

INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E
TECNOLOGIA GOIANO – IF GOIANO - CAMPUS RIO VERDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGROQUÍMICA

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DO ÓLEO ESSENCIAL
DA CASCA DA FRUTA *CITRUS RETICULATA***

Autora: Anne Caroline da Silva Duarte Oliveira
Orientadora: Dra. Cassia Cristina Fernandes Alves

RIO VERDE – GO
Novembro – 2020

INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E
TECNOLOGIA GOIANO – IF GOIANO - CAMPUS RIO VERDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGROQUÍMICA

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DO ÓLEO ESSENCIAL
DA CASCA DA FRUTA *CITRUS RETICULATA***

Dissertação apresentada, como parte das exigências para obtenção do título de MESTRE EM AGROQUÍMICA, ao Programa de Pós-Graduação em Agroquímica do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – Campus Rio Verde - Área de concentração Agroquímica

Autora: Anne Caroline da Silva Duarte Oliveira
Orientadora: Dra. Cassia Cristina Fernandes Alves

RIO VERDE – GO
Novembro – 2020

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR PRODUÇÕES TÉCNICO-CIENTÍFICAS NO REPOSITÓRIO INSTITUCIONAL DO IF GOIANO

Com base no disposto na Lei Federal nº 9.610/98, AUTORIZO o Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano, a disponibilizar gratuitamente o documento no Repositório Institucional do IF Goiano (RIIF Goiano), sem ressarcimento de direitos autorais, conforme permissão assinada abaixo, em formato digital para fins de leitura, download e impressão, a título de divulgação da produção técnico-científica no IF Goiano.

Identificação da Produção Técnico-Científica

[] Tese
 [x] Dissertação
]
 [] Monografia – Especialização
 [] TCC - Graduação
 [] Produto Técnico e Educacional - Tipo:
 [] Artigo Científico
 [] Capítulo de Livro
 [] Livro
 [] Trabalho Apresentado em Evento

Nome Completo do Autor: Anne Caroline da Silva Duarte Oliveira

Matrícula: 20182033103I0015

Título do Trabalho: Caracterização química e atividades biológicas do óleo essencial da casca da fruta *citrus reticulata*

Restrições de Acesso ao Documento

Documento confidencial: [] Não [x] Sim, justifique: _____

Informe a data que poderá ser disponibilizado no RIIF Goiano: 01/02/2021

O documento está sujeito a registro de patente? [] Sim [x] Não

O documento pode vir a ser publicado como livro? [] Sim [x] Não

DECLARAÇÃO DE DISTRIBUIÇÃO NÃO-EXCLUSIVA

O/A referido/a autor/a declara que:

- o documento é seu trabalho original, detém os direitos autorais da produção técnico-científica e não infringe os direitos de qualquer outra pessoa ou entidade;
- obteve autorização de quaisquer materiais inclusos no documento do qual não detém os direitos de autor/a, para conceder ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano os direitos requeridos e que este material cujos direitos autorais são de terceiros, estão claramente identificados e reconhecidos no texto ou conteúdo do documento entregue;
- cumpriu quaisquer obrigações exigidas por contrato ou acordo, caso o documento entregue seja baseado em trabalho financiado ou apoiado por outra instituição que não o Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano.

Anne Caroline da Silva Duarte Oliveira

Rio Verde, GO, 26/01/2021.
Local Data

Assinatura do Autor e/ou Detentor dos Direitos Autorais

Ciente e de acordo:

Carina P.F. Alves

Assinatura do(a) orientador(a)



**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO SECRETARIA DE
EDUCAÇÃO PROFISSIONAL E TECNOLÓGICA INSTITUTO FEDERAL DE
EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA GOIANO**

Documentos 72/2020 - NREPG-RV/CPG-RV/DPGPI-RV/CMPRV/IFGOIANO

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DO ÓLEO ESSENCIAL DA
CASCA DA FRUTA
DE CITRUS RETICULA TA**

Autora: Anne Caroline da Silva Duarte
Oliveira Orientadora: Cassia Cristina
Fernandes Alves

TITULAÇÃO: Mestre em Agroquímica - Area de Concentração Agroquímica

Prof. Dr. Eugenio Miranda

Sperandio

Avaliador externo - IF Goiano /
Polo de Inovação

Prof.ª Dr.ª Adriane da Silveira Gomes

Avaliadora externa - IF Goiano /
Campus Iporá

APROVADA em 30 de novembro de 2020.

Prof.ª Dr.ª Erika Crispim
Resende

Avaliadora externa - IF Goiano /
Campus Iporá

Prof.ª Dr.ª Cassia Cristina

Fernandes Alves
Presidente da Banca - IF Goiano /
Campus Rio Verde

Documento assinado eletronicamente por:

- Erika Crispim Resende, PROFESSOR ENS BASICO TECN TECNOLOGICO, em 01/12/2020 09:08:01.
- Adriane da Silveira Gomes, PROFESSOR ENS BASICO TECN TECNOLOGICO, em 30/11/2020 16:26:30.
- Eugenio Miranda Sperandio, 2019102331540209 - Discente, em 30/11/2020 11:54:03.
- Cassia Cristina Fernandes Alves, PROFESSOR ENS BASICO TECN TECNOLOGICO, em 30/11/2020 11:49:02.

Este documento foi emitido pelo SUAP em 30/11/2020. Para comprovar sua autenticidade, faça a leitura do QRCode ao lado ou acesse <https://suap.ifgoiano.edu.br/autenticar-documento/> e forneça os dados abaixo:

Código Verificador: 216372

Código de Autenticação: 3da2183535



AGRADECIMENTOS

Quero agradecer primeiramente a Deus, que me deu forças para eu continuar e chegar até aqui.

A minha mãe Ada Jeane, que têm sido meu suporte durante toda essa caminhada, e eu não teria conseguido nada disso sem ela. Você é meu exemplo.

A minha melhor amiga e parceira de vida, Kerollin Hanay, por muitas vezes me ajudar a continuar quando eu queria desistir me apoiando, comemorar cada passo comigo, obrigada por estar sempre ao meu lado.

A minha orientadora Dra. Cassia Fernandes, eu não tenho como agradecer por todo apoio, você é uma pessoa incrível, pela qual eu tenho muita admiração. Ao professor Mayker Dantas que me coorientou e sempre esteve disposto a me ajudar.

A todos os alunos e colegas do Laboratório de Produtos Naturais, Ao Instituto Federal Goiano Campus Rio Verde e ao Programa de Pós-Graduação em Agroquímica pela oportunidade.

BIOGRAFIA DO AUTOR

Anne Caroline da Silva Duarte Oliveira, filha de Ada Jeane da Silva Duarte e Elziron Messias de Oliveira, nasceu em 12 de maio de 1997 na cidade de Iporá-GO. Graduiu-se em Licenciatura em Química no Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano - Campus Iporá, e em setembro do mesmo ano ingressou no Programa de Pós-Graduação em Agroquímica nível Mestrado no Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – Campus Rio Verde.

ÍNDICE

	Página
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 FAMÍLIA RUTACEAE.....	1
1.2 ÓLEOS ESSENCIAIS DOS CITROS.....	2
1.3 ATIVIDADE BIOLÓGICA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DOS CITROS.....	3
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	4
2. OBJETIVOS.....	7
2.1 Geral.....	7
2.2 Específicos.....	7
3. CAPÍTULO I.....	8
3.1 INTRODUÇÃO.....	8
3.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	9
3.3 CONCLUSÕES.....	9
3.4 SESSÃO EXPERIMENTAL.....	13
3.4.1 MATERIAL DA PLANTA.....	13
3.4.2 EXTRAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL.....	13
3.4.3 IDENTIFICAÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO DE CASCA DE FRUTA DE C. RETICULATA (OE-CR).....	14
3.4.4 ENSAIO LARVICIDA.....	14
3.4.5 ENSAIO ANTILEISHMANECIDA.....	15
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	16
4 CAPÍTULO II.....	18
4.1 INTRODUÇÃO.....	18
4.2 MATERIAL E MÉTODO.....	20
4.2.1 MATERIAL DA PLANTA.....	20
4.2.2 EXTRAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL.....	20
4.3 ATIVIDADE ANTIFÚNGICA <i>IN VITRO</i> PELO MÉTODO DE DIFUSÃO EM DISCO..	21
4.4 ATIVIDADE ANTIFÚNGICA <i>IN VITRO</i> PELO MÉTODO DE DIFUSÃO EM DISCO POR EVAPORAÇÃO.....	22
4.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	22
4.6 CONCLUSÕES.....	27

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	28
4.7 CONCLUSÕES GERAIS.....	31

ÍNDICES DE TABELA

Capítulo I

Tabela 1. Composição química do óleo essencial da casca da fruta da <i>Citrus reticulata</i> (CR-OE).....	16
Tabela 2. Atividade Antileishmanicida do óleo essencial da casca da fruta do <i>Citrus Reticulata</i> (CR-OE).....	17

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Árvore pertencente a família <i>Rutaceae</i> e ao genero <i>Citrus Reticulata</i>	1
Figura 2. Percentual de inibição do crescimento micelial de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> de diferentes doses do óleo essencial da casca de <i>Citrus Reticulata</i> (CR-EO) através do método de difusão em disco.....	23
Figura 3. Percentual de inibição do crescimento micelial de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> de diferentes doses do óleo essencial da casca de <i>Citrus Reticulata</i> (CR-EO) através do método de difusão em disco por evaporação do OE.....	24

LISTA DE ABREVIACOES

OEs	Óleos Essenciais
OE-CR	Óleo Essencial <i>Citrus Reticulata</i>
CG-FID	Cromatografia gasosa-deteção de ionização de chama
CG-EM	Cromatografia gasosa-espectrometria de massa
DMSO	Dimetilsulfóxido
CL⁵⁰	Concentração letal a 50%
BDA	Batata dextrose agar

RESUMO

OLIVEIRA, A. C. S. D. Insituto Federal de Educação, Ciencia e Tecnologia Goiano – Campus Rio Verde, novembro de 2020. **Caracterização e Atividades Biológicas do óleo essencial da casca da fruta *Citrus Reticulata***. Orientadora: Dra. Cássia Cristina Fernandes Alves. Coorientadores: Dra. Elizabeth Josefi e Dr. Mayker L. Dantas Miranda.

Óleos essenciais (OE's) são produtos naturais extraídos de plantas através de diversos métodos de extração, como por exemplo, hidrodestilação. Frutas cítricas, que são muito ricas em óleos essenciais, pertencem a família *Rutaceae* que possui diversas espécies que pertencem ao genero “Citros”, como por exemplo o limão (*Citrus Limon*), a laranja (*Citrus Sinensi*) e a mexerica (*Citrus Reticulata*). Os OE's proveniente dessas espécies são conhecidos por possuírem atividades biológicas, como, antibacteriana, larvicida e antifúngica. Assim, o objetivo deste trabalho foi a extração do OE da casca da fruta da mexerica cheirosinha (*Citrus Reticulata*) para a avaliação de suas atividades biológicas e químicas. O óleo essencial da mexerica (OE-CR) foi extraído por hidrodestilação e a identificação dos componentes químicos presentes foi realizada por cromatografia gasosa com detector de chama (CG-FID) e por cromatografia em fase gasosa acoplada ao detector de massa (CG-EM). A atividade biológica *in vitro* foi testada como larvicida, *Aedes aegypti*, e anti-Leishmanicida, *Leishmania amazonensis*. A atividade antifúngica do OE-CR foi avaliada pelo método de difusão em disco e pelo método de evaporação do óleo essencial frente ao fungo *Sclerotinia Sclerotiorium*. A análise química revelou treze compostos identificados no óleo essencial da casca da fruta e representam 97,8% do total dos componentes do óleo. O OE-CR apresentou alta atividade contra formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* e revelou também alta atividade larvicida contra larvas de terceiro instar de *Aedes aegypti*. Na atividade antifúngica o OE-CR apresentou alta inibição do crescimento mycelial do fungo testado para o método de difusão em disco. O método de evaporação também apresentou atividade, porém, menor quando comparada ao de difusão.

PALAVRAS-CHAVES: Atividade antifúngica, atividade antileishmanecida, atividade larvicida, limoneno.

ABSTRACT

OLIVEIRA, A. C. S. D. Goiano Federal Institute of Education, Science and Technology - Rio Verde Campus, November 2020. **Characterization and Biological Activity of the essential oil of the fruit peel *Citrus Reticulata***. Advisor: Dra. Cássia Cristina Fernandes Alves. Co-advisor: Dra. Elizabeth Josefi and Dr. Mayker L. Dantas Miranda.

Essential oils (EO's) are natural products extracted from plants through various extraction methods, such as hydrodistillation. Citrus fruits, which are very rich in essential oils, belong to the *Rutaceae* family, which has several species that belong to the genus "Citros", such as lemon (*Citrus Limon*), orange (*Citrus Sinensi*) and tangerine (*Citrus Reticulata*). The OE's from these species are known to have biological activities, such as antibacterial, larvicidal and antifungal. The objective of this study was the OE extraction from the peel of the cheirosinha tangerine (*Citrus Reticulata*) fruit to evaluate its biological and chemical activities. The essential oil of the tangerine (CR-EO) was extracted by hydrodistillation and the identification of the chemical components present was carried out by chromatography in gas phase (CG-FID) and gas chromatography mass spectrometry (CG-EM). The biological activity in vitro was studied to larvicide, *Aedes aegypti*, and anti-Leishmania, *Leishmania amazonensis*. The antifungal activity of the OE-CR was evaluated using the disk diffusion method and the fumigation method against the fungus *Sclerotinia Sclerotiorum*. The chemical analysis revealed thirteen compounds identified in the fruit's peel oil and represent 97.8% of the total components of the oil. The CR-EO showed high activity against promastigote forms of *Leishmania amazonensis* and also revealed high larvicidal activity against third instar larvae of *Aedes aegypti*. In antifungal activity, the OE-CR presents high mycelial growth inhibition by the disk diffusion method. The evaporation method showed less activity when compared to the diffusion method.

KEY WORDS: Antifungal activity, anti-aging activity, limonene, larvicidal activity.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Família Rutaceae

As plantas têm sido utilizadas com fins medicinais desde o início da civilização humana com a finalidade de prevenção, tratamento e cura de diversas doenças. A família Rutaceae consiste aproximadamente de 150 gêneros e 1.600 espécies, distribuídas amplamente em regiões tropicais, subtropicais e temperadas do mundo. O Citrus é um gênero que compreende aproximadamente 70 espécies que são ricas em flavonoides, óleos voláteis, cumarinas e pectinas (Carvalho, et al., 2013).



Figura 1. Frutos pertencentes a árvore da família *Rutaceae* e ao gênero *Citrus Reticulata* (FONTE: <https://www.safarigarden.com.br/muda-de-mexerica>).

A família rutaceae é caracterizada por árvores ou arbustos aromáticos, algumas vezes espinescentes; com folhas alternas ou ocasionalmente opostas, folhas compostas ou raramente simples, sem estípulas e com pontuações translúcidas no limbo. Destaca-se o gênero Citrus (laranjas, limões e limas) pela notável importância econômica. Entretanto, outras espécies apresentam potencial farmacêutico, madeireiro e ornamental (Buriel, Thomas & Alves, 2014).

O principal centro de diversidade da família *Rutaceae* é a Australásia, e os centros secundários estão no sul da África e na América Tropical. Na região

Neotropical ocorrem a cerca de 52 gêneros, e no Brasil 32 gêneros e 195 espécies (BFG, 2015), com diversidade concentrada na floresta Atlântica e na Amazônia. Na Serra dos Carajás foram registradas 20 espécies de Rutaceae, pertencentes a 15 gêneros, porém apenas oito delas (em seis gêneros) ocorrem sobre substrato de canga (Piranni & Devecchi, 2018).

O crescimento da produção nas indústrias de alimentos tem causado aumento de resíduos dos citros (cascas e sementes). Esses resíduos são mais frequentemente descartados, causando problemas de contaminação ambiental pois eles têm maior probabilidade de serem degradados por microrganismos.

A família Rutaceae contém vários metabólitos secundários, especialmente cumarinas, alcaloides, triterpenos, limonoides e flavonoides e muitos desses metabólitos apresenta atividades, incluindo larvicida, antibacteriana e antifúngica (Duarte, et al., 2019).

1.2 Óleos essenciais dos citros

Os óleos essenciais que são nomeados como óleos voláteis, óleos aromáticos, óleo etéricos são um dos componentes importantes dos produtos químicos vegetais. Esses óleos originados de plantas aromáticas podem ser encontrados em toda a planta ou em órgãos como folhas, frutas, casca, eles são misturas complexas de compostos orgânicos voláteis produzidos como metabólitos secundários nas plantas. Eles são constituídos por hidrocarbonetos (frequentemente mono e esquiterpenos) e compostos oxigenados (álcoois, ésteres, éteres, aldeídos, cetonas, lactonas, fenóis e éteres de fenol) (Bozkur et al., 2017). Espécies do gênero *Citrus* foram destacadas porque são ricas em óleos essenciais que são muito versáteis e frequentemente usados como aromatizantes em diversos produtos, como bebidas, sabonetes, cosméticos e produtos domésticos (Lemes et al., 2017).

Por seus valores nutricionais e aromas agradáveis, alguns sucos de frutas cítricas são utilizados como bebida funcional. Limonoides são os principais compostos encontrados nas cascas de frutas cítricas, e produzem o sabor amargo e o aroma das raspas

Eles são misturas naturais complexas de substâncias lipofílicas, que podem conter a cerca de 20-60 componentes em diferentes concentrações. Eles são caracterizados por dois ou três componentes principais (limoneno, p-cimeno e o-

cimeno) em concentrações razoavelmente altas (20-70%) em comparação com outros compostos presentes em pequenas quantidades (Palazollo, et al., 2013).

Os efeitos farmacológicos dos principais constituintes dos OEs foram focalizados por muitos grupos de pesquisa em nos últimos anos. Podendo ser destacadas suas atividades antioxidante, anticanceriana e anti-inflamatório. (Lenardao, et al., 2016).

1.3 Atividade biológica dos OEs dos citros

OEs e extratos obtidos de muitas destas plantas ganharam recentemente grande popularidade e interesse científico. Na maioria das plantas os compostos fenólicos são classificados e são reconhecidos como GRAS (*Generally Regarded As Safe* - Geralmente Considerado Como Seguro), portanto, podem ser usados para impedir o crescimento de muitos microrganismos patogênicos e deteriorantes em alimentos (Velazquez-Nunes, et al., 2013).

Os OEs cítricos podem ser usados como fungicidas naturais e estão presentes em grandes quantidades no flavedo das frutas cítricas. Seus constituintes voláteis são uma mistura de monoterpeno (limoneno) e sesquiterpeno, hidrocarbonetos e seus derivados oxigenados, como aldeídos, cetonas, ácidos, álcoois e ésteres, o conteúdo depende do cultivar cítrico específico, bem como da extração e métodos de separação (Tao, Jia & Zhou, 2013).

A aplicação de conservantes antifúngicos para inibir o crescimento de fungos e produção de micotoxinas durante os processos alimentares foi considerada como uma das estratégias eficazes para melhorar a segurança da cadeia de mantimentos de alimentos. Agentes antifúngicos naturais, como alguns óleos essenciais (OEs), receberam atenções crescentes, como alternativas possíveis para combater fungos, aproveitando assim ao máximo os componentes dos citros para desenvolver novos produtos e melhorar a utilização e o valor agregado (Wang et al., 2019), pois os fungos patogênicos e toxigênicos são controlados principalmente por fungicidas sintéticos, mas seu tratamento pode ser frequentemente problemático por sua natureza residual e alta toxicidade para mamíferos (Singh et al., 2010).

Outra aplicação para OEs de frutas cítricas é como agentes de controle de larvas de mosquitos, uma vez que estes constituem uma rica fonte de compostos bioativos que são biodegradáveis e não tóxicos para a saúde humana, tornando-os

produtos potencialmente adequados para aplicação. Na verdade, pesquisadores têm relatado a eficácia dos óleos essenciais de plantas usados contra larvas de mosquitos (Mdoee, et al., 2014).

Leishmaniose, uma infecção parasitária causada por protozoários do gênero *Leishmania*. A cerca de 350 milhões de pessoas em todo o mundo correm o risco de contrair uma das formas da doença, e a cerca de 2 milhões novos casos ocorrem anualmente, principalmente entre os mais pobres populações em países em desenvolvimento (Kauffman,et al., 2019). Estudos vêm sendo realizados para utilização de OEs e extratos de plantas contra as formas da Leishmaniose (Howell,et al., 2015; Islamuddin,et al., 2015; Marques,et al., 2011; Cardoso,et al., 2015; Andrade,et al., 2018).

S. sclerotiorum é um patógeno altamente prejudicial com diversos modos de infecção e alimentação estilo de vida dupla do biotrófico e do necrotrófico. Ele ataca as plantas hospedeiras por meio de ascósporos que podem ser descarregado a força para cima da apotécia pelo o ar, ou pelo micélio decorrentes de tecido infectado ou de escleródios germinados no solo (Xia,et al., 2020). Com intenção de manejo do fitopatógeno na agricultura, vem se buscando alternativas aos fungicidas tradicionais que acabam causando grande impacto ambiental e na saúde humana. Uma das opções é a utilização dos OEs e extratos de plantas bioativas que possuem efeito inibitório para os fitopatógenos e que sejam menos agressivos para o meio ambiente e saúde humana (Fontana,et al., 2020).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDRADE, P. M. et al . Chemical composition and evaluation of antileishmanial and cytotoxic activities of the essential oil from leaves of *Cryptocarya aschersoniana* Mez. (Lauraceae Juss.). **An. Acad. Bras. Ciênc.**, Rio de Janeiro , v. 90, n. 3, p. 2671-2678, Sept. 2018 .
- BOZKURT, T., GÜLNAZ, O., & KAÇAR, Y.A. Chemical composition of the essential oils from some citrus species and evaluation of the antimicrobial activity, 2017.

- BURIL, M. T; THOMAS, W. W.; ALVES, M. Flora da Usina São José, Igarassu-PE: Rutaceae, Simaroubaceae e Picramniaceae. **Rodriguésia**, Rio de Janeiro , v. 65, n. 3, p. 701-710, Sept. 2014.
- BFG. 2015. Growing Knowledge: an overview of Seed Plant diversity in Brazil. **Rodriguésia** 66: 1085-1113.
- CARVALHO, R. B. F. ANTONIA A. C. F., RIVELILSON M. L. L. SILVA, D. J. P., JORGE M., & FEITOSA, C. M. Composição química e atividade anticolinesterásica de uma fração ativa do extrato de folhas de Citrus limon (L.) Burm. **Quím. Nova**, São Paulo , v. 36, n. 9, p.1375-1379, 2013.
- CARDOSO, B. M. et al . Antileishmanial activity of the essential oil from Tetradenia riparia obtained in different seasons. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro , v. 110, n. 8, p. 1024-1034, Dec. 2015.
- DUARTE, G. K. G. F., MENEZES, A. C. S., NANES, P. L. F., BUENO, O. C., SANTOS, R. G., & S. JUNIOR, W. M. TOXICITY OF *Esenbeckia pumila* Pohl (Rutaceae) ON *Artemia salina* AND *Atta sexdens rubropilosa*. **Rev. Caatinga**, Mossoró , v. 32, n. 1, p. 101-112, Mar. 2019 .
- HOUËL, E. GONZALEZ, G. BESSIÈRE, J. ODONNE, G. EPARVIER, V. DEHARO, E. & STIEN, D. Therapeutic switching: from antidermatophytic essential oils to new leishmanicidal products, Rio de Janeiro , v. 110, n. 1, p. 106-113, Feb. 2015.
- ISLAMUDDIN M. CHOUHAN G. WANT M. TYAGI M. ABDIN M. Z. SAHAL D. AFRIN F. Leishmanicidal activities of *Artemisia annua* leaf essential oil against Visceral Leishmaniasis, *Frontiers in Microbiology*, v. 5, p. 626 DOI: 10.3389/fmicb.2014.00626, 2015.
- KAUFFMANN, Carla et al . Antileishmanial in vitro activity of essential oil from *Myrciaria plinioides*, a native species from Southern Brazil. **Braz. J. Pharm. Sci.**, São Paulo , v. 55, e17584, 2019 .
- LEMES, R. S., ALVES, C. C.F., ESTEVAM, E. B.B., SANTIAGO, M B., MARTINS, C. H.G., SANTOS, T. C.L. DOS, CROTTI, A. E.M., & MIRANDA, M. L.D.. (2018). Chemical composition and antibacterial activity of essential oils from *Citrus aurantifolia* leaves and fruit peel against oral pathogenic bacteria. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 90(2), 1285-1292, 2017.
- LENARDAO, E. J. SAVEGNAGO, L., JACOB, R. G., VICTORIA, F. N., & MARTINEZ, D. M . Antinociceptive Effect of Essential Oils and Their

- Constituents: an Update Review. **J. Braz. Chem. Soc.**, São Paulo , v. 27, n. 3, p. 435-474, Mar. 2016
- MARQUES, A. M. BARRETO, A. L. S. CURVELO, J. A. R., ROMANOS, M. T. V. S. ROSANGELA M. de A., & KAPLAN, M. A. C. Antileishmanial activity of nerolidol-rich essential oil from *Piper clausenianum*. **Rev. bras. farmacogn.**, Curitiba , v. 21, n. 5, p. 908-914, Oct. 2011.
- MDOE, F.P., CHENG, SS., MSANGI, S. *et al.* Activity of *Cinnamomum osmophloeum* leaf essential oil against *Anopheles gambiae* s.s. *Parasites Vectors* **7**, 209 (2014), 2014.
- PALAZZOLO, E. LAUDICINA, V. A. GERMANÀ, M. A. . Current and Potential Use of Citrus Essential Oils, *Current Organic Chemistry*, vl. 17 DOI - 10.2174/13852728113179990122, 2013.
- PIRANI, J. R; DEVECCHI, M. F.. Flora das cangas da Serra dos Carajás, Pará, Brasil: Rutaceae. **Rodriguésia**, Rio de Janeiro , v. 69, n. 1, p. 209-217, Mar. 2018 .
- VELÁZQUEZ-NUÑEZ, M. J., AVILA-SOSA, R., Palou, E., & LÓPEZ-MALO, A. Antifungal activity of orange (*Citrus sinensis* var. Valencia) peel essential oil applied by direct addition or vapor contact. *Food Control*, 31(1), 1-4, 2013.
- SINGH, S. SINGH, N. KUMAR, V. DATTA, S. WANI, A. (2016). Toxicity, monitoring and biodegradation of the fungicide carbendazim. *Environmental Chemistry Letters*. 14. 10.1007/s10311-016-0566-2.
- TAO, N. JIA, L. ZHOU, H. . Anti-fungal activity of *Citrus reticulata* Blanco essential oil against *Penicillium italicum* and *Penicillium digitatum*. *Food Chemistry*. 153, 2014.
- WANG, H. et al. Antifungal evaluation of plant essential oils and their major components against toxigenic fungi. *Industrial Crops and Products*, v.120, p.180-186, 2018.
- XIA, S.; XU, Y.; HOY, R.; ZHANG, J.; QIN, L.; LI, X. The Notorious Soilborne Pathogenic Fungus *Sclerotinia sclerotiorum*: An Update on Genes Studied with Mutant Analysis. *Pathogens* **2020**, 9, 27.

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Identificar os compostos do óleo essencial da casca da mexerica cheirosinha (*Citrus reticulata*) e analisar suas atividades biológicas.

2.2. Específicos

- Realizar extração do óleo essencial da casca da fruta *Citrus reticulata*;
- Identificar a composição química do óleo essencial da casca da fruta *Citrus Reticulata*;
- Avaliar as atividades leishmanicida e larvicida *in vitro* do óleo essencial da casca da *Citrus Reticulata* (OE-CR);
- Avaliar a atividade antifúngica do OE-CR da casca da fruta frente a *Sclerotinia sclerotiorum*.

3. CAPÍTULO I

(Normas de acordo com a revista *Brazilian Archives of Biology and Tecnology*)

Óleo essencial de casca da fruta *Citrus reticulata*: composição química, atividades larvicida e antileishmanicida *in vitro*

Resumo

Estudos realizados investigaram a composição química e as atividades biológicas dos óleos essenciais de casca de frutas, folhas e flores de diferentes espécies de citros. Este trabalho tem como objetivo investigar a composição química, as atividades larvicida e leishmanicida do óleo essencial da casca da fruta *Citrus reticulata* (OE-CR). O OE-CR foi obtido por hidrodestilação em aparelho do tipo Clevenger, e a composição química analisada por GC-MS e GC-FID. Limoneno (85,7%), γ -terpineno (6,7%) e mirceno (2,1%) foram os principais componentes identificados. OE-CR apresentou atividade contra formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* (IC₅₀ = 8,23 μ g / mL). O CR-OE revelou também para a atividade larvicida contra larvas de terceiro instar de *Aedes aegypti* a concentração letal (CL⁵⁰ = 58,35 μ g / mL) e 100% de mortalidade a 150 μ g / mL. Neste estudo os OEs apresentaram atividades larvicidas e contra formas promastigotas de *Leishmania Amazonensis*.

Palavras-chave: *Aedes aegypti*; limoneno; doença viral; *Leishmania amazonensis*; doença parasitária.

3.1. Introdução

A preocupação com controle e combate ao mosquito *Aedes aegypti*, principal vetor de transmissão da grave doença hemorrágica conhecida como dengue, é latente (Wankhar et al., 2015). O número de casos de dengue abrange a cerca de 400 milhões de ocorrências por ano. Nos últimos 50 anos esta doença chegou a ser endêmica em 128 países, incluindo outros 36 países que eram considerados livres da doença. As maiores prevalências são observadas em países das Américas, Ásia e África, resultando na exposição de 3.97 bilhões de habitantes ao risco de infecção (Brady et al., 2012). Além dos vírus da dengue, o mosquito é vetor pode transmitir outras doenças conhecidas no mundo como a Chikungunya e a Zika (Neves et al., 2017). A leishmaniose é outra doença de preocupação mundial, também causada pela picada do vetor infectado conhecido como “*mosquito palha*” (*straw mosquito*) (Silva et al.,

2020). Estima-se que a cada ano surjam 2 milhões de novos casos de leishmaniose e que no mundo inteiro existam 15-20 milhões de pessoas que vivem com a doença (Crevelin et al., 2019). Na busca por plantas com potencial terapêutico, as espécies do gênero *Citrus* além de possuírem importância econômica, são também produtoras de óleos essenciais bioativos com elevado valor para perfume, comida, e indústrias de bebidas (Dosoky et al., 2018). Os óleos essenciais (OEs) e extratos da folha da *Citrus reticulata* e casca do fruto possuem várias aplicações biológicas tais como antimicrobiano, antioxidante, anti-inflamatório, anticancerígeno, antiproliferativo, anti-fibrose pulmonar, hipoglicêmico, inseticida e é também útil nos cuidados de pele (Hamdan et al., 2016; Apraj & Pandita, 2016). Neste contexto, este estudo visou avaliar a composição química, larvicida e atividades anti-*Leishmania amazonensis* do óleo essencial da casca da fruta de *C. reticulata* (OE-CR). Até agora, a avaliação da atividade larvicida da OE-CR contra larvas do terceiro estágio de *A. aegypti* não foi relatada na literatura.

3.2. Resultados e discussão

Os compostos voláteis foram identificados por cromatografia gasosa-detecção de ionização de chama (CG-FID) e cromatografia gasosa-espectrometria de massa (CG-EM). Treze compostos foram identificados no óleo da casca da fruta e representaram 97,8% do total dos componentes do óleo. Os principais compostos encontrados em OE-CR foram limoneno (85,7%), γ -terpineno (6,7%) e mirceno (2,1%) (Tabela 1). Relatórios anteriores de óleos essenciais de cascas de frutas de outras amostras de *C. reticulata*, mostraram que terpenos limoneno, sabineno, linalol, γ -terpineno, octanal e capraldeído foram seus principais constituintes (Hamdan et al., 2016; Martins et al., 2017). OEs de diferentes espécies de *Citrus* mostra semelhança química e predominância do monoterpeno limoneno, e estas características são enfatizadas por Bozkurt et al. (2017). Alta concentração de limoneno (74,38%) também foi identificada nas cascas de *C. reticulata* cultivada na Espanha (Espina et al., 2011). É digno de nota destacar um estudo recente realizado com dez espécies de *Citros*, que reforça a presença de compostos de limoneno em OE-CR (González-Mas et al., 2019).

Para o OE-CR foi investigado sua atividade larvicida contra larvas de terceiro estágio de *A. aegypti*. Inicialmente, as larvas em contato com o OE-CR apresentaram movimentos acelerados. Porém, com a exposição prolongada, passaram a apresentar

tremores e movimentos lentos ou letárgicos, mesmo quando estimulados artificialmente. O OE-CR também causou o escurecimento de todo o corpo larval. As doses de 12,5, 25, 50 e 100 $\mu\text{g} / \text{mL}$ resultaram em 10,2, 25,1, 51,7 e 85,3% de larvas mortas, respectivamente, enquanto 150 $\mu\text{g} / \text{mL}$ garantiram 100% de mortalidade. O LC^{50} de CR-OE foi de 58,35 $\mu\text{g} / \text{mL}$. Os óleos essenciais de várias espécies de Citros já foram testados contra larvas de *A. aegypti*, entretanto, este é o primeiro promissor relato para *C. reticulata*. Pode-se mencionar que a atividade larvicida ou inseticida já foi avaliada para os OEs de *C. sinensis*, *C. limon*, *C. grandis*, *C. aurantifolia*, *C. hystrix*, *C. maxima* e *C. medica* (Araújo et al., 2016; Gomes et al., 2019; Sarma et al., 2017; Sarma et al., 2019; Soonwera, 2015). Essa alta atividade larvicida pode ser pela alta concentração de limoneno ($\text{CL}^{50} = 27 \text{ mg} / \text{L}$) um inseticida botânico patentado como agente ativo integrante de formulações larvicidas (Dias et al., 2014).

Em relação a atividade leishmanicida, OE-CR se revelou bastante promissor contra as formas tripomastigosta de *L. amazonensis* ($\text{IC}_{50} = 8.23 \mu\text{g}/\text{mL}$) (Tabela 3). Vários autores reportam que OEs com valores de $\text{IC}_{50} < 10 \mu\text{g}/\text{mL}$ são considerados altamente ativos (Silva et al., 2020; Almeida et al., 2019; Alcoba et al., 2018). Esta mesma faixa de valores de IC_{50} que consideram EOs como altamente ativos é descrita por Estevam et al. (2016), ao estudarem os OEs das folhas secas de *C. limonia* e *C. latifolia*. Destacando que o resultado encontrado no presente estudo demonstrou que o OE-CR precisou de concentração menor do que quando comparado com o resultado descrito por Monzote et al. (2019), uma vez que o valor de IC_{50} de CR-OE obtido de forma comercial foi de 70.7 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Este fato nos leva a questionar a natureza de OEs comercializados de maneira não regulamentada. Por outro lado, a alta atividade leishmanicida de CR-OE encontrada no presente trabalho, pode ser também justificada pela presença do limoneno, um monoterpene que exibe ação leishmanicida contra parasitas do gênero *Leishmania* (Arruda et al., 2009)

3.3. Conclusões

O presente estudo descreveu a composição química do OE-CR, no qual foram identificados treze compostos, além de mostrar sua atividade larvicida contra larvas de *Aedes aegypti* e formas promastigotas anti-*Leishmania amazonensis*. A presença de limoneno como principal composto no OE-CR poderia explicar essa atividade larvicida e leishmanicida. Esta comunicação é o primeiro relatório sobre a avaliação larvicida de OE-CR.

Agradecimentos

Os autores agradecem à FAPEG e IF Goiano - Campus Rio Verde, pelo apoio financeiro.

Referências

- Almeida, K.C.R., Silva, B.B., Alves, C.C.F., Vieira, T.M., Crotti, A.E.M., Souza, J.M., Martins, C.H.G., Ribeiro, A.B., Squarisi, I.S., Tavares, D.C., Bernabé, L.S., Magalhães, L.G., Miranda, M.L.D. (2019). Biological properties and chemical composition of essential oil from *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez. leaves (Lauraceae). *Nat. Prod. Res.*, *14*, 1-5.
- Apraj, V.D., Pandita, N.S. (2016). Evaluation of skin anti-aging potential of *Citrus reticulata* blanco peel. *Phcog. Res.*, *8*, 160-168.
- Araújo, A.F.O., Ribeiro-Paes, J.T., Deus, J.T., Cavalcanti, S.C.H., Nunes, R.S., Alves, P.B., Macoris, M.L.G. (2016). Larvicidal activity of *Syzygium aromaticum* (L.) Merr and *Citrus sinensis* (L.) Osbeck essential oil and their antagonistic effects with temephos in resistant populations of *Aedes aegypti*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, *111*, 443-449.
- Arruda, D.C., Miguel, D.C., Yokoyama-Yasunaka, J.K.U., Katzin, A.M., Uliana, S.R.B. (2009). Inhibitory activity of limonene against *Leishmania* parasites *in vitro* and *in vivo*. *Biomed. Pharmacother.*, *63*, 643-649.
- Bozkurt, T., Gulnaz, O., Kaçar, Y.A. (2017). Chemical composition of the essential oils from some citrus species and evaluation of the antimicrobial activity. *IOSR-JESTFT*, *11*, 29-33.
- Brady, O.J., Gething, P.W., Bhatt, S., Messina, J.P., Brownstein, J.S., Hoen, A.G., Moyes, C.L., Farlow, A.W., Scott, T.W., Hay, S.I. (2012). Refining the global spatial limits of dengue virus transmission by evidence-based consensus. *PLOS Negl. Trop. Dis.*, *6*, e1760.
- Moreira, R.R.D., Santos, A.G., Carvalho, F.A., Perego, C.H., Crevelin, E.J., Crotti, A.E.M., Cogo, J., Cardoso, M.L.C., Nakamura, C.V. (2019). Antileishmanial activity of *Melampodium divaricatum* and *Casearia sylvestris* essential oils on *Leishmania amazonensis*. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, *61*, e33.
- Dias, C.N., Moraes, D.F.C. (2014). Essential oils and their compounds as *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae) larvicides: review. *Parasitol. Res.*, *113*, 565-592.

- Dosoky, N.S., Setzer, W.N. (2018). Biological activities and safety of *Citrus* spp. Essential oils. *Int. J. Mol. Sci.*, 19, 1966.
- Espina, L., Somolinos, M., Lorán, S., Conchello, P., García, D., Pagán, R. (2011). Chemical composition of commercial citrus fruit essential oils and evaluation of their antimicrobial activity acting alone or in combined process. *Food Control*, 22, 896-902.
- Estevam, E.B.B., Miranda, M.L.D., Alves, J.M., Egea, M.B., Pereira, P.S., Martins, C.H.G., Esperandim, V.R., Magalhães, L.G., Bolela, A.C., Cazal, C.M., Souza, A.F., Alves, C.C.F. (2016). Composição química e atividades biológicas dos óleos essenciais das folhas frescas de *Citrus limonia* Osbeck e *Citrus latifolia* Tanaka (Rutaceae). *Rev. Virtual Quim.*, 8, 1842-1854.
- Gomes, P.R.B., Oliveira, M.B., Sousa, D.A., Silva, J.C., Fernandes, R.P., Louzeiro, H.C., Oliveira, R.W.S., Paula, M.L., Filho, V.E.M., Fontenele, M.A. (2019). Larvicidal activity, molluscicide and toxicity of the essential oil of *Citrus limon* peels against, respectively, *Aedes aegypti*, *Biomphalaria glabrata* and *Artemia salina*. *Eclética Quim. J.*, 44, 85-95.
- González-Mas, M.C., Rambla, J.L., López-Gresa, M.P., Blázquez, M.A., Granell, A. (2019). Volatile compounds in *Citrus* essential oils: a comprehensive review. *Front. Plant Sci.*, 10, 12.
- Hamdan, D.I., Mohamed, M.E., El-Shazly, A.M. (2016). *Citrus reticulata* Blanco cv. Santra leaf and fruit peel: a common waste products, volatile oils composition and biological activities. *J. Med. Plants Res.*, 10, 457-467.
- Martins, M.H.G., Fracarolli, L., Vieira, T.M., Dias, H.J., Cruz, M.G., Deus, C.C.H., Nicoletta, H.D., Stefani, R., Rodrigues, V., Tavares, D.C., Magalhães, L.G., Crotti, A.E.M. (2017). Schistosomicidal effects of the essential oils of *Citrus limonia* and *Citrus reticulata* against *Schistosoma mansoni*. *Chem. Biodivers.*, 14, e1600194.
- Monzote, L., Herrera, I., Satyal, P., Setzer, W.N. (2019). In-vitro evaluation of 52 commercially-available essential oils against *Leishmania amazonensis*. *Molecules*, 24, 1248.
- Neves, I.A., Rezende, S.R.F., Kirk, J.M., Pontes, E.G., de Carvalho, M.G. (2017). Composition and larvicidal activity of essential oil of *Eugenia candolleana* DC. (Myrtaceae) against *Aedes aegypti*. *Rev. Virtual Quim.*, 9, 2305-2315.

- Sarma, R., Khanikor, B., Mahanta, S. (2017). Essential oil from *Citrus grandis* (Sapindales: Rutaceae) as insecticide against *Aedes aegypti* (L) (Diptera: Culicidae). *Int. J. Mosquito Res.*, 4, 88-92.
- Sarma, R., Adhikari, K., Mahanta, S., Khanikor, B. (2019). Insecticidal activities of *Citrus aurantifolia* essential oil against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Toxicol. Rep.*, 6, 1091-1096.
- Silva, F.F.A., Fernandes, C.C., Oliveira, G.A., Candido, A.C.B.B., Magalhães, L.G., Vieira, T.M., Crotti, A.E.M., Silva, C.A., Miranda, M.L.D. (2020). *In vitro* antileishmanial and antioxidant activities of essential oils from different parts of *Murraya paniculata* (L.) Jack: a species of Rutaceae that occur in the Cerrado bioma in Brazil. *Aust. J. Crop Sci.*, 14, 347-353.
- Soonwera, M. (2015). Efficacy of essential oils from *Citrus* plantas against mosquito vectors *Aedes aegypti* (Linn.) and *Culex quinquefasciatus* (Say). *Int. J. Agric. Technol.*, 11, 669-681.
- Wankupar, W., Srinivasan, S., Rathinasamy, S. (2015). HPTLC analysis of *Scoparia dulcis* Linn (Scrophulariaceae) and its larvicidal potential against dengue vector *Aedes aegypti*. *Nat. Prod. Res.*, 29, 1757-1760.

MATERIAL SUPLEMENTAR

3.4 Sessão Experimental

3.4.1 Material da planta

Os frutos maduros foram adquiridos em supermercados locais da cidade de Rio Verde – GO.

3.4.2 Extração de óleo essencial

O óleo essencial (OE) foi extraído da casca do fruto de *C. reticulata* (OE-CR) por hidrodestilação por 1 h em aparelho do tipo Clevenger. A hidrodestilação foi realizada em triplicata. Para tanto, a casca da fruta foi dividida em três amostras de 300 g e 500 mL de água destilada foram adicionados a cada amostra. O conteúdo foi então transferido para um balão de 3 L e iniciado o processo de extração. Após decorrido o tempo de extração o hidrodestilado foi então levado para a realização da separação do OE e água utilizando diclorometano. Após a separação do OE, os

vestígios de água remanescentes foram removidos com sulfato de sódio anidro, seguido de filtração. Os OE foram armazenados em frasco âmbar e mantidos em geladeira a 4°C até a análise.

3.4.3 Identificação química do óleo de casca de fruta de *C. reticulata* (CR-OE)

CR-OE foi dissolvido em éter etílico e analisado por cromatografia gasosa-detector de ionização de chama (CG-FID) e cromatografia gasosa-espectrometria de massa (GC-MS) usando os sistemas Shimadzu QP5000 Plus e GCMS2010 Plus (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão). A temperatura da coluna no GC-FID foi programada para aumentar de 60 a 240°C a 3°C / min e foi mantida a 240°C por 5 min; o gás transportador era H₂ a uma taxa de fluxo de 1,0 mL / min. O equipamento foi configurado para operar no modo de injeção; o volume de injeção foi de 0,1 µL (proporção de divisão de 1:10) e as temperaturas do injetor e do detector foram de 240 e 280°C, respectivamente. As concentrações relativas dos componentes foram obtidas normalizando as áreas dos picos (%). As áreas relativas consistiram na média de análises de GC-FID em triplicata. As condições de CG-EM e a identificação de óleos essenciais foram realizadas seguindo a metodologia proposta por Lemes et al., (2018). A identificação dos componentes voláteis do óleo essencial de *C. reticulata* (Tabela 2) foi baseada em seus índices de retenção em uma coluna capilar Rtx-5MS (30 m X 0,25 mm; 0,250 µm) nas mesmas condições operacionais usadas para GC em relação a uma série homóloga de n-alcenos (C8-C20). As estruturas foram combinadas por computador com Wiley 7, NIST 08 e FFNSC 1.2, e seus padrões de fragmentação foram comparados com dados da literatura (Adams, 2007).

3.4.4 Ensaio larvicida

Larvas de *A. aegypti* foram obtidas no Laboratório de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás, UFG, Brasil. O ensaio larvicida foi realizado de acordo com um método previamente relatado (Mesquita et al., 2018), da seguinte forma: as larvas foram mantidas em bandejas de plástico sob temperatura controlada (26 ± 2°C) e umidade (70-80%) até atingirem o terceiro estágio final do instar. Além disso, 10 larvas foram transferidas para copos plásticos com capacidade de 50 mL, cada um contendo 10 mL de água mineral e ração para peixes triturada (TetraMin Tropical Flakes), seguida da adição de 100 µL de solução de OE-CR em dimetilsulfóxido (DMSO) (25-500 µg / mL). Após 24 horas, o número de larvas

mortas foi contado e a porcentagem letal calculada. Todos os experimentos foram realizados em quintuplicata, incluindo um tratamento de controle negativo com DMSO, água mineral, larvas e ração para peixes moída. As atividades larvicidas foram relatadas como concentração letal a 50% (CL50), representando a concentração em microgramas por mililitro que causou 50% da mortalidade larval, dentro de um intervalo de confiança de 95%. Os dados de mortalidade foram avaliados por análise probit (Finney, 1971). Os dados de mortalidade foram tratados pelo *software* Polo plus® (Robertson et al., 2003) com intervalo de confiança de 95% e valores de $P < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

3.4.5 Ensaio antileishmanicida

Para avaliar a atividade antileishmanicida, as formas promastigotas de *L. amazonensis* (MHOM / BR / PH8) foram mantidas em meio de cultura RPMI 1640 (Gibco) suplementado com 10% de soro fetal bovino, penicilina (100 UI / mL) e estreptomicina (100 µg / mL). Posteriormente, a cerca de 1×10^6 parasitas foram distribuídos em placas de 96 poços e o OE-CR previamente dissolvido em dimetilsulfóxido 100% (DMSO, solução estoque 100 mM) (Synth) foram adicionados em concentrações de 6,25 a 100 µg / mL ao culturas. Anfotericina B (Sigma Aldrich, pureza de 97%) em concentrações variando de 0,011 a 0,19 µg / mL foi adicionada às culturas e usada como controle positivo. As culturas foram incubadas em incubadora BOD (Quimis) a 25°C por 24 h, e a atividade antileishmania foi determinada verificando se o crescimento das formas promastigotas foi inibido, conforme revelado pela contagem do número total de promastigotas vivos no Câmara de Neubauer (Global Glass - Porto Alegre, BR) com base na motilidade flagelar. Foi usado meio RPMI 1640 (Gibco) contendo 0,1% de DMSO (Synth) (concentração mais alta). Os resultados foram expressos como a média da porcentagem de inibição do crescimento em relação ao controle negativo (0,1% DMSO).

Referências

- Adams, R.P. (2007), Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. Carol Stream, Illinois, USA: Allured Publishing Corporation.
- Finney DJ. 1971. Probit analysis. Cambridge University Press Cambridge. England.

- Lemes, R.S., Alves, C.C.F., Estevam, E.B.B., Santiago, M.B., Martins, C.H.G., Santos, T.C.L., Crotti, A.E.M., Miranda, M.L.D. (2018). Chemical composition and antibacterial activity of essential oils from *Citrus aurantifolia* leaves and fruit peel against oral pathogenic bacteria. *An Acad Bras Ciênc.*, 90, 1285-1292.
- Mesquita RS, Tadei WP, Bastos AMB. 2018. Determination of the larvicidal activity of benzoyl thiosemicarbazone and its Ni(II) complex against *Aedes aegypti* and *Anopheles darlingi* larvae in Amazonas, Brazil. *Journal of Entomology and Nematology*. 10: 37-42.
- Robertson JL, Preisler HK, Russell RM. 2003. Poloplus probit and logit analysis. Leora Software 1-36.

Tabela 1. Composição química do óleo essencial da casca da fruta da *Citrus reticulata* (CR-OE).

TR_{min}	Compostos	RI_{exp}	RI_{lit}	%RA
6,28	α -Tujeno	852	851	0,2
9,09	α -Pineno	935	934	0,6
10,78	Sabineno	975	974	0,5
11,57	Mirceno	993	991	2,1
13,82	Limoneno	1039	1039	85,7
14,32	<i>Trans</i> - β -ocimeno	1051	1050	0,7
14,81	γ -terpineno	1062	1062	6,7
18,59	Óxido de Limoneno	1132	1133	0,5
19,31	Citronelal	1158	1158	0,1
21,13	α -Terpineol	1184	1185	0,1
24,12	Geraniol	1254	1255	0,1
24,86	Geranial	1271	1270	0,2
37,92	Óxido de Cariofileno	1581	1581	0,3
Total				97,8
Concentrações ($\mu\text{g/mL}$) \pm Desvio Padrão				

TR_{min}: tempo de retenção; **RI_{exp}**: Índice de retenção relativo para *n*-alcanos (C₈–C₂₀) na coluna Rtx-5MS; **RI_{lit}**: Índice de retenção de Kovats (valores da literatura).

Tabela 2. Atividade Antileishmanicida do óleo essencial da casca da fruta do *Citrus Reticulata* (CR-OE).

*Controle Positivo: Anfotericina B 1µg/mL; Controle Negativo: Medip RPMI + 0.1% DMSO

	100	50	25	12.5	6.25	IC₅₀ (µg/mL)
OE-CR	100±0,00	100±0,00	64,86±5,98	58,14±7,69	47,92±4,86	8,23±1,10
	0,19	0,095	0,047	0,023	0,011	
Amph. B*	44,38±0,53	36,89±0,79	33,61±0,62	29,02±1,85	23,50±1,58	0,25±0,39

4. CAPÍTULO II

Atividade antifúngica *in vitro* do óleo essencial da casca de *Citrus Reticulata* sobre o crescimento do fungo *Sclerotinia sclerotiorum*

RESUMO

Os óleos essenciais estão presentes nas plantas como produtos naturais sendo constituídos por compostos orgânicos voláteis. As propriedades destes compostos voláteis vêm sendo estudadas e exploradas nestes últimos anos descobrindo suas atividades como antifúngica, antimicrobiana e antiparasitária. O patógeno *Sclerotinia sclerotiorum* têm sido grande causador de perdas de colheitas e armazenamentos de diversos alimentos. Este estudo visou a avaliação do efeito do óleo essencial da casca da fruta *Citrus Reticulata* (*Rutaceae*) (OE-CR) contra o crescimento micelial do *Sclerotinia sclerotiorum*, que atinge várias espécies e subespécies de plantas. O óleo essencial da *Citrus Reticulata* foi obtido por hidrodestilação por aparelho Clevenger e a atividade antifúngica *in vitro* mostrou que OE-CR na dose de 300 µL inibiu 97% do crescimento do fungo *Sclerotinia sclerotiorum*. Os resultados obtidos mostraram que o OE-CR possui grande potencial de inibição para este patógeno.

Palavras-Chave: *Sclerotinia sclerptiorum*, Patógeno, Rutaceae,

4.1 Introdução

S. sclerotiorum é um patógeno altamente prejudicial com diversos modos de infecção. Ele ataca as plantas hospedeiras por meio de ascósporos que podem ser descarregados à força para cima da apotécia para o ar, ou pelo micélio decorrentes de tecido infectado ou de escleródios germinados. Quando ascósporos pousam em tecidos suscetíveis do hospedeiro, eles podem germinar em condições favoráveis e

iniciar um novo ciclo de infecção (Xia, et al., 2020). Assim, o fungo pode permanecer viável no solo sob condições adversas por até 10 anos por causa da formação de escleródios que são estruturas de resistência (Krause-Sakate et al., 2016; Choi et al., 2017). Diversos estudos vêm sendo realizados com a intenção de descobrir meios de combater o crescimento micelial do fungo. Para o tratamento do fungo, várias estratégias têm sido aplicadas contra os patógenos transmitidos pelo solo para reduzir a sobrevivência das estruturas fúngicas em repouso, como escleródios. Uma alternativa, quando viável, é o uso do método da solarização. Essa metodologia consiste na eliminação do escleródio através do calor, tornando-os inviáveis, este método é mais eficiente quando os escleródios estão na camada superficial do solo. Sprays fungicidas podem prevenir a infecção por ascósporos; no entanto, pela dificuldade do spray em alcançar a penetração necessária para atingir a cultura, a doença ainda pode ocorrer (S. Soyly, H. Yigitbas, 2007).

O gênero *Citrus* da família Rutaceae inclui a cerca de 17 espécies distribuídas pelas regiões tropicais e temperadas (Chutia et al., 2008). Elas são as frutas mais produzidas e consumidas no mundo. O Brasil ocupa primeiro lugar na produção mundial e na exportação de suco de laranja, sendo o Estado do Rio Grande do Sul um importante produtor. Ao longo do cultivo e do processamento dos citros, são geradas toneladas de resíduos de baixo valor comercial, mas com grande potencial de aproveitamento dentro da indústria de alimentos (Gerhardt & Carin, 2012).

O processamento de frutas engloba a produção de suco integral e concentrado, frutas congeladas e polpas, geleias e xaropes, frutas desidratadas, entre outros produtos. Grande quantidade de resíduos é gerada durante o processamento, e representa alto custos com destinação adequada, como transporte e tratamentos aplicados para reduzir os danos ao ambiente. No entanto, este cenário foi alterado pela

inclusão de processos que utilizam esses resíduos como matéria-prima para a obtenção de novos produtos. Antes, os resíduos de processamento de frutas representam quantidade relevante significando riscos ambientais graves, mas também representam perda expressiva de nutrientes com alto valor biológico (Okino-Delgado, Prado & Fleuri, 2018)

Óleos essenciais de plantas aromáticas e medicinais geralmente exibem uma gama diversificada de atividades biológicas, pois possuem vários constituintes ativos que atuam por meio de vários mecanismos de ação. Os óleos essenciais das cascas de Citrus têm uma variedade impressionante de usos em alimentos, medicamentos entre várias outras aplicações (Dias, et al., 2020). Por isso, o interesse em extratos de plantas e principalmente óleos essenciais como potenciais agentes antimicrobianos para o uso na preservação de alimentos, proteção de cultivos e aplicações farmacológicas aumentou durante a última década. Deste modo, o desenvolvimento deste trabalho visou a análise da aplicação do OE da casca da fruta *Citrus reticulata* através de dois métodos diferentes para a inibição do crescimento micelial do fungo *Sclerotinia sclerotiorum*.

4.2 Material e método

4.2.1 Material da planta

Os frutos maduros foram adquiridos nos mercados locais da cidade de Rio Verde – GO.

4.2.2 Extração do óleo essencial

O óleo essencial (OE) foi extraído da casca do fruto de *C. reticulata* (CR-OE) por hidrodestilação por 1 h em aparelho do tipo Clevenger. A hidrodestilação foi realizada em triplicata. Para tanto, a casca da fruta foi dividida em três amostras de

300 g e 500 mL de água destilada foram adicionados a cada amostra da casca. Após a coleta manual do OE, os vestígios de água remanescentes foram removidos com sulfato de sódio anidro, seguido de filtração. O cálculo do rendimento OE foi baseado no peso da casca expresso como média da análise em triplicatas. Os OE's foram armazenados em frasco âmbar e mantidos em geladeira a 4°C até a utilização. A composição química do óleo essencial foi realizada no trabalho anterior.

4.3 Atividade antifúngica *in vitro* pelo método de difusão em disco

Os ensaios foram realizados no Laboratório de Microbiologia do IF Goiano – Campus Rio Verde. Para a análise da atividade antifúngica do OE-CR foi utilizado o método de difusão em disco descrito por Xavier et al. (2016), com modificações, e o teste foi realizado com quatro repetições de OE-CR puro com as doses de 50 µL, 100 µL, 150 µL, 200 µL e 300 µL. Após a solidificação do meio BDA os óleos essenciais foram adicionados e homogeneizados na superfície do meio com o auxílio de uma espátula Drigalski. Posteriormente, discos de meio BDA de 5 mm de diâmetro com micélios de 10 dias de idade do fungo *Sclerotinia sclerotiorum* foram colocados no centro das placas contendo o OE disperso e também as placas de controle sem OE. O crescimento micelial foi medido diariamente, até que o fungo crescesse totalmente nas placas de controle. O tratamento foi realizado em quadruplicata e o delineamento experimental inteiramente ao acaso. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias dos tratamentos avaliadas pelo teste de Tukey com nível de significância de 5% pelo *software* R.

A porcentagem de inibição do crescimento micelial (ICM) foi calculada pela seguinte fórmula

$$ICM (\%) = \frac{(\text{crescimento do controle} - \text{crescimento do tratamento})}{\text{crescimento do controle}} \times 100$$

4.4 Atividade antifúngica *in vitro* pelo método de difusão em disco por evaporação do OE

Neste procedimento foram dispersas em papel de filtro o OE-CR que foi colocado na tampa da placa de petri deixando a mesma virada para baixo com o ágar solidificado e previamente inoculado na parte de cima da placa. O teste foi realizado com quatro repetições para os volumes de 50 µL, 100 µL, 150 µL, 200 µL e 300 µL de OE-CR. O método consiste na dispersão do OE via volatilização no ambiente para a atividade microbicida. Tendo em vista a volatilidade apresentada pelos constituintes dos óleos essenciais, este método pode ser utilizado para avaliar o efeito dos vapores do óleo essencial sobre o crescimento e/ou inibição de microrganismos.

4.5 Resultados e discussão

Patógenos de plantas que causam doenças são responsáveis por grandes danos de rendimento em muitos cultivos economicamente importantes. O uso de agroquímicos na fumigação do solo, aplicação foliar ou tratamento de sementes é a estratégia mais comum para gerenciamento de doenças de plantas, entretanto, por causa dos efeitos adversos de pesticidas na saúde humana e no meio ambiente, os consumidores estão cada vez mais exigindo produtos que sejam livres de resíduos químicos tóxicos (Sharma, et al., 2019).

Portanto, a atividade antifúngica *in vitro* do óleo essencial da casca de *Citrus Reticulata*, foi avaliada contra o fungo fitopatogênico *Sclerotinia sclerotiorum*. OE-CR inibiu o crescimento micelial de *S. sclerotiorum* através de doses do óleo puro. As percentagens de inibição do crescimento micelial (ICM) do óleo essencial da casca de *Citrus Reticulata* através do método de difusão e evaporação do OE, são mostradas na figura 1 e figura 2 respectivamente.

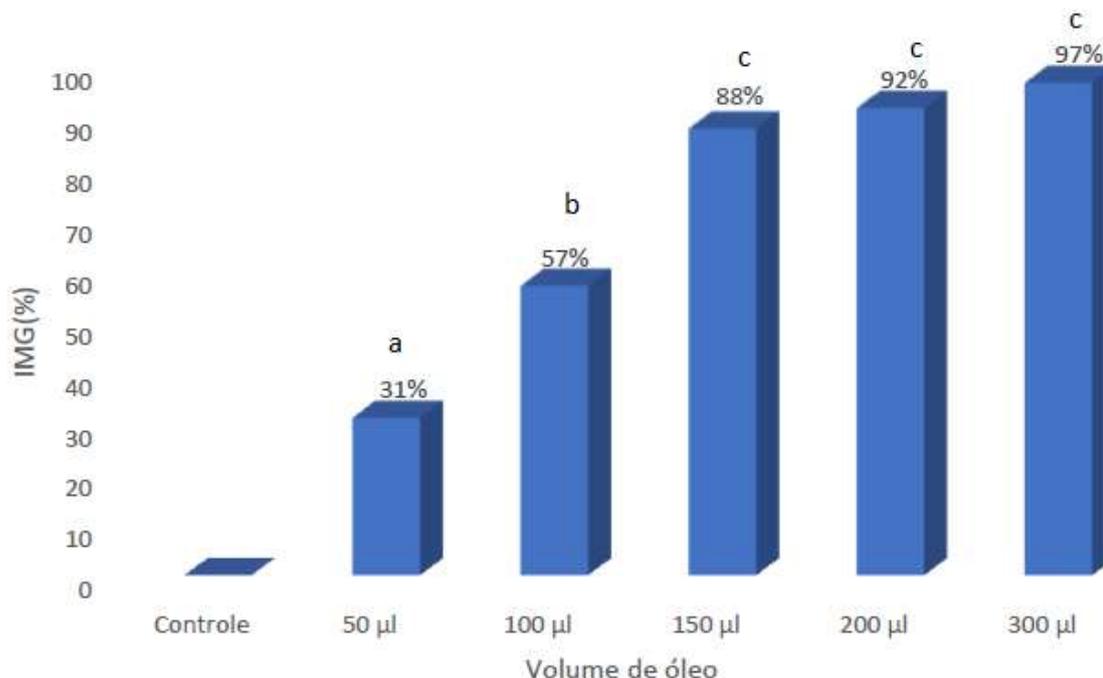


Figura 2 – Percentual de inibição do crescimento micelial (IMG) de *Sclerotinia sclerotiorum* de diferentes doses do óleo essencial da casca de *Citrus Reticulata* (OE-CR) através do método de difusão em disco. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey.

Óleos essenciais e seus componentes estão ganhando interesse crescente como recurso natural alternativo às drogas sintéticas, particularmente contra agentes microbianos por causa do seu status relativamente seguro e ampla aceitação pelos consumidores e sua exploração para uso por seu potencial multifuncional (Zarai et al., 2011).

Extratos de espécies cítricas são fontes bem conhecidas de compostos biofuncionais com efeitos de promoção da saúde. Em particular, os óleos essenciais são conhecidos por sua atividade antibacteriana pelo alto teor de terpenos (Usach et al, 2020).

Numerosos óleos essenciais foram testados para atividade *in vivo* e atividade antimicótica *in vitro* e alguns demonstraram possuir potenciais agentes antifúngicos. Seu mecanismo de ação parece estar predominantemente na membrana da célula

fúngica, interrompendo sua estrutura causando vazamento e morte celular; bloqueando o síntese de membrana; inibição da germinação de esporos, proliferação de fungos e respiração celular (Silva, et al., 2012).

Os resultados das análises de inibição do crescimento micelial demonstraram atividade antifúngica *in vitro* promissora para o OE-CR extraído da casca da fruta. Os resultados demonstraram que em 150, 200, 300 μL obteve 88%, 92% e 97% de inibição, respectivamente. Comprovando assim, que a partir do volume de 100 μL de OE-CR apresenta alta toxicidade para o patógeno *S. sclerotiorum*.

A atividade antifúngica *in vitro* contra o patógeno *S. sclerotiorum* também foi realizada através do método de difusão em disco por fumigação. Os resultados estão demonstrados abaixo na Figura 3.

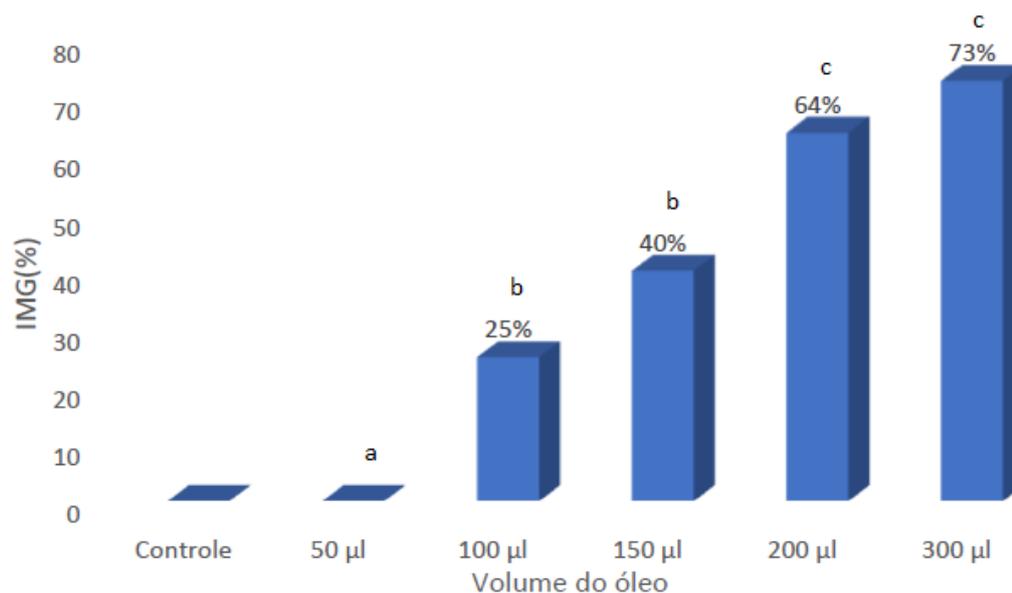


Figura 3 – Percentual de inibição do crescimento micelial (IMG) de *Sclerotinia sclerotiorum* de diferentes doses do óleo essencial da casca de *Citrus Reticulata* (CR-EO) através do método de difusão em disco por evaporação. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey.

Pesquisas visando o controle alternativo, através do emprego de óleos essenciais e extratos vegetais têm aumentado consideravelmente nos últimos anos e revelado seu potencial, pois, algumas plantas apresentam diversas substâncias em sua composição química, muitas delas com potencial fungicida, as quais devem ser estudadas para utilização direta do produtor rural, bem como para servir de matéria-prima para formulação de novos produtos (Kreyci et al., 2018). Em estudo Chee & Lee (2009) verificou a atividade antifúngica do limoneno que é o componente majoritário do OE-CR. Como está apresentado na tabela abaixo:

Tabela 2. Composição química do óleo essencial da casca da fruta da *Citrus reticulata* (CR-OE).

RT_{min}	Compostos	RI_{exp}	RI_{lit}	%RA
6.28	α -Tujeno	852	851	0.2
9.09	α -Pino	935	934	0.6
10.78	Sabineno	975	974	0.5
11.57	Mirceno	993	991	2.1
13.82	Limoneno	1039	1039	85.7
14.32	<i>Trans</i> - β -ocimeno	1051	1050	0.7
14.81	γ -terpineno	1062	1062	6.7
18.59	Óxido de Limoneno	1132	1133	0.5
19.31	Citronelal	1158	1158	0.1
21.13	α -Terpineol	1184	1185	0.1
24.12	Geraniol	1254	1255	0.1
24.86	Geranial	1271	1270	0.2
37.92	Óxido de Cariofileno	1581	1581	0.3
Total				97.8

RT_{min}: tempo de retenção; **RI_{exp}**: Índice de retenção relative para *n*-alcanos (C₈–C₂₀) na coluna Rtx-5MS; **RI_{lit}**: Índice de retenção de Kovats (valores da literatura)

Concentrações ($\mu\text{g/mL}$) \pm Desvio Padrão

Potenciais antifúngicos de diversos tipos de óleos essenciais vêm sendo analisados por diversos pesquisadores, pois, os compostos naturais das plantas também são opção para o tratamento de diversos patógenos e podem ser uma opção

mais segura, do que produtos químicos sintéticos. Com estes resultados pode-se observar que há atividade antifúngica em ambos os métodos, porém, o método de difusão em disco que tem o contato direto do óleo com o patógeno, demonstrou ser mais eficaz.

Não está claro, exatamente como os compostos voláteis estão inibindo o crescimento de fungos, mas, alguns estudos sugerem que pelo alto índice de natureza lipofílica do micélio junto com grande área de superfície em relação ao volume de um fungo, vapores de óleos essenciais podem atuar principalmente por acúmulo no micélio (Massoud, et al., 2012).

A utilização do método de evaporação de OEs para o controle de fitopatógenos é promissora, principalmente por poder ser aplicado nos grãos após a colheita, pois, estando armazenados em um local fechado, pode-se realizar a volatilização do OE por todo o ambiente aumentando então as chances de contato do OE com o fitopatógeno, porém, pelos OEs serem compostos voláteis, fotossensíveis e termossensíveis tornando um desafio esta aplicação. Assim, novos métodos vêm sendo estudados com o intuito de encontrar maneiras de liberar o OE no ambiente de maneira controlada e mantê-lo por mais tempo sem o perigo de degradação. Recentemente, nanopartículas poliméricas (NP) foram desenvolvidas para encapsulação do OE, protegendo-as com boa estabilidade, entrega controlada, biodisponibilidade e eficácia aprimorada.

Óleos essenciais ou extratos de diversas espécies foram avaliadas tendo seu efeito comprovado contra fitopatógenos, como o *E. Staigiriana* (Correa, et al., 2019), *A. cacans*, *A. coriacea*, *A. crassiflora*, *A. sylvatica* e *A. dioica* (Zanella et al., 2015), *Citrus reticulata*, *Citrus sinensis* e *Citrus deliciosa* (Dias et al., 2019), demonstrando assim a eficiência da utilização de OE e extratos como alternativa aos fungicidas de origem química. O forte efeito inibitório sobre a pectina metil-esterase e celulase, que

são enzimas que fazem parte do mecanismo de patogenicidade de alguns microrganismos, indicaram que essas duas enzimas são alvos para monoterpenos (Gehan, Rasoul & Abdelgaleil, 2012).

4.6 Conclusões

Com este estudo foi concluído que o OE-CR apresentou atividade antifúngica *in vitro* contra o fungo *S. sclerotiorum* bastante satisfatória para o método de difusão em disco. Os resultados demonstraram que OE-CR possui grande potencial de inibição para ser usado contra o patógeno, e por ser agente de origem natural se torna ótima opção para uso substituindo os antifúngicos de origem química sintética.

Agradecimentos

O autor é grato à FAPEG, CNPq, CAPES e ao IF GOIANO, pelo suporte financeiro.

Referências

BUCKER, S, M., WILLIAM & WANDERSON, BUCKER & GUILHERME, DE & KHÉTRIN, SILVA & PAULA, APARECIDA & ADESIO, FERREIRA & RODRIGO, SOBREIRA & JOSE, CARLOS. (2018). Cinnamon and citronella essential oils in the *in vitro* control of the fungi *Aspergillus* sp. and *Sclerotinia*

- sclerotiorum. African Journal of Agricultural Research. 13. 1811-1815.
10.5897/AJAR2018.13074.
- CHEE, HEE & KIM, HOON & LEE, Min. (2009). In vitro Antifungal Activity of Limonene against *Trichophyton rubrum*. Mycobiology. 37. 243-6.
10.4489/MYCO.2009.37.3.243.
- CHUTIA, M., BHUYAN, P. D., PATHAK, M. G., SARMA, T. C., & BORUAH, P. (2009). Antifungal activity and chemical composition of Citrus reticulata Blanco essential oil against phytopathogens from North East India. LWT – Food Science and Technology, 42, 777–780.
- CORREA, Marcos Saldanha et al . Antimicrobial and antibiofilm activity of the essential oil from dried leaves of Eucalyptus staigeriana. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo , v. 86, e0202018, 2019 .
- DIAS, A. L. B. ET AL . Chemical composition and in vitro inhibitory effects of essential oils from fruit peel of three Citrus species and limonene on mycelial growth of *Sclerotinia sclerotiorum*. Braz. J. Biol., São Carlos , v. 80, n. 2, p. 460-464, June 2020.
- GERHARDT, CARIN ET AL . Aproveitamento da casca de citros na perspectiva de alimentos: prospecção da atividade antibacteriana. Braz. J. Food Technol., Campinas , v. 15, n. spe, p. 11-17, May 2012 .
- GEHAN I.KH. MAREI, MONA A. ABDEL RASOUL, SAMIR A.M. ABDELGALEIL, Comparative antifungal activities and biochemical effects of monoterpenes on plant pathogenic fungi, Pesticide Biochemistry and Physiology, Volume 103, Issue 1, 2012, Pages 56-61, ISSN 0048-3575.
- HCC YOUN CHEE, HOON MM & MIN HEE LEE. In vitro Antifungal Activity of Limonene against *Trichophyton rubrum*, Mycobiology, 2009.

- KRAUSE-SAKATE, R.; PAVAN, M.A.; MOURA, M.F.; KUROZAWA, C. doenças da alface. l. e. a. Manual de fitopatologia: doenças de plantas cultivadas. 5ª ed. Ouro Fino-MG: Agrônoma Ceres. 2016. v. 2. p.33-40.
- KREYCI, P. F. GLÓRIA, E. M.. IKEDA, N. Y. Atividade de óleos essenciais na inibição do crescimento micelial in vitro de sclerotinia sclerotiorum, ISSN: 198M729, 2018.
- KARIM HOSNI, NESRINE ZAHED, RAOUF CHRIF, INES ABID, WAFAMEDFEI, MONEM KALLEL, NADIA BEN BRAHIM, HOUCINE SEBEL, Composition of peel essential oils from four selected Tunisian Citrus species: Evidence for the genotypic influence, Food Chemistry, Volume 123, Issue 4, 2010, Pages 1098-1104, ISSN 0308-8146.
- MASSOUD, MAGDY & SAAD, ABDELFATTAH & SOLIMAN, EMAD & ELMOGHAZY, AHMED. (2012). Antifungal activity of some essential oils applied as fumigants against two stored grains fungi. J. Adv. Agric. Res. (Fac. Ag. Saba Basha). 17. 296-306.
- OKINO-DELGADO, CLARISSA H.; PRADO, DÉBORA Z.; FLEURI, LUCIANA f.. Brazilian fruit processing, wastes as a source of lipase and other biotechnological products: a review. An. Acad. Bras. Ciênc., Rio de Janeiro , v. 90, n. 3, p. 2927-2943, Sept. 2018.
- SILVA, Cristiane de Bona da et al . Antifungal activity of the lemongrass oil and citral against Candida spp. **Braz J Infect Dis**, Salvador , v. 12, n. 1, p. 63-66, Feb. 2012.
- SHARMA, A. et al . Responses of Plants to Pesticide Toxicity: an Overview. **Plantadainha**, Viçosa , v. 37, e019184291, 2019 .

- SOYLU S, YIGITBAS H, SOYLU EM, KURT S. Antifungal effects of essential oils from oregano and fennel on *Sclerotinia sclerotiorum*. *J Appl Microbiol*. 2007 Oct;103(4):1021-30. doi: 10.1111/j.1365-2672.2007.03310.x. PMID: 17897206.
- USACH, I.; MARGARUCCI, E.; MANCA, M.; CADDEO, C.; AROFFU, M.; PETRETTO, G.; MANCONI, M.; PERIS, J. Comparison between Citral and Pompia Essential Oil Loaded in Phospholipid Vesicles for the Treatment of Skin and Mucosal Infections. *Nanomaterials* 2020, 10(2), 286; <https://doi.org/10.3390/nano10020286>.
- 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. (2016). Composição química do óleo essencial de *Cardiopetalum calophyllum* Schlttdl. (Annonaceae) e suas atividades antioxidante, antibacteriana e antifúngica. *Revista Virtual de Química*, 8(5), 1433-1448.
- XIA, S.; XU, Y.; HOY, R.; ZHANG, J.; QIN, L.; LI, X. The Notorious Soilborne Pathogenic Fungus *Sclerotinia sclerotiorum*: An Update on Genes Studied with Mutant Analysis. *Pathogens* 2020, 9, 27.
- ZARAI, Z., KADRI, A., BEN CHOBBA, I. *et al.* The *in-vitro* evaluation of antibacterial, antifungal and cytotoxic properties of *Marrubium vulgare* L. essential oil grown in Tunisia. *Lipids Health Dis* **10**, 161 (2011). <https://doi.org/10.1186/1476-511X-10-161>.
- ZANELLA, Cláudia de Souza et al . Atividade de óleos e extratos vegetais sobre germinação carpogênica e crescimento micelial de *Sclerotinia sclerotiorum*. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo , v. 82, 00201, 2015 .

5 CONCLUSÕES GERAIS

De acordo com os resultados obtidos concluiu-se que:

- Os compostos majoritários presentes no OE-CR foram: Limoneno (85,7%), γ -terpineno (6,7%) e mirceno (2,1%);
- O OE-CR na atividade larvicida com as doses de 12,5, 25, 50 e 100 $\mu\text{g} / \text{mL}$ resultaram em 10,2, 25,1, 51,7 e 85,3% de larvas mortas, respectivamente, enquanto 150 $\mu\text{g} / \text{mL}$ garantiram 100% de mortalidade;
- Quanto a atividade leishmanicida o OE-CR se revelou bastante promissor contra as formas tripomastigosta de *L. amazonensis* ($\text{IC}_{50} = 8.23 \mu\text{g}/\text{mL}$).
- O OE-CR apresentou percentuais de inibição para o fungo *Sclerotinia Sclerotiorum* em ambos os métodos de difusão em disco e fumigação, porém, o método de difusão demonstrou maior inibição sendo de 88%, 92% e 97% para os volumes de OE de 150, 200, 300 μL , respectivamente.
- Têm-se perspectivas futuras da aplicação prática do OE-CR para a utilização *in vivo* contra fitopatógenos, utilizando-se de métodos que incorporem o OE e realizem sua liberação controlada no meio para então analisar sua eficácia.