pequenos disco de papel
- 7 placas de Petri com tampas
- 1 laranja orgânica
- lixívia
- Etanol (96%)
- Meio de cultura, por exemplo: por exemplo: 300 ml de água; 10 g de extrato de caldo de carne, 10 g de açúcar branco, 4 g de ágar
- Culturas de *Escherichia coli* ou zangaratoas das superfícies da sala de aula

### Procedimento

1. The teacher or technician should make up agar plates before the lesson. Subsequent steps are performed by students.
2. Using gloves, rub a damp (not dripping) cotton ball or swab over the skin of an orange.
3. Soak the cotton ball or swab in a test tube with a small amount (1–2 ml) of distilled water.
4. Dilute the sample (10×); put 1 ml of water extracted from the cotton and add 9 ml of water.



5. Withdraw 1 ml of the diluted sample, add it to a new cotton ball or swab, and spread over the entire surface of six of the seven Petri dishes.
6. Seed the seventh petri dish with *E. coli* or bacteria swabbed from the classroom. To this dish, add a circle of paper with 0.1 ml of undiluted limonene on it.
7. Put 0.1 ml of limonene on a circle of paper and add it to one of the six remaining petri dishes (seeded with bacteria from the orange skin).
8. Make up a dilution of 25 % limonene in alcohol.
9. Put 0.1 ml of limonene sample on a circle of paper. Also try orange peel: squeeze the skin on the paper first and then put it in the petri dish.
10. Prepare controls with alcohol (solvent control), nothing on the paper (negative control), and bleach (positive control).
11. Place lids on the petri dishes, seal with tape, and write your name and the chemicals added. Store the plates upside down at room temperature.
12. After 7–14 days, take photos of the petri dishes and write down the results.
13. When the experiment has finished, add bleach to sterilize the petri dishes.

### Results/Discussion

Cultura bacteriana	Produto químico adicionado	Crescimento bacteriano
Bacteria from the surface of the orange skin	Lixívia (Control –)	–
	Nada (Control +)	+
	Álcool (Controle para soluções)	+
	Limoneno 100%	+
	Limoneno 25% diluído em álcool	+
	Extrato de casca de laranja	+
<i>E. coli</i> or bactérias isoladas da sala de aulas	Limoneno 100%	–

Os controles positivos e negativos de lixívia, nada e etanol produzem os resultados esperados, por isso a experiência está bem feita. Nem o limoneno nem o óleo de casca de laranja inibem o crescimento de microrganismos na superfície da casca da laranja.

Estudos mostraram que o limoneno pode inibir o crescimento de várias bactérias,<sup>[2–4]</sup> mas não inibe o crescimento de bactérias da casca de laranja. Isso pode ser explicado por um processo de adaptação evolutiva de alguns tipos de bactérias comuns na área mediterrânea onde crescem plantas que produzem limoneno.

Da mesma forma, onde crescem frutas cítricas, é natural que frutas maduras e folhas caiam no chão, dispersando o limoneno: contudo, algumas famílias de bactérias estão adaptadas para degradar essa substância.



## Atividade adicional 2: atividade anti-germinação

Os óleos essenciais podem inibir a germinação das sementes. Nesta atividade, os alunos podem investigar a capacidade anti-germinativa do limoneno. Deve demorar cerca de 30 min.

### Materiais

- 30 sementes de lentilha secas ou outras sementes de germinação rápida
- Água
- Etanol (96%)
- (S)-limoneno
- casca de laranja
- algodão
- 6 placas de Petri de 7–9 cm de diâmetro com tampas
- 10 pipetas de plástico

### Procedimento

1. Umedeça um pedaço de algodão; não deve pingar água.
2. Coloque o algodão numa placa de Petri.
3. Coloque 5 sementes em cima do algodão molhado.
4. Cubra e feche uma das três placas de Petri.
5. Coloque um pedaço de casca de laranja na segunda placa de Petri e feche-a.
6. Coloque uma pequena bola de algodão em cada uma das outras três placas de Petri.
7. Coloque uma gota de (S)-limoneno puro na pequena bola de algodão na terceira placa de Petri (concentração de 100% de limoneno).
8. Dilua 1 ml de limoneno com 1 ml de álcool (concentração de 50% de limoneno).
9. Coloque uma gota de limoneno (concentração de 50%) na pequena bola de algodão na quarta placa de Petri.
10. Dilua 1 ml de limoneno com 3 ml de álcool (concentração 25% de limoneno).
11. Coloque uma gota de limoneno (concentração de 25%) na pequena bola de algodão na quinta placa de Petri.
12. Diluir 1 ml de limoneno com 9 ml de álcool (concentração de 10% de limoneno).
13. Coloque uma gota de limoneno (concentração de 10%) na pequena bola de algodão na sexta placa de Petri.
14. Coloque tampas em todas as placas de Petri, feche-as com fita adesiva para evitar abertura e guarde as placas de Petri em temperatura ambiente. Elas podem ser armazenadas em condições claras ou escuras; deve ser a mesma condição para todas as amostras.
15. Os resultados devem ser observados após 3 a 5 dias.

## Discussão



Inibição da germinação de sementes por limoneno

*Imagem cortesia dos autores*

	Número de lentilhas germinadas	% de lentilhas germinadas
Nada (Controlo +)	5/5	100
Limoneno 100%	0/5	0
Limoneno 50%	0/5	0
Limoneno 25%	0/5	0
Limoneno 10%	0/5	0
Casca de laranja	5/5	100

- O limoneno inibe a germinação das lentilhas; funciona com todas as concentrações utilizadas: 100%, 50%, 25% e 10%.



- A casca de laranja não inibe a germinação. Isso pode ser porque a concentração de limoneno é menor do que nas outras experiências.

A atividade anti-germinativa foi relatada para limoneno e outros óleos essenciais e pode ser um mecanismo para as plantas produtoras limitarem a competição das espécies de plantas próximas.[5,6]

## References

- [1] Tongnuanchan P, Benjakul S (2014) [Essential oils: extraction, bioactivities, and their uses for food preservation](#). *Journal of Food Science* **79**: R1231–R1249. doi: 10.1111/1750-3841.12492
- [2] Espina L et al. (2013) [Mechanism of Bacterial Inactivation by \(+\)-Limonene and Its Potential Use in Food Preservation Combined Processes](#). *PLOS One* **2**: e56769. doi: 10.1371/journal.pone.0056769
- [3] Aggarwal KK et al. (2002) [Antimicrobial activity profiles of the two enantiomers of limonene and carvone isolated from the oils of \*Mentha spicata\* and \*Anethum sowa\*](#). *Flavour and Fragrance Journal* **17**: 59–63. doi:10.1002/ffj.1040
- [4] Celaya LS et al. (2014) [The inhibition of methicillin-resistant \*Staphylococcus aureus\* by essential oils isolated from leaves and fruits of \*Schinus areira\* depending on their chemical compositions](#). *Acta Biochimica Polonica* **61**: 41–46. doi:10.18388/abp.2014\_1921
- [5] Abraham D et al. (2000) [Effects of four monoterpenes on germination, primary root growth, and mitochondrial respiration of maize](#). *Journal of Chemical Ecology* **26**: 611–624. doi: 10.1023/A:1005467903297
- [6] Azirak S, Karaman S (2007) [Allelopathic effect of some essential oils and components on germination of weed species](#). *Acta Agriculturae Scandinavica, Section B — Soil & Plant Science* **58**: 88–92. doi: 10.1080/09064710701228353