



**MARCOS DE SOUZA GOMES**

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE  
ANTIFÚNGICA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE  
CINCO ESPÉCIES DO GÊNERO *CITRUS***

**LAVRAS – MG  
2011**

**MARCOS DE SOUZA GOMES**

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DOS  
ÓLEOS ESSENCIAIS DE CINCO ESPÉCIES DO GÊNERO *CITRUS***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, área de concentração em Agroquímica e Agrobioquímica, para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora  
Dra. Maria das Graças Cardoso

Coorientador  
Dr. Paulo Estevão de Souza

**LAVRAS – MG  
2011**

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da  
Biblioteca da UFLA**

Gomes, Marcos de Souza.

Caracterização química e atividade antifúngica dos óleos  
essenciais de cinco espécies do gênero *Citrus* / Marcos de Souza  
Gomes. – Lavras : UFLA, 2011.

98 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2011.

Orientador: Maria das Graças Cardoso.

Bibliografia.

1. Produtos naturais. 2. Fitopatógenos. 3. Análise multivariada.  
I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 547.71

**MARCOS DE SOUZA GOMES**

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DOS  
ÓLEOS ESSENCIAIS DE CINCO ESPÉCIES DO GÊNERO *CITRUS***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, área de concentração em Agroquímica e Agrobioquímica, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 25 de fevereiro de 2011.

Dra. Maria das Graças Cardoso            UFLA

Dr. Paulo Estevão de Souza            UFLA

Dr. Luiz Gustavo Guimarães            UFT

Dr. Maria das Graças Cardoso  
Orientadora

**LAVRAS – MG  
2011**

## **DEDICO E OFEREÇO**

*A Deus, que sempre esteve ao meu lado guiando-me e dando-me forças para seguir.*

*Aos meus pais, Luiz e Rosânia, que são meus exemplos de vida e educação.*

*Aos meus irmãos, Matheus, Júlia e Daniela, que sempre me deram força e incentivo nos momentos difíceis.*

*À Ana Clara, pelo amor, incentivo e compreensão.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus e a Nossa Senhora, por iluminarem meus passos.

À professora Dra. Maria da Graças Cardoso, a quem agradeço, em especial pela orientação, amizade, ensinamentos e confiança para execução do meu trabalho.

Ao professor Dr. Paulo Estevão de Souza, pela coorientação e disponibilidade.

À professora Dra. Samísia Maria Fernandes Machado (UFS), pelas análises cromatográficas dos óleos essenciais.

Aos professores do programa de pós-graduação em Agroquímica, pelos ensinamentos.

Aos meus colegas de mestrado, pela amizade e companheirismo.

Às funcionárias do Departamento de Fitopatologia, Eliane e Rute, que estavam sempre disponíveis para me ajudar.

Aos funcionários do Departamento de Química, por toda a atenção e auxílio prestados.

Aos funcionários do Departamento de Agricultura, especificamente do pomar, por cederem os frutos para a realização do nosso trabalho.

Aos meus colegas da Entomologia, Irene, Dejane e Michele, pelo apoio e amizade.

Aos meus colegas do Laboratório, Aline, Milene, Lidiany, Ana, João, Jean, Luiz Gustavo, Felipe, Raquel, Laís, Jorge Bispo, Cristiane e Cleusa, pela amizade e companheirismo. Em especial agradeço à Juliana, Wildão, Lucilene, Cíntia e Maria Luiza, pela amizade, dedicação e ajuda na condução dos experimentos.

Aos meus pais, Luiz e Rosânia, por todo amor e por me ensinarem a ser uma pessoa melhor a cada dia. Obrigado por sempre apoiarem-me em todos os meus sonhos. Vocês foram fundamentais nesta minha conquista.

Aos meus irmãos, Matheus, Júlia e Daniela, pelo amor, carinho, companheirismo e por estarem presentes em todos os momentos.

Ao meu amor, Ana Clara, pelo amor, carinho, paciência, companheirismo, sempre apoiando-me e ajudando-me nos momentos em que mais precisei.

Aos meus tios Generci e Bel pelo amor e carinho. Agradeço por todos os momentos em que vocês incentivaram-me e ajudaram-me, independentemente do meu propósito.

Aos meus avós, pelo amor e pelas orações. Essas são essenciais em minha vida.

Aos meus primos Gabriel, Gustavo, Letícia, Thiago e André, pela amizade e atenção.

À Carol e ao Gustavo, pela amizade. Ao Jaime, pela disponibilidade incondicional em me ajudar.

A todos meus familiares, pelo amor e carinho.

Aos meus amigos André, Diego, Luiz Fernando e Diogo, pela amizade e pelos momentos felizes.

Aos meus amigos de Ouro Preto, principalmente à República Tira Mágoa, que estará sempre em meu coração...Aqui...Aqui...Aqui...A gente...

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Química, que me permitiram realizar este trabalho.

E a todos que, de alguma forma, contribuíram para a conclusão deste trabalho.

## RESUMO GERAL

Os óleos essenciais do gênero *Citrus* estão entre os mais consumidos e comercializados no mundo, sendo o Brasil um dos principais produtores. No presente estudo, caracterizaram-se e quantificaram-se quimicamente os óleos essenciais das cascas de frutas de cinco espécies do gênero *Citrus*; laranja (*Citrus sinensis*), tangerina ponkan (*Citrus reticulata*), limão-rosa (*Citrus limonia*), limão-taiti (*Citrus aurantifolia*) e cidra (*Citrus medica*), bem como avaliou-se a atividade antifúngica deles sobre o desenvolvimento micelial dos fungos *Fusarium oxysporum*, *Alternaria alternata* e *Colletotrichum musae*. As concentrações testadas dos óleos essenciais foram (125, 250, 500, 1000 e 2000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). Fez-se uma análise exploratória dos dados (óleos essenciais e concentração dos constituintes químicos), utilizando Análise de Componentes Principais (PCA) e Análise de Agrupamentos Hierárquicos (HCA). Os resultados da identificação e quantificação química dos óleos essenciais por cromatografia em fase gasosa acoplada a um espectrômetro de massas (CG/EM) mostraram que os cinco óleos essenciais apresentam diversas substâncias em comum, com a predominância do limoneno como componente majoritário. Observou-se, por meio da análise multivariada, que os óleos essenciais foram divididos em três grupos. O primeiro (laranja e ponkan), o segundo (limão-rosa) e o terceiro (cidra e limão-taiti). Os óleos essenciais de cidra e de limão-taiti inibiram totalmente o crescimento micelial dos fungos *F. oxysporum* e *A. alternata* na concentração de 2000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Já para o fungo *C. musae* somente o óleo essencial de cidra, nessa mesma concentração, inibiu totalmente o crescimento micelial.

Palavras-chave: Gênero *Citrus*. Óleos essenciais. Atividade antifúngica. Análise multivariada.

## GENERAL ABSTRACT

Essential oils of the genus *Citrus* are among the most consumed and traded in the world, and Brazil is one of the major producers. In this study, the essential oils were characterized and quantified chemically from fruit peels of *Citrus* genus, orange (*Citrus sinensis*), tangerine ponkan (*Citrus reticulata*), lemon lime (*Citrus limonia*), lime (*Citrus aurantifolia*) and citron (*Citrus medica*). In addition, the antifungal activities of these oils were tested on the mycelial growth of *Fusarium oxysporum*, *Alternaria alternata* e *Colletotrichum musae* using different concentrations i.e., 125, 250, 500, 1000 and 2000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . The essential oils and their chemical components were analyzed using Principal Component Analysis (PCA) and Hierarchical Cluster Analysis (HCA). The chemical identification and quantification of the essential oils based on gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC/MS) showed that five essential oils had various substances correlated with the predominance of the limonene. The essential oils were divided in three groups based on multivariate analysis. The first one was orange and tangerine ponkan, the second one lemon lime and the third one lime and citron. Using the concentration 2000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , the essential oil of the third group inhibited mycelial growth completely of fungi *F. oxysporum* and *A. alternate*. However, using the same concentration, only the essential oil of the citron was able to inhibit the mycelial growth completely of fungi *C. musae*.

**Keywords:** Genus *Citrus*. Essential oils. Antifungal activities. Multivariate analysis

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Rotas biossintéticas dos metabólitos secundários.....	19
Figura 2	Estrutura química do isopreno.....	21
Figura 3	Biossíntese dos terpenoides.....	22
Figura 4	Biossíntese dos fenilpropanoides.....	23
Figura 5	Porcentagem da produção mundial das quatro frutas mais cultivadas.....	24
Figura 6	Estrutura química do limoneno.....	26
Figura 7	Estrutura química do citral: (a) neral , (b) geranial.....	27
Figura 8	Estrutura química do benzaldeído.....	28
Figura 9	Estrutura química do safrol.....	29
Figura 10	Cascas de limão-tati preparadas para o processo de extração.....	35
Figura 11	Processo de extração de óleo essencial (hidrodestilação)	36
Figura 12	Aparelho para determinação da umidade.....	37
Figura 13	Análises dos óleos essenciais de cinco espécies do gênero <i>Citrus</i> (a) Rendimento (b) Teor de umidade.....	42
Figura 14	Estruturas químicas dos componentes majoritários do óleo essencial de <i>C. sinensis</i> (a) limoneno, (b) mirceno..	45
Figura 15	Estruturas químicas dos componentes majoritários do óleo essencial de <i>C. sinensis</i> (a) limoneno, (b) $\gamma$ - terpineno (c) mirceno.....	47
Figura 16	Estruturas químicas dos componentes majoritários do óleo essencial de <i>C. sinensis</i> (a) limoneno, (b) $\gamma$ - terpineno (c) $\beta$ -pineno.....	49
Figura 17	Estruturas químicas dos componentes majoritários do óleo essencial de <i>C. aurantifolia</i> (a) limoneno, (b) $\gamma$ -	51

	terpineno (c) $\beta$ -pineno (d) geranial (e) <i>p</i> -cimeno (f) neral.....	
Figura 18	Estruturas químicas dos componentes majoritários do óleo essencial de <i>C. medica</i> (a) limoneno, (b) $\gamma$ -terpineno (c) <i>p</i> -cimeno (d) geranial (e) neral.....	54
Figura 19	Separação dos constituintes químicos dos óleos essenciais das cinco espécies do gênero <i>Citrus</i> por classes de substâncias.....	55
Figura 20	Gráfico bidimensional PC1 x PC3 dos scores para diferentes óleos essenciais de cinco espécies do gênero <i>Citrus</i> .....	57
Figura 21	Gráfico bidimensional PC1 x PC3 dos loadings para diferentes óleos essenciais de cinco espécies do gênero de <i>Citrus</i> .....	58
Figura 22	Gráfico biplot PC1 x PC3 dos loadings e scores para diferentes óleos essenciais de cinco espécies do gênero de <i>Citrus</i> , em relação às diferentes concentrações dos seus constituintes químicos.....	59
Figura 23	Dendograma das cinco espécies do gênero <i>Citrus</i> em relação aos teores dos seus constituintes químicos.....	61
Figura 24	Testes de fumigação “in vitro” realizados com cinco óleos essenciais das cascas de cinco espécies do gênero <i>Citrus</i> , nas concentrações de 125, 250, 500, 1000 e 2000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ sobre o fitopatógeno <i>F. oxysporum</i> .....	63
Figura 25	Gráfico da inibição do crescimento micelial do <i>F. oxysporum</i> exposto às diferentes concentrações dos	64

	cinco óleos essenciais do gênero <i>Citrus</i> .....	
Figura 26	Testes de fumigação “in vitro” realizados com cinco óleos essenciais das cascas de cinco espécies do gênero <i>Citrus</i> nas concentrações de 125, 250, 500, 1000 e 2000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ sobre o fitopatógeno <i>A. alternata</i> .....	66
Figura 27	Gráfico da inibição do crescimento micelial do <i>A. alternata</i> exposto às diferentes concentrações dos cinco óleos essenciais do gênero <i>Citrus</i> .....	67
Figura 28	Gráfico da inibição do crescimento micelial do <i>C. musae</i> exposto às diferentes concentrações dos cinco óleos essenciais do gênero <i>Citrus</i> .....	69
Figura 29	Dendograma dos $\text{EC}_{50}$ dos óleos essenciais das cascas das cinco espécies do gênero <i>Citrus</i> .....	72

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Constituição química do óleo essencial das cascas de laranja.....	44
Tabela 2	Constituição química do óleo essencial das cascas de ponkan.....	47
Tabela 3	Constituição química do óleo essencial das cascas de limão-rosa.....	49
Tabela 4	Constituição química do óleo essencial das cascas de limão-taiti.....	50
Tabela 5	Constituição química do óleo essencial das cascas de cidra.....	53

## LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Unidade de temperatura: Graus Celcius
%	Unidade: Porcentagem
mL	Unidade de volume: Mililitros
g	Unidade de massa: Gramas
p/p	Razão: Peso/peso
µL	Unidade de volume: Microlitros
m	Unidade de medida: Metros
mm	Unidade de medida: Milimetros
µm	Unidade de medida: Micrômetros
mL/min	Razão: Mililitros/minuto
KPa	Unidade de pressão: Quilopascal
eV	Unidade de energia: Elétron-volt
µg/mL	Razão: Micrograma/mililitro
cm	Unidade de medida: Centímetro
mg	Unidade de massa: Miligrama

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	16
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	18
2.1	Metabólitos Secundários.....	18
2.2	Óleos essenciais.....	20
2.3	Óleos essenciais do gênero <i>Citrus</i> .....	24
2.4	Potencial antifúngico dos óleos essenciais.....	27
2.5	Fitopatógenos.....	30
2.5.1	<i>Fusarium oxysporum</i> .....	30
2.5.2	<i>Alternaria alternata</i> .....	31
2.5.3	<i>Colletotrichum musae</i> .....	32
2.6	Análise Multivariada.....	32
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	35
3.1	Coleta e preparação do Material Vegetal.....	35
3.2	Extração do óleo essencial.....	36
3.3	Determinação da umidade.....	36
3.4	Identificação e quantificação química dos óleos essenciais.....	37
3.5	Atividade antifúngica dos óleos essenciais.....	38
3.5.1	Micro-organismos.....	38
3.5.2	Teste biológico.....	39
3.6	Análise estatística.....	40
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	42
4.1	Rendimento dos óleos essenciais.....	42
4.2	Identificação e quantificação dos constituintes dos óleos essenciais das cinco espécies do gênero <i>Citrus</i> .....	43
4.2.1	<i>Citrus sinensis</i> .....	44
4.2.2	<i>Citrus reticulata</i> .....	46

4.2.3	<i>Citrus limonia</i> .....	48
4.2.4	<i>Citrus aurantifolia</i> .....	50
4.2.5	<i>Citrus medica</i> .....	52
4.2.6	Separação dos constituintes químicos dos óleos essenciais por classes de compostos.....	55
4.3	Análise de Componentes Principais (PCA) e Análise de Agrupamento Hierárquico (HCA).....	56
4.4	Atividade biológica.....	61
4.4.1	Efeito fungicida dos óleos essenciais de cinco espécies do gênero <i>Citrus</i> sobre os fitopatógenos <i>Fusarium oxysporum</i> , <i>Alternaria alternata</i> e <i>Colletotrichum musae</i> .....	61
5	CONCLUSÕES.....	75
	REFERÊNCIAS .....	76
	APÊNDICE A.....	84
	APÊNDICE B.....	85
	APÊNDICE C.....	86
	APÊNDICE D.....	89
	APÊNDICE E.....	91

## 1 INTRODUÇÃO

Os produtos naturais são utilizados desde a antiguidade em diversas áreas. Atualmente muitas espécies de plantas estão sendo estudadas, com o objetivo de isolar seus princípios ativos, servindo como modelos de novos agroquímicos. Entre os produtos naturais, os óleos essenciais destacam-se sendo na maioria das vezes, misturas complexas de substâncias voláteis, conferindo um odor característico à planta. Eles são formados via dois precursores: o acetil-CoA e o ácido chiquímico, sendo o primeiro precursor dos terpenoides, que são responsáveis pela maioria da constituição química dos óleos essenciais, e o segundo, precursor dos fenilpropanoides, que são compostos aromáticos.

Os óleos essenciais atuam como sinais de comunicação química com o reino vegetal e armas de defesa contra o reino animal. Essas características biológicas tornam as plantas que os produzem poderosas fontes de agentes biocidas, sendo largamente estudadas na agricultura por apresentarem atividades bactericidas, inseticidas e fungicidas. Entre os fungos, os que atacam espécies vegetais são causadores de grandes prejuízos devido às perdas ocasionadas, tanto diretamente nas lavouras, como nos produtos em pós-colheita. Normalmente, o controle desses fitopatógenos tem sido feito mediante a utilização de fungicidas sintéticos. No entanto, uma alternativa desejável para se evitarem os danos causados pela invasão fúngica seria a utilização de produtos naturais, pois além de serem mais viáveis, não deixam resíduos tóxicos ao homem e nos alimentos tratados.

Os óleos essenciais do gênero *Citrus* estão entre os mais utilizados no mundo, e o Brasil destaca-se em sua produção, principalmente por serem obtidos como subprodutos da indústria de suco. Em geral, o composto limoneno é o seu componente majoritário, podendo, no entanto, haver diferenças nos teores tanto do próprio limoneno, quanto dos demais constituintes químicos, de uma espécie

para outra. Esses componentes podem atuar de maneira isolada, normalmente devido ao componente majoritário, como também em associação, atuando de forma sinérgica ou antagônica, resultando em maior ou menor atividade biológica.

Assim, neste trabalho procurou-se caracterizar e quantificar quimicamente os óleos essenciais extraídos das cascas da laranja (*Citrus sinensis*), ponkan (*Citrus reticulata*), limão-rosa (*Citrus limonia*), limão-taiti (*Citrus aurantifolia*) e cidra (*Citrus medica*), bem como avaliar o efeito biológico sobre o crescimento micelial *in vitro* dos fungos *Fusarium oxysporum*, *Alternaria alternata* e *Colletotrichum musae*.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Metabólitos Secundários

Uma das características dos seres vivos é a presença de atividade metabólica. O metabolismo é o conjunto de reações químicas que ocorre no interior das células, sendo nas plantas e em alguns micro-organismos dividido em metabolismo primário e secundário. O primeiro corresponde a macromoléculas essenciais a todos os seres vivos, desempenhando funções de suma importância, tais como fotossíntese, respiração celular e transporte de solutos. Nesse grupo, estão incluídos os lipídios, as proteínas e os glicídeos, com funções vitais bem definidas. O segundo grupo de compostos químicos, os metabólitos secundários, geralmente apresentam estrutura complexa de baixo peso molecular e desempenham importantes papéis ecológicos (SIMÕES et al., 2007). Estes, principalmente nos vegetais, são uma estratégia química de sobrevivência e perpetuação da espécie, desenvolvida ao longo do período evolutivo, para poder escapar das ameaças pelo fato de as plantas serem sésseis. A variedade de moléculas originadas do metabolismo secundário das plantas teria sido resultado de milhões de anos de evolução, como forma de proteção, atração de polinizadores, adaptações ao estresse ambiental ou defesa química contra micro-organismos (PIMENTEL et al., 2010; ZACARONI et al., 2009), insetos (LIMA et al., 2010), herbívoros e outras plantas (BAKKALI et al., 2008). Tal variedade e complexidade são inalcançáveis por métodos laboratoriais (VIEGAS-JÚNIOR et al., 2006).

De acordo com Simões et al. (2007), o metabolismo secundário dá origem aos compostos por meio de dois metabólitos intermediários, que são derivados da glicose: o ácido chiquímico e o acetil-CoA (Figura 1). O ácido chiquímico origina os aminoácidos aromáticos precursores da maioria dos

metabólitos secundários aromáticos, como taninos hidrolisáveis, cumarinas, alcaloides derivados de aminoácidos aromáticos e fenilpropanoides. O acetil-CoA fornece as unidades acetila, que compõem o intermediário reativo, acetil-tio-coenzima A (acetilScoA ou acetil-CoA), o verdadeiro precursor de vários grupos de substâncias, tais como os aminoácidos alifáticos, terpenoides, esteróis, ácidos graxos e triglicerídeos. Os aminoácidos alifáticos originam-se do ciclo do ácido cítrico, ao passo que os demais metabólitos derivam do mevalonato ou da condensação de unidades de acetato. Alguns metabólitos secundários derivam não apenas de um desses intermediários, mas são resultantes da combinação de uma unidade do ácido chiquímico e uma ou mais unidades do acetato ou derivados desse, como é o caso das antraquinonas, dos flavonoides e dos taninos condensados.

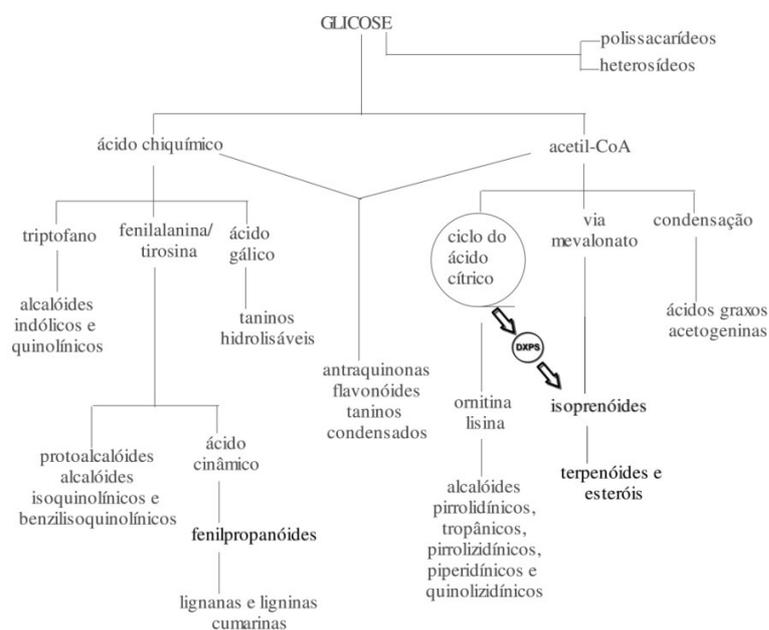


Figura 1 Rotas biossintéticas dos metabólitos secundários

Adaptado de Simões et al., 2007

## 2.2 Óleos essenciais

O termo óleo essencial deriva do nome *Quinta essentia*, proposto para essa substância, em meados do século XVI, pelo reformador da medicina Paracelsus Von Hohenheim (BURT, 2004).

Os óleos essenciais são misturas complexas de diversos compostos, podendo conter em sua constituição cerca de 20 a 60 componentes em concentrações muito diferentes. São caracterizados, na maioria das vezes, por dois ou três componentes em concentrações bastante elevadas, ou seja, compostos majoritários (20-70%), em comparação com os outros componentes presentes em pequenas quantidades (BAKKALI et al., 2008).

São também chamados de compostos voláteis, conferindo aromas agradáveis e sabores característicos. Apresentam-se à temperatura ambiente como líquidos oleosos de alta volatilidade, o que os diferenciam dos óleos fixos. Podem ser consideradas moléculas lipofílicas, ou seja, insolúveis em água e solúveis em solventes orgânicos. De uma maneira geral, os óleos essenciais são instáveis, especialmente na presença de luz, calor, umidade, ar e metais (SIMÕES et al., 2007).

Sua composição envolve uma grande quantidade de classes de compostos, como hidrocarbonetos terpênicos, álcoois simples e terpênicos, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, éteres, óxidos, peróxidos, furanos, ácidos orgânicos, lactonas e cumarinas (SIMÕES et al., 2007).

Os óleos essenciais são sintetizados e armazenados em estruturas epidérmicas ou mesofílicas, as quais estão presentes em diversas partes das plantas, como rizomas, bulbos, folhas, flores, cascas dos frutos e frutos e são sintetizadas em células especiais, como glândulas secretoras e tricomas glandulares. Sua abundância ocorre principalmente nas angiospermas, dicotiledôneas, tais como nas famílias das Asteraceae, Apiaceae, Lamiaceae,

Lauraceae, Myrtaceae, Myristicaceae, Piperaceae, Rutaceae, entre outras (SIMÕES et al., 2007).

A ISO (International Organization for Standardization) define óleo essencial como “um produto obtido por destilação em água ou vapor, por destilação seca de materiais naturais ou por expressão de pericarpos de frutos cítricos (Rutaceae)”. Após a destilação, o óleo essencial é fisicamente separado da fase aquosa. Na literatura são citadas outras técnicas de extração de óleos essenciais (hidrodestilação, destilação por arraste a vapor, extração com solvente orgânico, extração por micro-ondas, extração por fluídos supercríticos, microextração em fase sólida e enfloração), e a utilização de cada uma vai de acordo com a necessidade e o material disponível, variando, assim, a pureza do produto final (SIMÕES et al., 2007).

Muitos óleos essenciais são constituídos de uma variedade de compostos terpenoides, sintetizados a partir da unidade isoprênica ( $C_5H_8$ ) (Figura 2) que, por sua vez, origina-se do ácido mevalônico ou do 1-deoxi-D-xilulose-5-fosfato (DXPS).

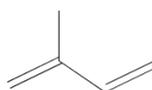


Figura 2 Estrutura química do isopreno

Para a formação da unidade isoprênica por meio do ácido mevalônico, este próprio é desidratado e pirofosforilado, produzindo o isopentenil difosfato (IPP), o qual por meio de reações de isomerização, é transformado em dimetilalil difosfato (DMAPP). Embora essa isomerização seja reversível, está em equilíbrio; já por meio do intermediário 1-deoxi-D-xilulose-5-fosfato (DXPS), este dá origem ao 2-C-metil-D-eritritol-4-fosfato que, após sucessivas reações, formam o isopentenil difosfato (IPP) e o dimetilalil difosfato (DMAPP). Por

meio da condensação das unidades pentacarbonadas formadas (IPP) e (DMAPP), ocorre a síntese de outros compostos terpênicos: monoterpenos ( $C_{10}H_{16}$ ); sesquiterpenos ( $C_{15}H_{24}$ ); diterpenos ( $C_{20}H_{32}$ ); triterpenos ( $C_{30}H_{48}$ ); tetraterpenos ( $C_{40}H_{64}$ ) (Figura 3) (DEWICK, 2002). As moléculas dos monoterpenos representam 90% da composição dos óleos essenciais (BAKKALI et al., 2008).

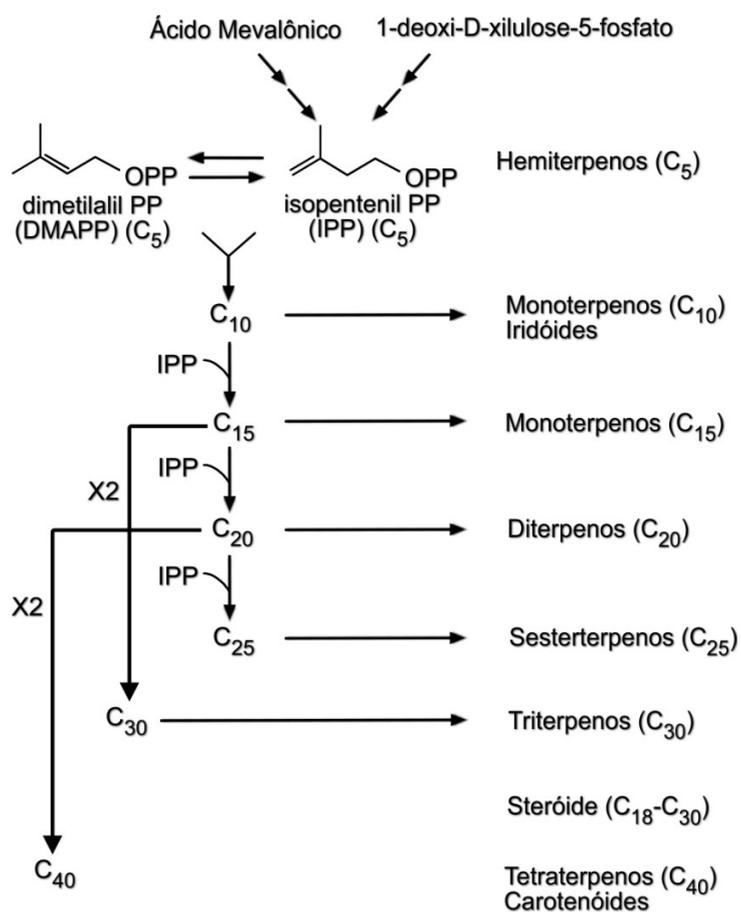


Figura 3 Biossíntese dos terpenoides

Fonte Dewick, 2002

Além dos terpenoides, os óleos essenciais contêm os fenilpropanoides, que são formados a partir do ácido chiquímico, o qual origina os aminoácidos fenilalanina e a tirosina que, por sua vez, com a ação da enzima fenilalanina amonialiase (FAL), perde uma molécula de amônia, resultando na formação dos ácidos cinâmico e *p*-cumárico, respectivamente (Figura 4). Nas plantas, a atividade da FAL está sob o controle de vários fatores internos e externos, tais como hormônios, níveis de nutrientes, luz, infecção por fungos e lesões. Portanto, por meio de várias reações de redução, oxidação e ciclização, levam à formação dos fenilpropanoides (SIMÕES et al., 2007).

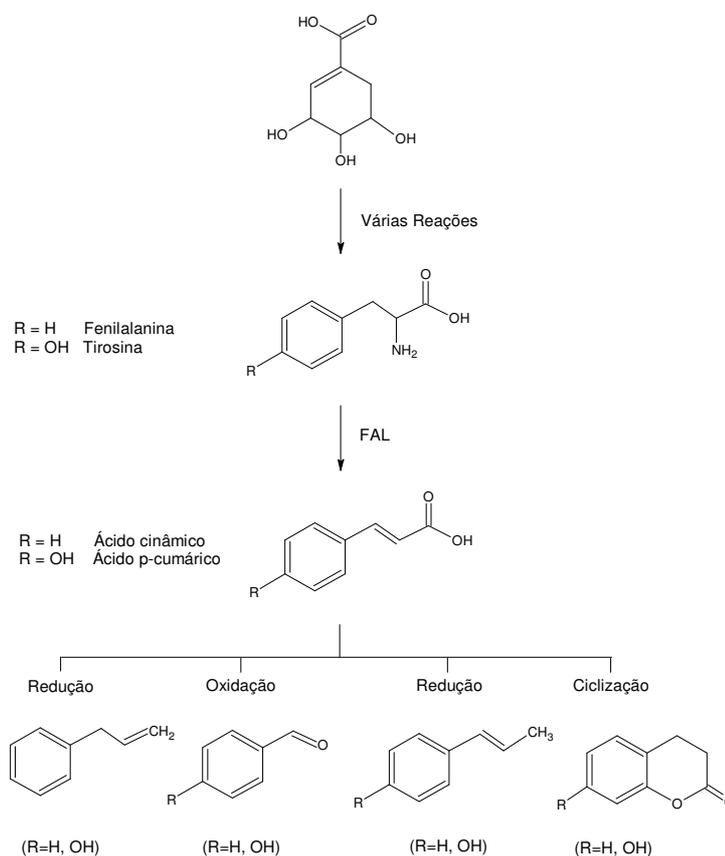


Figura 4 Biossíntese dos fenilpropanoides

Fonte Simões et al., 2007

### 2.3 Óleos essenciais do gênero *Citrus*

O gênero *Citrus* é nativo da região sudeste do continente Asiático, compreendendo um grupo de plantas pertencente à família Rutaceae, representado principalmente por laranjas (*Citrus sinensis*), tangerinas (*Citrus reticulata* e *Citrus deliciosa*), limões (*Citrus limon* e *Citrus limonia*), limas ácidas, como o taiti (*Citrus aurantifolia*), pomelo (*Citrus paradise*), cidra (*Citrus medica*), laranja azeda (*Citrus aurantium*) e toranjas (*Citrus grandis*). O Brasil é o terceiro maior produtor de frutas frescas e o maior produtor mundial de frutas cítricas, sendo essas as mais cultivadas no mundo (Figura 5) (INSTITUTO AGRONÔMICO DE CAMPINAS, 2010).

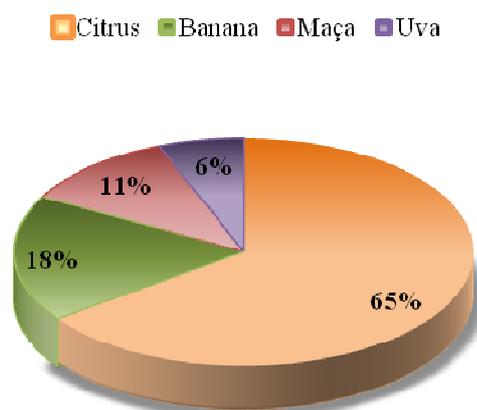


Figura 5 Porcentagem da produção mundial das quatro frutas mais cultivadas

Fonte Sawamura, 2010

O Brasil destaca-se na produção de óleos essenciais, ao lado da Índia, China e Indonésia, que são considerados os 4 grandes produtores mundiais. A posição do Brasil deve-se aos óleos essenciais de cítricos, que são subprodutos

da indústria de sucos. Já se conhecem aproximadamente 3000 óleos essenciais, dos quais, 300 são de importância comercial no mundo. O Quadro 1 apresenta os 12 principais óleos essenciais no mercado mundial, destacando-se os óleos essenciais de laranja, limão, lima (BIZZO et al., 2009).

Quadro 1 Principais óleos essenciais do mercado mundial

<b>Óleo Essencial</b>	<b>Espécie</b>
<b>Laranja (Brasil)</b>	<i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck
Menta-japonesa (Índia)	<i>Mentha arvensis</i> L. f. <i>piperascens</i> . ex. Holmes
Eucalipto (Brasil/China)	<i>Eucalyptus globulus</i> Labill., <i>E. polybractea</i> R. T. Backer e <i>Eucalyptus</i> spp.
Citronelal (Brasil)	<i>Cymbopogon winterianus</i> Jowitt e <i>C. nardus</i> (L.) Rendle
Hortalã-pimenta	<i>Mentha X piperita</i> L.
<b>Limão</b>	<i>Citrus limon</i> (L.) N.L. burn.
Eucalipto (Tipo citronela)	<i>Eucalyptus citrodora</i> Hook.
Cravo-da-índia	<i>Syzygium aromaticum</i> (L.) Merr. E L. M. Perry
Cedro (EUA)	<i>Juniperus virginiana</i> L. e <i>J. ashei</i> Buchholz
<b>Lima destilada (Brasil)</b>	<i>Citrus aurantifolia</i> (Christm. & Panz.) Swingle
Spearmint (nativa)	<i>Mentha spicata</i> L.
Cedro (China)	<i>Chamaecyparis funebris</i> (Enfl.) Franco

Fonte: Adaptado de Bizzo et al., 2009

No período de janeiro de 2005 a outubro de 2008, a exportação de óleos essenciais de cítricos pelo Brasil foi de 287.759 toneladas. O óleo essencial de laranja destacou-se, sendo responsável por 86% das exportações, seguido do limão (8%), lima (3%) e outros cítricos 3% (como toranja, cidra, tangerina, entre outros) (BIZZO et al., 2009).

As aplicações dos óleos essenciais das cascas dos cítricos são diversas, tendo eles um amplo aproveitamento. São utilizados principalmente em refrigerantes, sorvetes, produtos de confeitaria, padaria, cosméticos, perfumaria, sabonetes e materiais de limpeza. Atuam como agentes redutores da peroxidase em vegetais folhosos e antioxidantes de óleos comestíveis, como o azeite, para melhorar suas propriedades sensoriais (PONCE et al., 2004). São também adicionados em medicamentos fitoterápicos como aromatizantes para mascarar o gosto desagradável. São empregados como antitumorais, ajudando a prevenir a indução de várias doenças crônicas (CHOI et al., 2000). São eficazes também contra insônia, ansiedade e epilepsia (CARVALHO-FREITAS; COSTA, 2002). Apresentam atividade inseticida e antimicrobiana, relatada em diversos trabalhos (CHUTIA et al., 2009; FURTADO et al., 2005; KIRBASLAR et al., 2009; SHARMA; TRIPATHI, 2008; VIUDA et al., 2008).

Nos óleos essenciais dos cítricos em geral, o limoneno é o mais expressivo componente majoritário, atingindo concentrações de 90 a 96% (Figura 6). Os dois enantiômeros do limoneno são os mais abundantes monoterpenos na natureza. S-(-)-limoneno é principalmente encontrado numa variedade de plantas e ervas como *Mentha* spp, enquanto R-(+)-limoneno é o componente majoritário dos óleos das cascas de limão e laranja, sendo a prevenção da desidratação e inibição de crescimento microbiano suas funções naturais nos vegetais (DEMYTTENAERE; VANOVERSCHELDE; DE KIMPE, 2004).

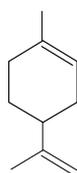


Figura 6 Estrutura química do limoneno

Ladaniya (2008) relata que há mais de 150 compostos encontrados em óleos essenciais de cítricos.

Os principais responsáveis pelo aroma e qualidade do óleo essencial dos cítricos são os componentes limoneno e os isômeros neral e geranial (cital) (Figura 7), encontrados os dois últimos na proporção de 2,4 a 4% do óleo essencial dos cítricos (LADANIYA, 2008).

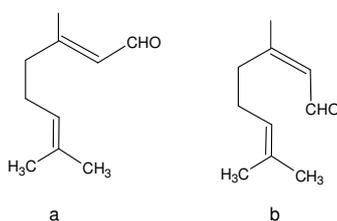


Figura 7 Estrutura química do citral: (a) neral, (b) geranial

#### 2.4 Potencial antifúngico dos óleos essenciais

A utilização de fungicidas sintéticos é um dos principais métodos de controle de doenças de plantas; porém, seu uso constante pode promover a seleção de fungos fitopatogênicos resistentes, fazendo com que ele não tenha mais uma eficiência satisfatória (SILVA et al., 2008). Além desse problema, há uma crescente pressão de órgãos e instituições governamentais, principalmente de países desenvolvidos, para evitar a utilização de fungicidas sintéticos devido ao efeito cancerígeno potencial de alguns desses produtos. Diante disso, uma alternativa desejável em relação ao tratamento químico tradicional é a utilização de produtos naturais. A literatura tem registrado em muitos trabalhos a eficiência dos óleos essenciais de um grande número de espécies botânicas em promover a inibição do desenvolvimento de vários fitopatógenos de natureza fúngica. Estes,

além de serem mais viáveis, não deixam resíduos tóxicos ao homem e alimentos tratados.

Pimentel et al. (2010), empregando a técnica de fumigação in vitro e o método de contato, avaliaram a capacidade fungitóxica do óleo essencial de folhas frescas de *Tanaecium nocturnum* (cipó vick ) sobre cepas puras do fungo *Aspergillus flavus* isolado da castanha-do-brasil e verificaram que, após 10 dias de incubação, ocorreu a inibição total do crescimento micelial do fungo *Aspergillus flavus* nas concentrações de 782  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (técnica de contato) e 1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (técnica de fumigação). A ação fungitóxica do óleo essencial sobre o micro-organismo foi atribuída à presença do benzaldeído, composto majoritário encontrado no óleo essencial (Figura 8).

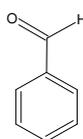


Figura 8 Estrutura química do benzaldeído

No óleo essencial das cascas de diversas espécies do gênero *Citrus* (*Citrus limon*, *Citrus paradisi*, *Citrus bergamia*, *Citrus aurantium*, *Citrus sinensis*, *Citrus reticulata*), Kırbaslar et al. (2009) encontraram para todas as espécies, por meio da análise por cromatografia em fase gasosa acoplada a um espectrômetro de massas CG-EM, o componente majoritário limoneno (Figura 6). Nesse trabalho, os autores avaliaram a atividade antimicrobiana em 9 bactérias e 5 fungos. O processo de extração dos óleos essenciais foi por prensagem a frio, verificando-se para todos os óleos essenciais uma forte atividade antimicrobiana. Sharman e Tripathi (2008), estudando a atividade fungicida do óleo essencial das cascas de *Citrus sinensis* sobre 10 patógenos pós-colheita, observaram uma alta atividade fungicida, concluindo que esse

efeito seria devido ao limoneno e ao sinergismo dos vários compostos presentes no óleo essencial.

Zacaroni et al. (2009), avaliando a atividade antifúngica *in vitro* do óleo essencial das folhas de *Piper hispidinervum* sobre *Bipolaris sorokiniana*, *Fusarium oxysporum* e *Colletotrichum gloeosporioides*, verificaram que houve inibição total do fitopatógeno *B. sorokiniana*, na concentração de 200  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , ao passo que, para o *F. oxysporum* e o *C. gloeosporioides*, essa ocorreu na concentração de 1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Os pesquisadores inferiram que o efeito antifúngico observado foi devido à presença do componente majoritário safrol (Figura 9). Nascimento et al. (2008) encontraram 82,5% de safrol no óleo essencial de folhas de pimenta-longa (*Piper hispidinervum*) e observaram uma inibição sobre o crescimento micelial do fungo *Alternaria alternata* em todas as concentrações analisadas do óleo essencial; na concentração de 1000  $\text{mg L}^{-1}$ , essa inibição foi de 100%. Silva e Bastos (2007) constataram também *in vitro* a atividade fungicida dos óleos essenciais das folhas de 10 espécies do gênero *Piper*, frente aos micro-organismos *Crinipellis pernicioso*, *Phytophthora palmivora* e *Phytophthora capsici*.

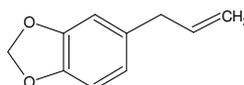


Figura 9 Estrutura química do safrol

Estudando a inibição da germinação dos conídios e a inibição do crescimento micelial do fitopatógeno *Colletotrichum gloeosporioides*, Souza Junior et al. (2009) verificaram que, a partir da concentração de 1  $\mu\text{L mL}^{-1}$ , os óleos essenciais das espécies vegetais (*Lippia sidoides*, *Ocimum gratissimum*, *Lippia citriodora*, *Cymbopogon citratus* e *Psidium guayava* var. *pomifera*) apresentaram efeito de 100% de inibição sobre a germinação dos conídios. Já

para o crescimento micelial do fungo, somente as espécies *Lippia sidoides*, *Ocimum gratissimum*, *Lippia citriodora*, *Cymbopogon citratus* inibiram em 100%. Guimarães et al. (2007) comprovaram também inibição do crescimento micelial do fitopatógeno *C. gloeosporioides*, por meio do óleo essencial de capim-santo (*Cymbopogon citratus*) e relataram que esta ação foi devida à presença do componente citral (Figura 7). Isso corrobora com o trabalho realizado por Palhano et al. (2004), que relatam o efeito fungicida do óleo essencial de folhas frescas de *C. citratus* ao fungo *C. gloeosporioides*.

## **2.5 Fungos Fitopatogênicos**

Os fungos constituem um grupo numeroso de organismos, bastante diversificado filogeneticamente e de grande importância ecológica e econômica. Os fungos fitopatogênicos representam uma importante classe, cuja maioria deles tem a capacidade de se desenvolver em diversos tipos de substratos. São agentes causadores de diversos tipos de doenças em vegetais, acarretando perdas significativas na agricultura, destruindo grãos durante a estocagem, diminuindo o valor nutritivo e, algumas vezes, produzindo micotoxinas prejudiciais ao homem e aos animais (KIMATI et al., 2005).

### **2.6.1 *Fusarium oxysporum***

O gênero *Fusarium* é um dos mais estudados em razão dos sérios problemas econômicos ocasionados pela sua ação como fitopatógeno, além de sua ampla distribuição geográfica. Os estudos referentes à distribuição populacional de *Fusarium* spp., na maioria das vezes, limitam-se às áreas de cultivo com grandes culturas, como soja e trigo, possivelmente por serem o principal alvo do mercado de agroquímicos (ETHUR et al., 2008).

Esse gênero produz um micélio de aspecto aveludado, com matizes rosadas, vermelhas, violetas ou marrons. A maioria das suas espécies é habitante do solo, de ocorrência cosmopolita, e consegue sobreviver na ausência do hospedeiro, como saprófita. A presença desse fungo desempenha papel de destaque em toxicologia de alimentos, devido à produção de metabólitos secundários tóxicos para humanos e animais, além de reduzir a produção e a qualidade de grãos (KIMATI et al., 2005).

Considerando a espécie *Fusarium oxysporum*, mais de 20 doenças com importância econômica são causadas por essa espécie. Esse patógeno invade as plantas principalmente pelo sistema radicular e coloniza o xilema. Alguns dos sintomas provocados pelas plantas são: murcha, descoloração vascular, clorose, nanismo e morte prematura das plantas.

### **2.6.2 *Alternaria alternata***

O gênero *Alternaria* apresenta grande importância econômica na agricultura comercial, por infectar diversas culturas, causando doenças responsáveis por danos econômicos significativos.

Segundo Kimati et al. (2005), o fungo *Alternaria alternata*, pertencente à classe Hyphomycetes e ordem Moniliales, é agente causal de três doenças em Citros. A doença mancha-marrom de *Alternaria* afeta folhas, ramos e frutos de tangerina, acarretando uma desfolha e manchas que depreciam o fruto comercialmente, reduzindo, assim, sua produção. Essa doença foi constatada no Brasil a partir de 2001 e hoje já é relatada em vários estados do país (COLTURATO et al., 2009). Outra doença, a mancha-foliar de *alternaria*, que afeta as folhas de limoeiro, é de grande importância em viveiros e coleções de matrizes e borbulheiras desse porta-enxerto. Já a podridão-negra afeta frutos de

diferentes espécies de *Citrus*, causando podridões. Além dos citros, essa doença acomete também outras espécies vegetais.

### **2.6.3 *Colletotrichum musae***

*Colletotrichum* é um gênero de fungo ascomiceto que engloba muitas espécies causadoras de doenças em uma gama extensiva de hospedeiros. É um dos mais importantes gêneros de fungos fitopatogênicos em todo o mundo, especialmente em regiões tropicais e subtropicais (BAILEY; JEGER, 1992). Espécies desse gênero apresentam diversas estratégias na invasão dos tecidos de plantas, causando doenças importantes economicamente em cereais, gramíneas, leguminosas e plantações perenes.

Entre as podridões em pós-colheita, a antracnose, causada por *Colletotrichum musae*, é a principal doença responsável pela deterioração da fruta durante o transporte, armazenamento e comercialização (PESSOA et al., 2007). A doença é caracterizada pela formação de lesões deprimidas, escuras, com o eixo maior paralelo ao eixo longitudinal e delimitada por uma margem mais clara nos tecidos sadios. Geralmente, as lesões são superficiais, mas podem, em casos severos, com o amadurecimento da fruta, atingir a polpa (KIMATI et al., 2005).

A utilização de fungicidas sintéticos ainda é o método mais comum de controle desse fungo, apesar de pesquisadores demonstrarem a eficiência no controle da antracnose utilizando-se de métodos alternativos (LIMA et al., 2007).

## **2.7 Análise multivariada**

Em muitos experimentos químicos para se obter informações sobre os resultados, necessita-se da análise de um grande número de variáveis. A análise multivariada auxilia na interpretação desses dados de forma mais objetiva, extraindo dessa quantidade de variáveis e resultados as informações mais relevantes.

A redução dessas variáveis, permitindo a construção de gráficos bidimensionais contendo maiores informações estatísticas, pode ser conseguida por meio da análise de componentes principais (PCA). É possível também, utilizando-se essas variáveis, a construção de agrupamentos entre as amostras de acordo com sua similaridade, representando-a de forma bidimensional por meio de um dendograma.

A análise de componentes principais (PCA) é um método de análise multivariada utilizado para projetar dados n-dimensionais em um espaço de baixa dimensão, ou seja, reescrevendo as coordenadas das amostras em outro sistema de eixo mais conveniente para a análise dos dados. Isso é feito pelo cálculo das componentes principais (PCs) obtidas, fazendo-se combinações lineares das variáveis originais. Essas componentes principais são obtidas em ordem decrescente de máximas variâncias, na qual a primeira componente principal detém mais informações estatísticas que a segunda que, por sua vez, tem mais informações estatísticas que a terceira, e assim por diante. A análise dos componentes principais é um método exploratório que permite a redução da dimensionalidade dos pontos representativos das amostras, auxiliando na elaboração de hipóteses gerais com base neeses dados coletados (FERREIRA, 2002).

A análise de agrupamento hierárquico (HCA) é outro método importante na análise multivariada dos dados. Nessa técnica, a similaridade entre duas amostras pode ser expressa como uma função da distância entre dois pontos representativos dessa amostra no espaço n-dimensional. As associações dessas

amostras produzem os dendogramas, em que as amostras semelhantes, segundo as variáveis escolhidas, são agrupadas entre si. Em resumo, quanto menor a distância entre os pontos, maior a semelhança entre amostras (NETO; MOITA, 1998).

A análise de componentes principais e de agrupamento hierárquico são técnicas de estatística multivariada complementares que têm grande aceitação na análise de dados químicos (PANERO; SILVA, 2008).

Quando se analisam diferentes óleos essenciais, esses podem ser agrupados segundo suas características (constituição química, efeito antifúngico etc.) de tal forma que interpretações quanto à similaridade entre eles podem ser obtidas.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido na Universidade Federal de Lavras (UFLA), no Laboratório de Química Orgânica do Departamento de Química e no Laboratório de Epidemiologia e Manejo do Departamento de Fitopatologia.

#### 3.1 Coleta e preparação do Material Vegetal

Os materiais vegetais, limão-taiti (*Citrus aurantifolia*), limão-rosa (*Citrus limonia*) e tangerina ponkan (*Citrus reticulata*), foram coletados no pomar da Universidade Federal de Lavras (UFLA), e as frutas laranja (*Citrus sinensis*) e cidra (*Citrus medica*) foram obtidas em um restaurante da cidade de Lavras-MG e em uma propriedade próxima à cidade de Lavras, respectivamente. As coletas foram realizadas no período da manhã, em torno das 9 horas, em dias ensolarados e ausentes de chuva, nos meses de fevereiro e março de 2010. Foram coletados frutos saudáveis e de aparência perfeita e homogênea.

Todo o material coletado foi limpo com papel-toalha, sendo os frutos cuidadosamente descascados para obtenção das cascas (Figura 10), que foram picadas em pedaços pequenos e uniformes, de modo a aumentar a superfície de contato durante o processo de extração. Em seguida, o material foi pesado para o cálculo do rendimento.



Figura 10 Cascas de limão taiti preparadas para o processo de extração

### 3.2 Extração do óleo essencial

O processo de extração dos óleos essenciais foi realizado no Laboratório de Química Orgânica do Departamento de Química da Universidade Federal de Lavras. O método utilizado foi o de hidrodestilação, utilizando um aparelho de Clevenger modificado, acoplado a um balão de fundo redondo com capacidade de 4L (Figura 11). A extração foi realizada em triplicata por um período de 2 horas, mantendo-se a solução em ebulição. Posteriormente, coletou-se o hidrolato, que foi centrifugado em centrífuga de cruzeta horizontal a  $965,36 \times g$  por 10 minutos. Após a centrifugação, o óleo essencial foi retirado com o auxílio de uma micropipeta de Pasteur e acondicionado em frasco de vidro âmbar. Em seguida, o óleo essencial foi armazenado sob refrigeração em frasco de vidro envolto com papel-alumínio. O rendimento da extração dos óleos essenciais foi calculado em p/p em base livre de umidade (GUIMARÃES et al., 2008).



Figura 11 Processo de extração de óleo essencial (hidrodestilação)

### 3.3 Determinação da umidade

Para a determinação da umidade das cascas das 5 espécies do gênero *Citrus*, utilizaram-se 5 g de cada amostra em triplicata, emergidas em um balão

de fundo redondo (250 mL) contendo 70 mL de cicloexano. Após o processo de destilação, realizado por 2 horas à temperatura de  $100 \pm 5^\circ\text{C}$ , quantificou-se o volume de água presente nas cascas, por meio do coletor de vidro tipo Dean Stark (trap para destilação) (Figura 12). A umidade foi calculada considerando-se o teor de água contido em 100 g da amostra (PIMENTEL et al., 2008).

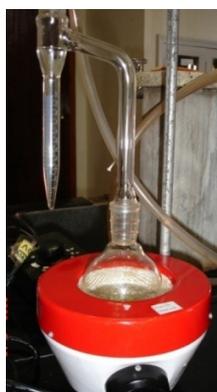


Figura 12 Aparelho para determinação da umidade

### 3.4 Identificação e quantificação química dos óleos essenciais

A análise quantitativa e a identificação dos constituintes dos óleos essenciais foram realizadas na Universidade Federal de Sergipe (UFS).

As análises quantitativas da mistura reacional foram realizadas em um cromatógrafo gasoso equipado com detector de ionização de chamas (DIC) Shimadzu GC-17A, sob as seguintes condições operacionais: coluna capilar de sílica fundida ZB-5MS (5% dimethylpolysiloxane) com 30 m x 0.25 mm i.d. x 0.25  $\mu\text{m}$  de filme, usando He como gás de arraste com fluxo de  $1,2 \text{ mL min}^{-1}$ . A temperatura foi mantida a  $50^\circ\text{C}$  por 2 min, depois aumentada  $4^\circ\text{C min}^{-1}$ , até atingir  $200^\circ\text{C}$ . Em seguida, aumentada  $15^\circ\text{C min}^{-1}$ , até atingir  $300^\circ\text{C}$ , mantendo-se essa temperatura constante por 15 min; a temperatura do injetor foi  $250^\circ\text{C}$  e a

temperatura do detector (ou interface), de 280°C. Foi injetado um volume de 0,5 µL da mistura reacional dissolvida em acetato de etila.

A análise qualitativa da mistura reacional foi realizada em cromatógrafo a gás acoplado a espectrômetro de massa CG-EM (Shimadzu, modelo QP 5050A), equipado com coluna capilar de sílica fundida J&W Scientific (5%-phenyl-95%-dimethylpolysiloxane) de 30 m x 0.25 mm i.d., 0.25 µm de filme, usando He como gás de arraste, com fluxo de 1,2 mL min<sup>-1</sup>. As condições cromatográficas da análise foram as mesmas utilizadas para CG-DIC. As condições do EM foram detector de captura iônica operando por impacto eletrônico e energia de impacto de 70 eV; velocidade de varredura 1.000; intervalo de varredura de 0,50 fragmentos/s e fragmentos detectados na faixa de 40 a 500 Da. Utilizou-se também, para a identificação dos constituintes, a comparação de seus índices de retenção com os da literatura (ADAMS, 2007). Para o índice de retenção, foi utilizada a equação de Van den Dool e Kratz 1963 em relação a uma série homóloga de n-alcenos (nC<sub>9</sub>- nC<sub>18</sub>). Também foram utilizadas duas bibliotecas NIST107 e NIST21, que permitem a comparação dos dados dos espectros com aqueles existentes nas bibliotecas.

### **3.5 Atividade antifúngica dos óleos essenciais**

As análises microbiológicas dos óleos essenciais foram realizadas no Laboratório de Epidemiologia e Manejo do Departamento de Fitopatologia (UFLA).

#### **3.5.1 Micro-organismos**

Foram utilizadas culturas de fungos obtidas da micoteca do Departamento de Fitopatologia e identificadas como *Fusarium oxysporum*, *Alternaria alternata* e *Colletotrichum musae*.

### 3.5.2 Teste biológico

Os ensaios biológicos foram realizados em triplicata utilizando-se o método de fumigação “in vitro”, por meio do qual avaliaram-se os efeitos dos óleos essenciais das cinco espécies do gênero *Citrus* em diferentes concentrações, sobre o crescimento e/ou inibição micelial das culturas fúngicas.

Em uma capela asséptica de fluxo laminar, foram adicionados em placas de Petri de 9 cm de diâmetro, aproximadamente 25 mL do meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA). Após a solidificação do meio de cultura, um disco invertido de 8 mm de diâmetro contendo o micélio de cada fungo (retirado da colônia com doze dias em BDA), foi depositado no centro de cada placa. Em seguida, aplicou-se com uma micropipeta o óleo essencial diluído em éter etílico em um papel de filtro circular de 4 cm de diâmetro aderido à parte superior da placa de Petri. As concentrações testadas dos óleos essenciais foram 125, 250, 500, 1000 e 2000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , de acordo com Pimentel et al. (2010) com modificações. Paralelamente, prepararam-se duas placas – uma apenas com éter etílico (testemunha relativa) e outra sem tratamento (testemunha absoluta). As placas foram lacradas com filme plástico, identificadas e incubadas em câmara de germinação sob fotoperíodo de 12 horas à temperatura de 25°C. As avaliações foram realizadas após sete dias da montagem do experimento, por medições diametralmente opostas (média de duas medidas diametralmente opostas) do crescimento micelial do fitopatógeno.

A porcentagem de inibição do crescimento micelial foi calculada para cada concentração (tratamento) em relação à testemunha absoluta, utilizando a seguinte equação 1:

$$Pi = \frac{(dc - dt) \times 100}{dc} \quad (1)$$

Em que, Pi = Percentual de inibição do crescimento

dc = O diâmetro médio da colônia do fungo no controle

dt = O diâmetro médio da colônia do fungo no tratamento

A concentração efetiva para inibição do crescimento micelial em 50% (EC<sub>50</sub>) foi estimada por meio da equação de regressão.

### 3.6 Análise estatística

Os experimentos foram submetidos à análise de variância, as variáveis quantitativas significativas pelo teste de F foram submetidas à análise de regressão, e as qualitativas, ao teste de médias, comparadas pelo teste de Scott Knott (1974) e Tukey. Para a avaliação dos dados do rendimento da extração e do teste de umidade, utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado (DIC), com três repetições. Para avaliação dos dados de atividade antifúngica, utilizou-se DIC com os tratamentos dispostos em esquema fatorial (5 X 6), sendo cinco óleos essenciais e seis concentrações, com três repetições.

Os dados foram analisados pelo programa estatístico Sistema de Análise de Variância para Dados Balanceados – Sisvar, segundo Ferreira (2003).

Foi utilizada também a análise multivariada utilizando-se o programa R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2010). Devido à grande quantidade de

compostos que podem estar presentes nos óleos essenciais, a análise de componentes principais (PCA) e a análise de agrupamentos hierárquicos (HCA) foram utilizadas para compreender a similaridade entre os óleos essenciais quanto aos teores dos seus constituintes químicos e seus respectivos  $EC_{50}$  frente aos fitopatógenos.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Rendimento dos óleos essenciais

A análise de variância mostrou diferença significativa tanto para rendimento quanto para umidade ( $P>0,01$ ), para os óleos essenciais das cinco espécies do gênero *Citrus* (*C. sinensis*, *C. reticulata*, *C. limonia*, *C. aurantifolia* e *C. medica*) (Tabela 1A, APÊNDICE A).

Pelos dados da Tabela 1B (APÊNDICE B), observa-se que para o rendimento não houve diferença significativa entre os resultados das espécies laranja, ponkan e limão-rosa (Scott-Knott 5%), que foram superiores ao rendimento do limão-taiti e cidra. Ao se considerar a umidade, apenas a cidra diferiu significativamente das demais (Figura 13).

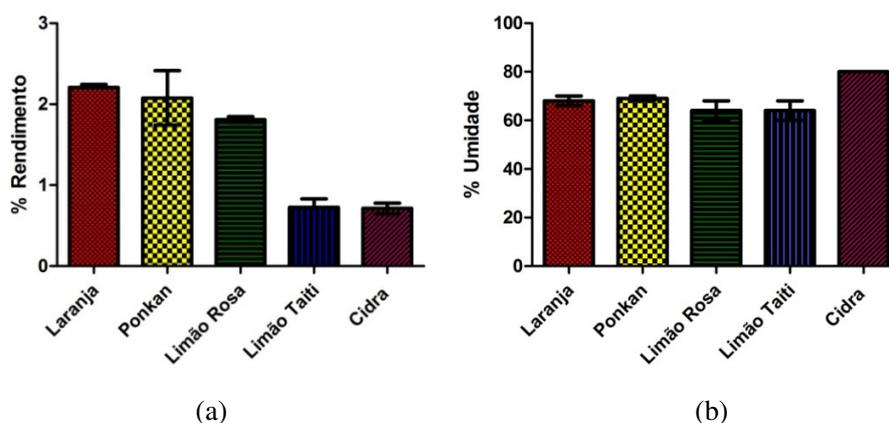


Figura 13 Análises dos óleos essenciais de cinco espécies do gênero *Citrus*  
(a) Rendimento e (b) Teor de umidade

Hosni et al. (2010), pesquisando 4 cultivares de laranja-doce, (*C. sinensis*), tangerina (*C. reticulata*), laranja-azeda (*C. aurantium*) e toranja (*C. grandis*), encontraram rendimentos de 2,31%, 1,89%, 1,49%, 2,2%, 4,62%,

1,24% e 1,06%, respectivamente. Esses valores não estão de acordo com o que relataram Minh Tu et al. (2002), que obtiveram rendimentos de 0,03%, 0,13% e 0,25% para cascas frescas de laranja, toranja e tangerina, respectivamente. Um rendimento que variou de 0,05 a 0,6% foi registrado para óleos essenciais extraídos das cascas de 58 cultivares de tangerina obtidas na Colômbia (LOTA et al., 2001).

Sharma e Tripathi (2006) encontraram um rendimento de 1,8% do óleo essencial de *Citrus sinensis*, próximo ao obtido neste trabalho. Já Ahmad et al. (2006), pesquisando o óleo essencial de duas variedades de *C. sinensis*, *C. limon* e *C. paradise*, encontraram valores bem diferentes daqueles obtidos neste trabalho, que foi de 1,21%, 0,98%, 1,12% e 0,73%, respectivamente. Essas variações podem ser atribuídas, segundo Burt et al. (2004), a diferenças de época de colheita, tipo de solo, clima da região e umidade relativa do ar no dia da coleta.

De acordo com Minh Tu et al. (2003) o rendimento das espécies do gênero *Citrus* variam de 0,2 a 2%.

#### **4.2 Identificação e quantificação dos constituintes dos óleos essenciais das cinco espécies do gênero *Citrus***

Os óleos essenciais de diferentes espécies do gênero *Citrus*, analisados por cromatografia em fase gasosa acoplada a um espectrômetro de massas (CG/EM), apresentaram uma grande variedade entre seus constituintes. Esses resultados estão de acordo com as considerações descritas por Ladaniya (2008), que relata a existência de mais de 150 compostos encontrados em óleos essenciais do gênero *Citrus*.

#### 4.2.1 *Citrus sinensis*

Os resultados obtidos por CG/EM para o óleo essencial de *C. sinensis* estão apresentados na Tabela 1. O cromatograma do óleo essencial de laranja (Figura 1C, APÊNDICE C) apresentou 7 compostos químicos identificados. Pelos dados analisados da Tabela 1, observou-se que o componente majoritário foi o limoneno (93,82%), seguido do mirceno (1,48%) (Figura 14). O restante dos constituintes identificados obteve valores abaixo de 1%.

Tabela 1 Constituição química do óleo essencial das cascas de laranja.

	<sup>1</sup> TR	Composto	<sup>2</sup> IR cal.	<sup>3</sup> IR lit.	%
1	6,786	$\alpha$ -pineno	931	939	0,24
2	8,038	sabineno	971	975	0,18
3	8,594	mirceno	988	990	1,48
4	9,089	octanal	1003	998	0,95
5	9,250	$\delta$ -3-careno	1008	1011	0,23
6	10,015	limoneno	1029	1029	93,82
7	11,515	octanol	1070	1068	0,23
Total identificado					97,13%

<sup>1</sup>TR = tempo de retenção em minutos fornecido pelo CG/EM, <sup>2</sup>IR cal = índice de Kovats calculado (ADAMS, 2007), <sup>3</sup>IR lit. = índice de retenção da literatura, % = porcentagem do componente.

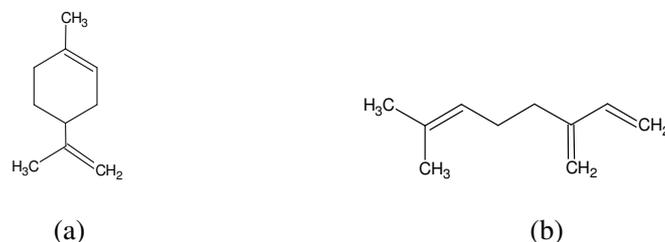


Figura 14 Estruturas químicas dos componentes majoritários do óleo essencial de *C. sinensis*  
(a) Limoneno e (b) mirceno

Estudando o óleo essencial de *C. sinensis* obtido em Uttar Pradesh, na Índia, Sharma e Tripathi (2006) encontraram como componente majoritário o limoneno, com uma porcentagem de 84,2%, valor próximo ao obtido neste trabalho. Os resultados também estão de acordo com o encontrado por Choi et al. (2000), que relatam em sua pesquisa a presença de 92% de limoneno e 1,7% de mirceno no óleo essencial de *C. sinensis*, obtidos no Japão.

Hosni et al. (2010), realizando extração de óleo essencial das cascas de 6 cultivares de *C. sinensis*, obtiveram em sua caracterização química por CG-EM o monoterpene, limoneno (96 a 97,3%) e  $\beta$ -pineno (1,37 a 1,82%) como principais componentes. Essa diferença entre as cultivares foi atribuída às características genéticas, uma vez que elas foram cultivadas, colhidas e processadas sob as mesmas condições. Estudos anteriores de Minh Tu et al. (2002) sobre o óleo essencial de *C. sinensis* extraídos de diferentes locais do Vietnã relataram a presença de limoneno (94,7%) e mirceno (2%) como os principais componentes majoritários, corroborando com o descrito neste trabalho.

Caccioni et al. (1998), pesquisando os óleos essenciais de seis cultivares de *C. sinensis*, obtidos de árvores cultivadas no Instituto Experimental de Citrus, Lentini, Sicília, encontraram teores de limoneno (94,81%; 92,48%; 95,29%; 91,14%; 95,95%; 94,95%) e mirceno (1,98%; 1,85%; 1,81%; 1,74%, 1,87%, 1,82%). Esses dados assemelham-se muito aos obtidos neste trabalho.

Os resultados deste trabalho também estão de acordo com Kirbaşlar et al. (2009), os quais relataram que os principais constituintes do óleo essencial de laranja obtido na Turquia foi limoneno (91,6%), seguido do mirceno (1,3%).

#### **4.2.2 *Citrus reticulata***

Os resultados obtidos por CG/EM para o óleo essencial de *C. reticulata* estão apresentados na Tabela 2. O cromatograma do óleo essencial da tangerina ponkan (Figura 1C, APÊNDICE C) apresentou 15 compostos químicos identificados. Pelos dados analisados da Tabela 2, observou-se que o componente majoritário foi o limoneno (84,53%), seguido do  $\gamma$ -terpineno (5,9%) e mirceno (1,62%) (Figura 15). O restante dos constituintes identificados obteve valores abaixo de 1%.

Tabela 2 Constituição química do óleo essencial das cascas de ponkan.

	<sup>1</sup> TR	Composto	<sup>2</sup> IR cal	<sup>3</sup> IR lit.	%
1	6,575	$\alpha$ -tujeno	924	930	0,12
2	6,797	$\alpha$ -pineno	931	939	0,56
3	8,048	sabineno	971	975	0,48
4	8,205	$\beta$ -pineno	976	979	0,36
5	8,604	mirceno	989	990	1,62
6	9,549	$\alpha$ -terpineno	1016	1017	0,11
7	9,834	o-cimeno	1024	1026	0,21
8	10,054	limoneno	1030	1029	84,53
9	11,037	$\gamma$ -terpineno	1057	1059	5,9
10	11,516	octanol	1070	1068	0,28
11	12,017	terpinoleno	1084	1088	0,29
12	15,554	terpinen-4-ol	1180	1177	0,32
13	16,104	$\alpha$ -terpineol	1195	1188	0,5
14	16,539	decanal	1207	1201	0,44
15	17,349	metil éter timol	1229	1235	0,26
Total identificado					95,98%

<sup>1</sup>TR = tempo de retenção em minutos fornecido pelo CG/EM, <sup>2</sup>IR cal = índice de Kovats calculado (ADAMS, 2007), <sup>3</sup>IR lit. = índice de retenção da literatura, % = porcentagem do componente.

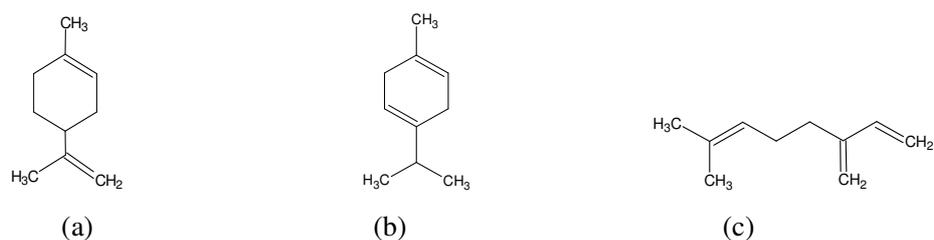


Figura 15 Estruturas químicas dos componentes majoritários do óleo essencial de *C. sinensis*  
 (a) limoneno, (b)  $\gamma$ -terpineno e (c) mirceno

Lota et al. (2001), analisando óleos essenciais extraídos de folhas e cascas de 15 espécies de tangerina, sendo 58 cultivares, encontraram na composição química de 16 cultivares a presença do componente majoritário limoneno (89,1 a 95,5%), seguido do sabineno (0,3 a 4,0%) e mirceno (1,4 a 2,0%).

Minh Tu et al. (2002), realizando a extração por prensagem a frio de óleo essencial das cascas de tangerina obtidas no Vietnã, encontraram como componente majoritário limoneno (95,1%), seguido do mirceno (2,0%). Esses dados não estão de acordo com os resultados de Hosni et al. (2010), que observaram a presença de limoneno (92,6%) e  $\gamma$ -terpineno (3,39%).

Quando comparado com dados da literatura, os resultados deste trabalho em relação à constituição química do óleo essencial da casca de tangerina ponkan (*C. reticulata*), estão de acordo com Njoroge et al. (2006) os quais relataram como componentes principais o limoneno (84,8%),  $\gamma$ -terpineno (5,4%) e mirceno (2,2%).

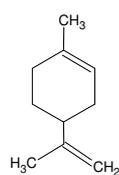
#### **4.2.3 *Citrus limonia***

Os resultados obtidos por CG/EM para o óleo essencial de *C. limonia* estão apresentados na Tabela 3. O cromatograma do óleo essencial de limão-rosa (Figura 3C, APÊNDICE C) apresentou 14 compostos químicos identificados. Analisando os dados da Tabela 3, observou-se que o componente majoritário foi o limoneno (69,42%), seguido do  $\gamma$ -terpineno (9,42%) e  $\beta$ -pineno (7,75%) (Figura 16). O restante dos constituintes identificados obteve valores abaixo de 3%.

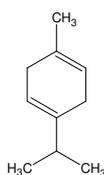
Tabela 3 Constituição química do óleo essencial das cascas de limão-rosa.

	<sup>1</sup> TR	Composto	<sup>2</sup> IR cal	<sup>3</sup> IR lit.	%
1	6,571	$\alpha$ -tujeno	924	930	0,28
2	6,790	$\alpha$ -pineno	931	939	1,25
3	8,040	sabineno	971	975	1,33
4	8,199	$\beta$ -pineno	976	979	7,75
5	8,597	mirceno	988	990	1,31
6	9,817	p-cimeno	1024	1024	1,59
7	10,000	limoneno	1029	1029	69,42
8	10,091	1,8-cineol	1031	1031	2,61
9	11,025	$\gamma$ -terpineno	1057	1059	9,42
10	14,519	citronelal	1152	1153	0,37
11	15,551	terpinen-4-ol	1180	1177	0,71
12	16,097	$\alpha$ -terpineol	1195	1188	1,23
13	24,461	$\alpha$ -trans-bergamotene	1432	1434	0,4
14	26,922	$\beta$ -bisabolene	1507	1505	0,77
Total identificado					98,44%

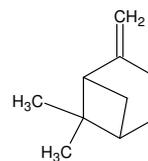
<sup>1</sup>TR = tempo de retenção em minutos fornecido pelo CG/EM, <sup>2</sup>IR cal = índice de Kovats calculado (ADAMS, 2007), <sup>3</sup>IR lit. = índice de retenção da literatura, % = porcentagem do componente.



(a)



(b)



(c)

Figura 16 Estruturas químicas dos componentes majoritários do óleo essencial de *C. sinensis*

(a) limoneno, (b)  $\gamma$ -terpineno (c)  $\beta$ -pineno

Cavalcanti et al. (2004), estudando diferentes óleos essenciais com atividade inseticida, encontraram o limoneno (82%), seguido do  $\beta$ -pineno (6,6%), como componentes principais do óleo essencial das cascas de *C. limonia*. Os resultados obtidos neste trabalho corroboram com Minh Tu et al. (2002), os quais encontraram como componentes principais do óleo essencial das cascas *C. limonia* o limoneno (71,0%),  $\gamma$ -terpineno (11,9%) e  $\beta$ -pineno (3,7%).

#### 4.2.4 *Citrus aurantifolia*

Os resultados obtidos por CG/EM para o óleo essencial de *C. aurantifolia* estão apresentados na Tabela 4. O cromatograma do óleo essencial de limão-taiti (Figura 4C, APÊNDICE C) apresentou 17 compostos químicos identificados. Pelos dados analisados da Tabela 4, observou-se que o componente majoritário foi o limoneno (49,71%), seguido do  $\gamma$ -terpineno (7,91%),  $\beta$ -pineno (7,30%), geranial (4,59%), *p*-cimeno (4,55%) e neral (3,30%) (Figura 17). Todos os outros compostos identificados obtiveram valores abaixo de 3%.

Tabela 4 Constituição química do óleo essencial das cascas de limão-taiti.

	<sup>1</sup> TR	Composto	<sup>2</sup> IR cal	<sup>3</sup> IR lit.	%
1	6,568	$\alpha$ -tujeno	924	930	0,28
2	6,787	$\alpha$ -pineno	931	939	1,09
3	8,038	sabineno	971	975	0,93
4	8,197	$\beta$ -pineno	976	979	7,30
5	8,597	mirceno	988	990	1,02
6	9,813	<i>p</i> -cimeno	1023	1024	4,55
7	9,986	limoneno	1028	1029	49,71

Tabela 4 continua

	<sup>1</sup> TR	Composto	<sup>2</sup> IR cal	<sup>3</sup> IR lit.	%
8	10,084	1,8-cineol	1031	1031	0,56
9	11,020	$\gamma$ -terpineno	1057	1059	7,91
10	12,007	terpinoleno	1084	1088	0,37
11	15,547	terpinen-4-ol	1180	1177	0,94
12	16,097	$\alpha$ -terpineol	1196	1188	2,42
13	17,659	neral	1237	1238	3,30
14	18,737	geranial	1267	1267	4,59
15	24,003	(E)-cariofileno	1418	1419	0,56
16	24,459	$\alpha$ -trans-bergamotene	1432	1434	1,69
17	24,459	$\beta$ -bisabolene	1507	1505	2,94
Total identificado					90,16%

<sup>1</sup>TR = tempo de retenção em minutos fornecido pelo CG/EM , <sup>2</sup>IR cal = índice de Kovats calculado (ADAMS, 2007), <sup>3</sup>IR lit. = índice de retenção da literatura, % = porcentagem do componente.

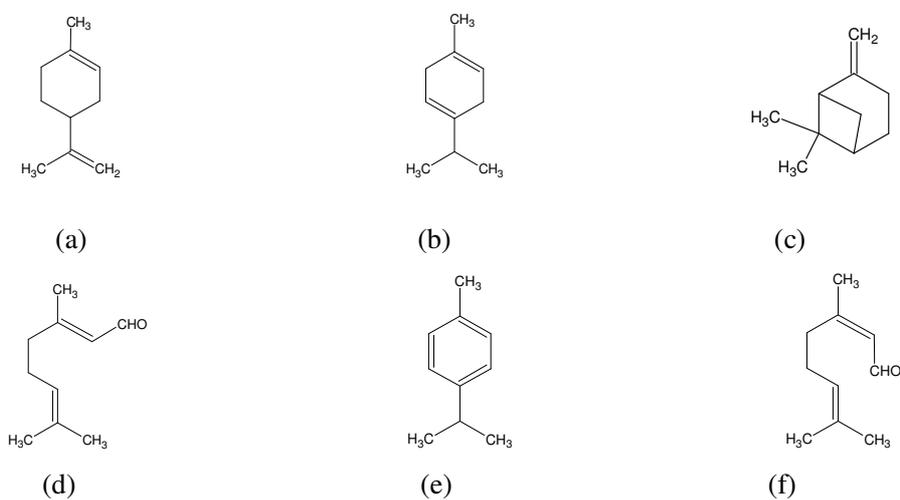


Figura 17 Estruturas químicas dos componentes majoritários do óleo essencial de *C. aurantifolia*

(a) limoneno, (b)  $\gamma$ -terpineno (c)  $\beta$ -pineno (d) geranial (e) *p*-cimeno (f) neral

Choi et al. (2000), avaliando a atividade antioxidante de diversas espécies do gênero *Citrus*, identificaram e quantificaram, por CG/EM, como componentes principais do óleo essencial das cascas do limão-taiti o limoneno (50,5%), seguido do  $\gamma$ -terpineno (17,7%),  $\beta$ -pineno (13,4%),  $\alpha$ -pineno (3,6%) geranial (2,1%) e neral (1,0%). Esses resultados estão de acordo com aqueles relatados por Lota et al. (2002), que encontraram como principais constituintes do óleo essencial das cascas do limão-taiti, obtidos na Estação de Pesquisas Agrônomicas localizado em San Ghjulianu, Córsega, o limoneno (40,4%), seguido do  $\gamma$ -terpineno (17,3%),  $\beta$ -pineno (11,1%), *p*-cimeno (5,3%), geranial (4,0%) e neral (2,3%). Esses resultados confirmam os obtidos no presente trabalho.

#### **4.2.5 *Citrus medica***

Os resultados obtidos por CG/EM para o óleo essencial de *C. medica* estão apresentados na Tabela 5. O cromatograma do óleo essencial de cidra (Figura 5C, APÊNDICE C) apresentou 31 compostos químicos identificados. Pelos dados analisados da Tabela 5, observa-se que o componente majoritário foi o limoneno (39,41%), seguido do  $\gamma$ -terpineno (23,43%), *p*-cimeno (8,96%), geranial (4,76%), neral (3,29%) (Figura 18). O restante dos constituintes identificados obteve valores abaixo de 3%.

Tabela 5 Constituição química do óleo essencial das cascas de cidra.

	<sup>1</sup> TR	Composto	<sup>2</sup> IR cal	<sup>3</sup> IR lit.	%
1	6,560	$\alpha$ -tujeno	924	930	1,05
2	6,786	$\alpha$ -pineno	931	939	2,44
3	8,031	sabineno	970	975	0,31
4	8,194	$\beta$ -pineno	976	979	2,57
5	8,589	mirreno	988	990	1,77
6	9,161	$\alpha$ -felantreno	1005	1002	0,04
7	9,535	$\alpha$ -terpineno	1016	1017	0,46
8	9,842	p-cimeno	1024	1024	8,96
9	10,083	limoneno	1031	1029	39,41
10	10,135	1,8-cineol	1032	1031	0,27
11	10,232	(Z)- $\beta$ -ocimeno	1035	1037	0,71
12	10,604	(E)- $\beta$ -ocimeno	1045	1050	1,01
13	11,097	$\gamma$ -terpineno	1059	1059	23,43
14	12,002	terpinoleno	1084	1088	1,37
15	12,556	Linalol	1099	1096	0,32
16	13,753	cis-óxido de limoneno	1131	1136	0,05
17	14,496	citronelal	1151	1153	0,25
18	15,532	terpinen-4-ol	1179	1177	0,44
19	16,079	$\alpha$ -terpineol	1194	1188	0,63
20	17,150	citronelol	1223	1225	1,07
21	17,248	nerol	1226	1229	0,28
22	17,664	neral	1238	1238	3,29
23	18,101	geraniol	1250	1252	1,61
24	18,750	geranial	1268	1267	4,76
25	19,632	2-undecanona	1292	1294	0,14
26	21,918	neril acetato	1357	1361	0,38

Tabela 5 continua

	<sup>1</sup> TR	Composto	<sup>2</sup> IR cal	<sup>3</sup> IR lit.	%
27	22,601	Geranil acetato	1377	1381	0,74
28	23,990	(E)-cariofileno	1418	1419	0,44
29	24,441	$\alpha$ -trans-bergamotene	1431	1434	0,57
30	26,898	$\beta$ -bisaboleno	1506	1505	0,93
31	45,195	heneicosano	2088	2100	0,04
Total identificado					99,74%

<sup>1</sup>TR = tempo de retenção em minutos fornecido pelo CG/EM, <sup>2</sup>IR cal = índice de Kovats calculado (ADAMS, 2007), <sup>3</sup>IR lit. = índice de retenção da literatura, % = porcentagem do componente.

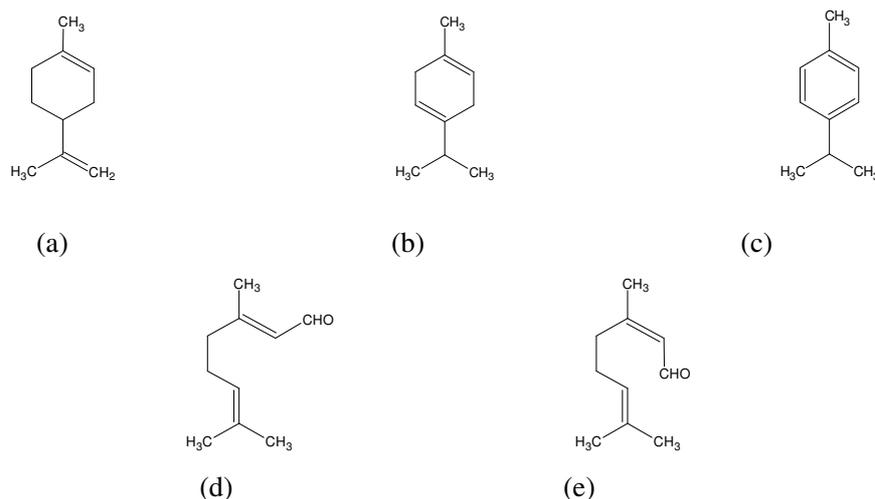


Figura 18 Estruturas químicas dos componentes majoritários do óleo essencial de *C. medica*  
 (a) limoneno, (b)  $\gamma$ -terpineno (c) *p*-cimeno (d) geranial (e) neral

Verzera et al. (2005), pesquisando o óleo essencial das cascas de cidra originária da Calabria, Itália, encontraram valores das concentrações dos constituintes químicos dos óleos essenciais próximos daqueles encontrados no presente trabalho, obtendo como componente majoritário o limoneno (51,95%), seguido do  $\gamma$ -terpineno (27,71%), geranial (2,79%), neral (1,7%).

De acordo com Sawamura (2010), os componentes principais do óleo essencial das cascas de *C. medica* foram o limoneno e  $\gamma$ -terpineno, apresentando uma variação em sua constituição de 55 a 60% e 22 a 24%, respectivamente.

#### 4.2.6 Separação dos constituintes químicos dos óleos essenciais por classes de compostos

Por meio do estudo das caracterizações químicas por cromatografia em fase gasosa acoplada a um espectrômetro de massas (CG-EM), pode-se demonstrar e observar uma grande variedade de compostos nos óleos essenciais das cinco espécies do gênero *Citrus* (Figura 19).

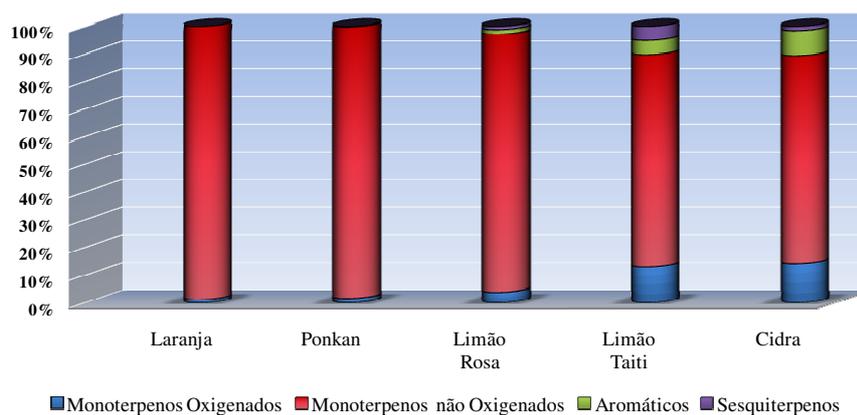


Figura 19 Separação dos constituintes químicos dos óleos essenciais das cinco espécies do gênero *Citrus* por classes de substâncias

Na Figura 19, observa-se a predominância dos monoterpenos não oxigenados em *Citrus sinensis* (95,95%) e *Citrus reticulata* (93,97%). Esses resultados corroboram com aqueles citados por Kırbaslar et al. (2009), que encontraram, aproximadamente para óleo essencial de *C. sinensis*, 94,8%, e para *C. reticulata*, 97,5% de monoterpenos não oxigenados. No óleo essencial de

*Citrus limonia*, houve uma menor quantidade de desses compostos (90,76%); em contrapartida, obtiveram-se uma maior quantidade de monoterpenos oxigenados (4,92%), compostos aromáticos (1,59%) e sesquiterpenos (1,17%), em relação aos óleos essenciais anteriores.

Minh Tu et al. (2002), estudando o óleo essencial de *C. limonia*, constataram a predominância de monoterpenos não oxigenados (91,8%), seguidos de sesquiterpenos (3,6%) e monoterpenos oxigenados (1,8%), valores semelhantes aos obtidos neste trabalho. Os óleos essenciais de *Citrus aurantifolia* e *Citrus medica* apresentaram uma maior quantidade de monoterpenos oxigenados (14,18% e 11,81%), sesquiterpenos (1,54% e 4,63%) e compostos aromáticos (8,96% e 4,55%) em relação aos óleos essenciais anteriores. Lota et al. (2002) verificaram no óleo essencial de *C. aurantifolia* a presença de monoterpenos oxigenados (12,3%), sesquiterpenos (3,6%) e compostos aromáticos (5,3%). Verzera et al. (2005) observaram no óleo essencial de *C. medica* a presença de monoterpenos oxigenados (5,42%), sesquiterpenos (1,34%) e baixa quantidade de compostos aromáticos (< 1%).

#### **4.3 Análise de Componentes Principais (PCA) e Análise de Agrupamento Hierárquico (HCA)**

Em razão da alta complexidade dos óleos essenciais, optou-se por um estudo estatístico das amostras, utilizando a análise de componentes principais (PCA) e análise de agrupamento hierárquico (HCA), com objetivo de elucidar características relacionadas com os resultados das análises cromatográficas, correlacionando e agrupando os dados dos componentes químicos em relação a seus percentuais nos respectivos óleos essenciais.

A PCA mostrou que, com a primeira componente principal e a terceira componente principal, foi possível descrever 95,7% dos dados, sendo 94,3% da variância total descrita pela primeira componente principal.

A análise dos dados químicos pela técnica de PCA permitiu agrupar quimicamente as amostras em três grupos, de modo a expressar e evidenciar suas semelhanças e diferenças (Figura 20, 21 e 22).

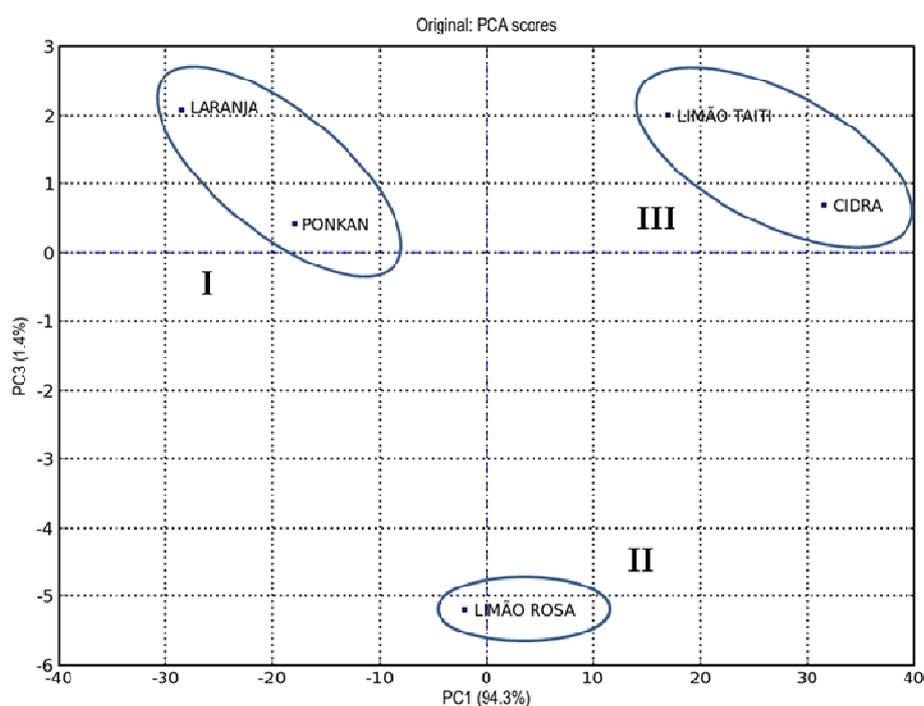


Figura 20 Gráfico bidimensional PC1 x PC3 dos scores para diferentes óleos essenciais de cinco espécies do gênero *Citrus*

A análise do gráfico de escores (Figura 20) mostra a separação das amostras em três grupos, ou seja, grupo I (óleos essenciais de laranja e ponkan); grupo II (óleo essencial de limão-rosa) e grupo III (óleos essenciais de limão-taiti e cidra).

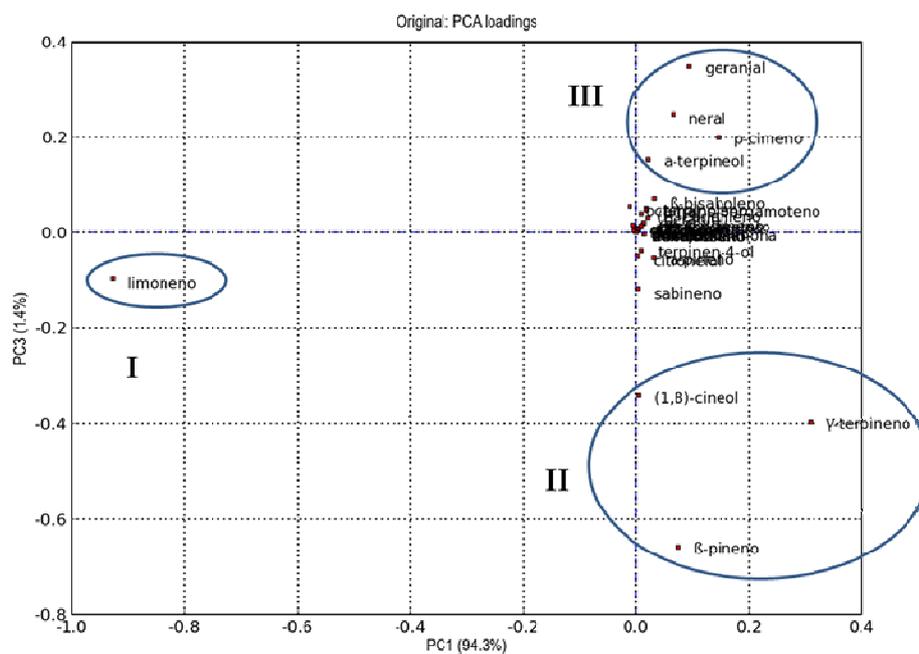


Figura 21 Gráfico bidimensional PC1 x PC3 dos loadings para diferentes óleos essenciais de cinco espécies do gênero de *Citrus*

A análise do gráfico de loadings (Figura 21) mostra a separação dos constituintes das amostras em três grupos, ou seja, grupo I (componente limoneno); grupo II (componentes  $\beta$ -pineno, (1,8)-cineol e  $\gamma$ -terpineno) e grupo III (componentes neral e geranjal (citril),  $\alpha$ -terpineol e p-cimeno).



e  $\beta$ -pineno. Resultados semelhantes foram apresentados por Verzera et al. (2005), que estudaram a composição química dos óleos essenciais das cascas *Citrus medica*, *Citrus meyerii*, *Citrus limon* e dois híbridos (1 e 2) de limão. Esses pesquisadores observaram que a análise dos componentes principais permitiu agrupar quimicamente as amostras dos óleos essenciais em 3 grupos (A, B e C), de modo a expressar e evidenciar suas semelhanças e diferenças. Pode-se perceber neste trabalho que o óleo essencial de *C. medica* foi correlacionado com os componentes  $\alpha$ -terpineno e geranyl acetato (Grupo B), os óleos essenciais de *C. limon* e do híbrido 2 foram correlacionados com os componentes  $\beta$ -pineno e neril acetato (Grupo C) e, por fim, os óleos essenciais de *Citrus meyerii* e do híbrido 1 foram correlacionados com o componente limoneno.

Allegrone et al. (2002), estudando a composição química dos compostos voláteis de sucos de limão de quatro cultivares de *C. limon*, observaram principalmente a presença de monoterpenos, sesquiterpenos e monoterpenos oxigenados (aldeídos, alcoóis e ésteres). Essas cultivares foram obtidas na Itália, região da Sicília e, por meio da análise multivariada, pode-se observar que os componentes voláteis dessas cultivares dividiram-se em três grupos: limoneno (Grupo 1),  $\beta$ -pineno e  $\gamma$ -terpineno (Grupo 2) e acetato de nerila,  $\alpha$ -terpineol e borneol (Grupo 3).

Lota et al. (2002), analisando os constituintes dos óleos essenciais das cascas de 19 cultivares de *C. limon*, verificaram por meio da análise de componentes principais, que essas dividiam-se em três grupos: no primeiro grupo, estavam as espécies que se agrupavam devido à concentração do limoneno; no segundo estavam às espécies que se agrupavam devido à concentração de acetato de linalila e linalol; e no terceiro, estavam as espécies que se agrupavam devido à concentração do  $\beta$ -pineno e  $\gamma$ -terpineno.

O dendograma da figura 23, para os óleos essenciais das cinco espécies do gênero *Citrus* estudadas neste trabalho, corrobora com os resultados previamente discutidos nas figuras 20, 21 e 22. Fica evidente o agrupamento existente entre os óleos essenciais de laranja e pokan (Grupo I), limão-rosa (Grupo 2) e de limão-taiti e cidra (Grupo III). Isso significa que a composição química desses óleos essenciais agrupados comporta-se de maneira semelhante.

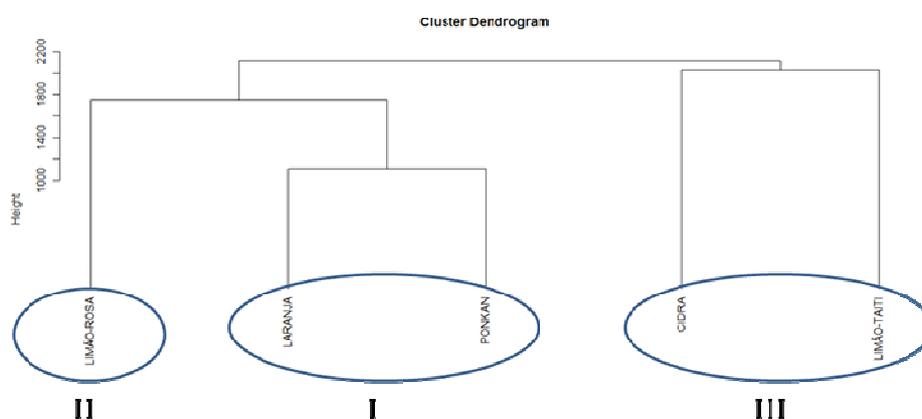


Figura 23 Dendograma das cinco espécies do gênero *Citrus* em relação aos teores dos seus constituintes químicos

#### 4.4 Atividade biológica

##### 4.4.1 Efeito antifúngica dos óleos essenciais de cinco espécies do gênero *Citrus* sobre os fitopatógenos *Fusarium oxysporum*, *Alternaria alternata* e *Colletotrichum musae*

As atividades antifúngicas dos óleos essenciais de *C. sinensis*, *C. reticulata*, *C. limonia*, *C. aurantifolia* e *C. medica* foram estudadas sobre o

crescimento e/ou inibição micelial dos fitopatógenos *F. oxysporum*, *A. alternata* e *C. musae*.

Em relação ao teste de fumigação “in vitro” realizado sobre o fitopatógeno *F. oxysporum*, observou-se por meio da análise de variância que houve diferença significativa ( $P < 0,05$ ) entre os tratamentos (Tabela 2A, APÊNDICE A). Os cinco óleos essenciais apresentaram inibição sobre crescimento micelial do fungo (Figura 24). Essa inibição variou significativamente tanto entre os óleos essenciais quanto para cada óleo, de acordo com as concentrações utilizadas (Scott-Knott 5%) (Tabela 1D, APÊNDICE D).



\*T.A. = Testemunha absoluta; T. R. = Testemunha relativa

Figura 24 Testes de fumigação “in vitro” realizados com cinco óleos essenciais das cascas de cinco espécies do gênero *Citrus*, nas concentrações de 125, 250, 500, 1000 e 2000  $\mu\text{g mL}^{-1}$  sobre o fitopatógeno *F. oxysporum*

A inibição do *F. oxysporum* aumentou com o aumento das concentrações dos óleos essenciais, ou seja, observou-se um efeito-dose dependente, em relação aos tratamentos testados (Figura 25). Observa-se o início da inibição a partir da concentração de  $125 \mu\text{g mL}^{-1}$ , para os óleos essenciais de laranja e cidra e de  $250 \mu\text{g mL}^{-1}$  para os outros óleos essenciais.

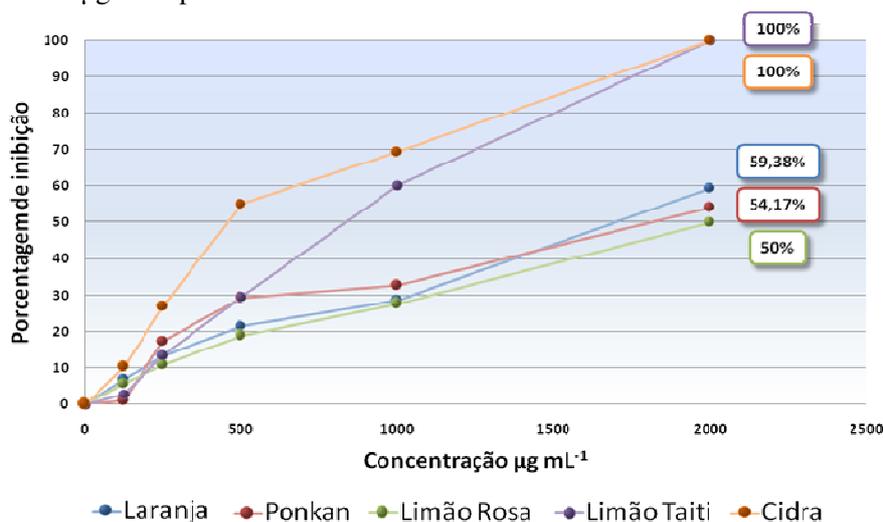
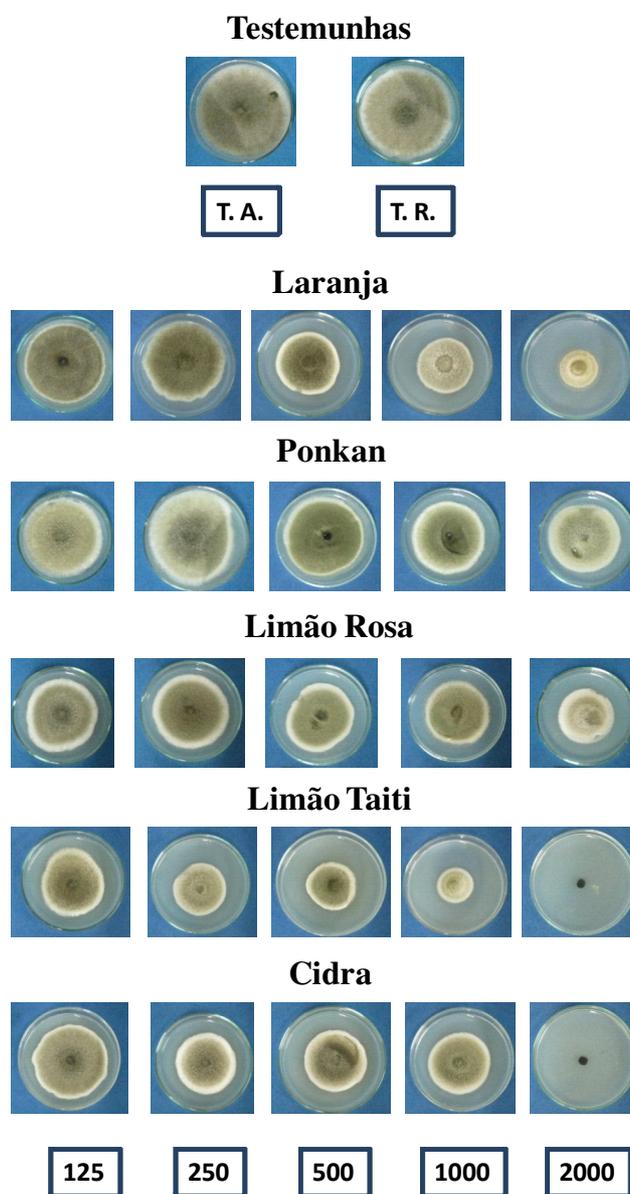


Figura 25 Gráfico da inibição do crescimento micelial do *F. oxysporum* exposto às diferentes concentrações dos cinco óleos essenciais do gênero *Citrus*

Os óleos essenciais de cidra e limão-taiti apresentaram uma inibição total do crescimento micelial na concentração de  $2000 \mu\text{g mL}^{-1}$ , ao passo que os outros óleos essenciais, nessa mesma concentração, apresentaram um efeito inibitório menor. O óleo essencial de laranja (59,38%), seguido dos óleos essenciais de ponkan (54,17%) e limão-rosa (50%), não diferiram estatisticamente. Verificou-se, por meio das equações de regressão dos cinco óleos essenciais (APÊNDICE E), que o  $\text{EC}_{50}$  óleo essencial de cidra foi menor ( $565,9 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), seguido do limão-taiti ( $958,7 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), ponkan ( $1521,6 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), laranja ( $1716,7 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) e limão-rosa ( $2025,4 \mu\text{g mL}^{-1}$ ).

Para o fitopatógeno *Alternaria alternata*, quando se fez o teste de fumigação “in vitro”, observou-se também diferença significativa ( $P < 0,05$ ) entre os tratamentos, de acordo com a análise de variância (Tabela 2A, APÊNDICE A). Todos os cinco óleos essenciais, da mesma forma que para o fungo *F. oxysporum*, apresentaram inibição do crescimento micelial do fungo *A. alternata* (Figura 26). O teste de médias (Scott-Knott 5%) acusou variação na inibição tanto entre os óleos essenciais, como de acordo com as diferentes doses de cada óleo utilizadas (Tabela 2D, APÊNDICE D).



\*T.A. = Testemunha absoluta; T. R. = Testemunha relativa

Figura 26 Testes de fumigação “in vitro” realizados com cinco óleos essenciais das cascas de cinco espécies do gênero *Citrus* nas concentrações de 125, 250, 500, 1000 e 2000  $\mu\text{g mL}^{-1}$  sobre o fitopatógeno *A. alternata*

A inibição do crescimento micelial da *A. alternata* aumentou proporcionalmente com o aumento das concentrações dos óleos essenciais, observando-se também um efeito-dose dependente (Figura 27). Observa-se o início da inibição a partir da concentração de  $125 \mu\text{g mL}^{-1}$  para os óleos essenciais de limão-rosa, limão-taiti e cidra e de  $250 \mu\text{g mL}^{-1}$  para os óleos essenciais de laranja e ponkan.

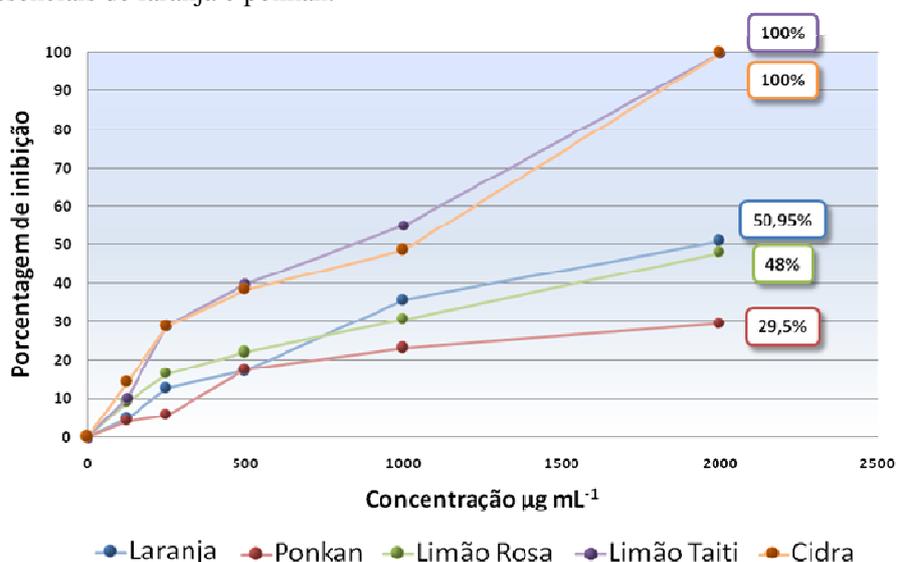


Figura 27 Gráfico da inibição do crescimento micelial do *A. alternata* exposto as diferentes concentrações dos cinco óleos essenciais do gênero *Citrus*

Da mesma forma que ocorreu para o *F. oxysporum*, a inibição total do crescimento micelial as *A. alternata* ocorreu na concentração de  $2000 \mu\text{g mL}^{-1}$ , para os óleos essenciais de cidra e limão-taiti (Figura 27). Os outros óleos essenciais, nessa mesma concentração, apresentaram um efeito inibitório menor. O óleo essencial de laranja (50,95%) e o de limão-rosa (48%) proporcionaram uma maior inibição do que o óleo essencial de ponkan (29,5%), e os primeiros não diferiram estatisticamente. Verificou-se, por meio das equações de regressão

dos cinco óleos essenciais (APÊNDICE E), que o EC<sub>50</sub> do óleo essencial de limão-taiti foi menor (895,3 µg mL<sup>-1</sup>), seguido da cidra (909,9 µg mL<sup>-1</sup>), laranja (1985 µg mL<sup>-1</sup>), limão-rosa (2045,9 µg mL<sup>-1</sup>) e ponkan (3290,5 µg mL<sup>-1</sup>).

Em relação ao teste de fumigação “in vitro” realizado sobre o fitopatógeno *C. musae*, observou-se, por meio da análise de variância, que houve diferença significativa (P<0,05) entre os tratamentos (Tabela 2A, APÊNDICE A). À semelhança da inibição do crescimento micelial do *F. oxysporum* e da *A. alternata*, os cinco óleos essenciais apresentaram inibição no crescimento micelial do fitopatógeno *C. musae*, apresentando diferenças significativas tanto entre os óleos essenciais quanto entre as doses utilizadas (Scott-Knott 5%) (Tabela 3D, APÊNDICE D).

A inibição do fungo *C. musae* aumentou com o aumento das concentrações dos óleos essenciais, ou seja, observou-se também um efeito-dose dependente em relação aos tratamentos testados (Figura 28). Pode-se observar esse resultado a partir da concentração 125 µg mL<sup>-1</sup> para os óleos essenciais de limão-taiti e cidra, e o restante, a partir da concentração 250 µg mL<sup>-1</sup>.

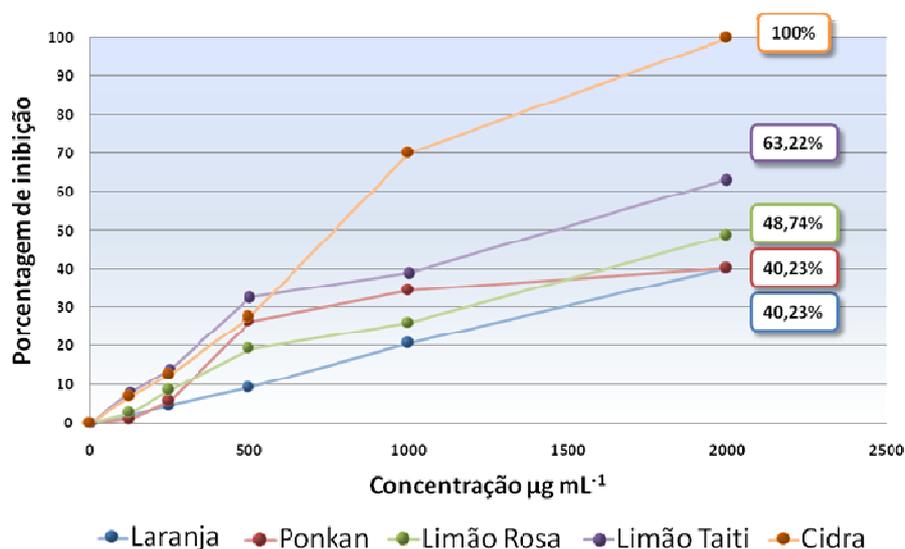


Figura 28 Gráfico da inibição do crescimento micelial do *C. musae* exposto às diferentes concentrações dos cinco óleos essenciais do gênero *Citrus*

Observou-se que o óleo essencial de cidra apresentou uma inibição total do crescimento micelial na concentração de 2000 µg mL<sup>-1</sup>, ao passo que os outros óleos essenciais, nessa mesma concentração, apresentaram um efeito inibitório menor. O óleo essencial de limão-taiti (63,22%) proporcionou uma maior inibição biológica, seguido dos óleos essenciais de limão-rosa (48,74%), pokan (40,23%) e laranja (40,23%). Os três últimos não diferiram estatisticamente. Verificou-se, por meio das equações de regressão dos cinco óleos essenciais (APÊNDICE E), que o EC<sub>50</sub> óleo essencial de cidra foi o menor (914,2 µg mL<sup>-1</sup>), seguido do limão-taiti (1279,3 µg mL<sup>-1</sup>), limão-rosa (2082,6 µg mL<sup>-1</sup>), ponkan (2176,1 µg mL<sup>-1</sup>) e laranja (2518,1 µg mL<sup>-1</sup>).

Os resultados obtidos neste experimento corroboram com os obtidos por alguns autores, tais como Viuda-Martos et al. (2008) que, estudando o efeito do óleo essencial de limão, laranja, toranja e tangerina sobre fungos associados à deterioração de alimentos, verificaram um grande potencial antimicrobiano. O

óleo essencial das cascas de laranja foi o que apresentou maior inibição do crescimento micelial do fungo *Aspergillus Níger*, ao passo que para os patógenos *Aspergillus flavus* e *Penicillium chrysogenum*, os óleos essenciais das cascas de tangerina e toranja foram mais eficazes, respectivamente. Nessa mesma época, estudos semelhantes realizados por Sharman e Tripathi (2008) mostraram a inibição do crescimento micelial do fungo *A. niger*, quando se utilizou o óleo essencial das cascas de laranja. A morfologia do fungo foi avaliada por microscopia eletrônica de varredura e após o tratamento com o óleo essencial, foi relatado que as hifas foram danificadas, ocorrendo em alguns casos sua morte. Avaliando também a atividade fungicida de diversos óleos essenciais de gênero *Citrus*, Kirbaslar et al. (2009) observaram que o óleo essencial de limão apresentou um efeito maior diante da maioria dos patógenos.

Segundo Sharman e Tripathi (2006), o óleo essencial do gênero *Citrus* é uma mistura de compostos voláteis com grande potencial antifúngico, reduzindo ou inibindo totalmente seu crescimento, sendo ele dose-dependente. Os mesmos autores, avaliando o efeito fungitóxico do óleo essencial de *Citrus sinensis* sobre 10 agentes patogênicos pós-colheita, observaram que ele apresentou um amplo espectro de ação sobre todos os micro-organismos testados, obtendo uma concentração mínima inibitória de 400 a 500  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Sridhar et al. (2003), utilizando o mesmo óleo essencial, verificaram também reduções no crescimento micelial de alguns fitopatógenos.

A incidência de patógenos causadores de doenças pós-colheita é um dos principais problemas que prejudica a qualidade e que tem limitado a exportação de frutas brasileiras (COELHO et al., 2010); por isso, a importância da realização de estudos que avaliem o efeito antifúngico de produtos naturais, tais como os óleos essenciais, pelo fato de esses não contaminarem os alimentos tratados e não serem prejudiciais ao ser humano.

Estudando o óleo essencial das cascas de *C. reticulata* obtido pelo método de hidrodestilação, Chutia et al. (2009) encontraram como componentes majoritários os compostos limoneno (46,7%), geranial (19%) e neral (14,5%). Utilizaram-se dois métodos de análise para a avaliação da atividade fungicida do óleo essencial. Os fitopatógenos estudados foram *Alternaria alternata*, *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani*, *Curvularia lunata* e *Helminthosporium oryzae*. O método mais eficiente foi o de fumigação, obtendo valores de inibição do crescimento micelial próximo aos encontrados neste trabalho.

A concentração efetiva para inibição do crescimento micelial em 50% (EC<sub>50</sub>) foi estimada também por Caccioni et al. (1998), que verificando a atividade fungicida dos óleos essenciais das cascas de diversas espécies do gênero *Citrus*, encontraram, de forma semelhante, alguns resultados. Para a espécie *C. sinensis*, observaram que, para as seis cultivares analisadas, os valores do EC<sub>50</sub>, frente ao fungo *Penicillium digitatum*, e os valores das quantidades de monoterpenos oxigenados foram inversamente proporcionais. À medida que diminuía o valor de EC<sub>50</sub>, aumentava a quantidade de monoterpenos oxigenados. Os valores de EC<sub>50</sub> e monoterpenos oxigenados para as seis cultivares foram 2180; 1594; 1496; 1004; 2245; 2389 µg mL<sup>-1</sup> e 1,26%; 2,50%; 1,31%; 3,90%; 0,90%; 1,29% respectivamente. Para os óleos essenciais das três cultivares de *C. limon*, observou-se que à medida que aumentava o teor de citral, aumentava sua eficácia contra o patógeno. Esses resultados corroboram com os deste trabalho, no qual os óleos essenciais mais eficazes foram os óleos essenciais de cidra e limão-taiti, que foram os únicos que continham o citral em sua composição. Outros autores atribuem essa atividade também à presença dos compostos limoneno, linalol e citral (SONBOLI et al., 2006). Entretanto, alguns descrevem que os componentes minoritários têm um importante papel na atividade antimicrobiana do óleo essencial, resultado do sinergismo ou antagonismo deles

com os componentes majoritários (DEBA et al., 2007). Isso pode ser observado neste trabalho, pois o componente limoneno, majoritário em todos os óleos essenciais estudados, teve ação antifúngica menor e, quando combinado com o componente citral, sua ação foi potencializada. A Figura 29 mostra o dendograma dos EC<sub>50</sub> dos cinco óleos essenciais frente aos três fitopatógenos analisados, no qual se confirmam os resultados previamente discutidos, demonstrando o agrupamento existente entre o limão-taiti e a cidra, significando que os dois óleos essenciais apresentam os EC<sub>50</sub> bem próximos.

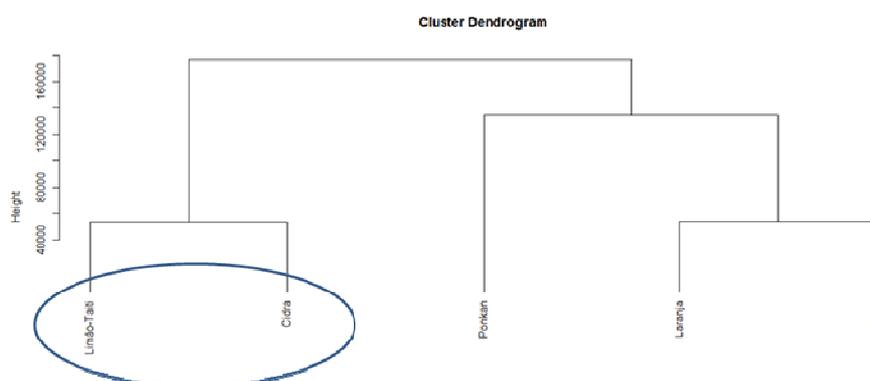


Figura 29 Dendograma dos EC<sub>50</sub> dos óleos essenciais das cascas das cinco espécies do gênero *Citrus*

Belletti et al. (2010) realizaram um trabalho no qual avaliaram os efeitos combinados dos componentes citral, linalol e  $\beta$ -pineno contra *Saccharomyces cerevisiae*, em bebidas cítricas submetidas a um ligeiro tratamento térmico. Observaram a eficácia antimicrobiana da combinação dos compostos químicos e também uma potencialização do efeito quando utilizado o tratamento térmico. Isso ocorreu pelo fato de o aumento da temperatura ter elevado a pressão de vapor das moléculas e conseqüentemente aumentado a capacidade dessas de

solubilizarem na membrana plasmática das leveduras, reforçando, assim, sua bioatividade. Efeitos semelhantes foram descritos por Rivera-Carriles et al. (2005), os quais demonstraram um efeito antimicrobiano sinérgico entre citral e outros compostos fenólicos (vanilina, carvacrol, timol e eugenol).

De acordo com Park et al. (2007), os compostos citronelal, neral e geranial, principais constituintes de *Leptospermum petersonii*, foram os responsáveis pela atividade antifúngica contra os dermatófitos *Mycrosporium canis*, *Mycrosporium gypseum* e *Trycophyton mentagrophytes*. Entretanto, quando o geranial foi testado isoladamente, mostrou-se como constituinte antifúngico mais ativo entre esses compostos, comprovando, assim, a ação antifúngica dos compostos analisados neste trabalho.

Para verificar a atividade antimicrobiana, Neri et al. (2007) selecionaram nove compostos voláteis de plantas: os aldeídos (hexanal, trans-2-hexanal, citral, trans-cinamaldeído e *p*-anisaldeído), os fenóis (carvacrol e eugenol) e as cetonas (nonanone e -(-)carvona), os quais foram testados sobre a germinação de conídeos e crescimento micelial de *Monilinia laxa*. Esses pesquisadores observaram que os compostos que obtiveram os melhores resultados de EC<sub>50</sub> para inibição crescimento micelial foram carvacrol, eugenol, citral e trans-cinamaldeído, respectivamente.

Em relação ao mecanismo de ação dos componentes dos óleos essenciais sobre os micro-organismos, esses estão relacionados, segundo Burt et al. (2004) e Cristani et al. (2007), à parte hidrofílica da molécula que interage com a parte polar da membrana, ao passo que o anel benzênico hidrofóbico e as cadeias laterais alifáticas interagem com a parte hidrofóbica interna da membrana do micro-organismo, tornando-as mais permeáveis, facilitando, assim, o vazamento de íons e outros conteúdos celulares. Similarmente, Omidbeygi et al. (2007) sugerem que os componentes dos óleos essenciais interagem com enzimas e

proteínas da membrana, produzindo um fluxo de prótons para o exterior da célula, provocando alterações nessa e, conseqüentemente, sua morte.

Di Pasqua et al (2007) avaliaram os danos causados à membrana após a exposição da *Salmonella enterica*, *Pseudomonas fluorescense*, *Brochotrix thermosphacta* e *Staphylococcus aureus* a alguns constituintes sintéticos, que são componentes majoritários de alguns óleos essenciais, como limoneno (terpeno), timol, carvacrol e eugenol (compostos fenólicos) e cinamaldeído (aldeído alifático). Segundo o autor, devido ao caráter hidrofóbico dos componentes dos óleos essenciais, a membrana citoplasmática parece ser um local adequado para sua ação, alterando, assim, sua estrutura. A análise de microscopia eletrônica de varredura (MEV) mostrou que os compostos sintéticos utilizados exerceram rapidamente suas atividades antimicrobianas, determinando alterações estruturais na membrana celular. O componente cinamaldeído foi o mais eficaz, alterando a estrutura externa de todas as cepas testadas.

## 5 CONCLUSÕES

O composto majoritário dos óleos essenciais das cinco espécies do gênero *Citrus* foi o limoneno.

Utilizando a análise de componentes principais (PCA) e análise de agrupamento hierárquico (HCA), os óleos essenciais foram classificados em 3 grupos. O primeiro (laranja e ponkan), devido à similaridade dos teores do componente limoneno; o segundo (limão-rosa), pela similaridade quanto ao teor do componente  $\gamma$ -terpineno, (1-8)-cineol e  $\beta$ -pineno; e o terceiro (cidra e limão-taiti) devido à similaridade quanto aos teores dos componentes neral, geranial,  $\alpha$ -terpineol e p-cimeno.

Todos os óleos essenciais apresentaram atividade antifúngica sobre os fitopatógenos *Fusarium oxysporum*, *Alternaria alternata* e *Colletotrichum musae*, sendo os óleos essenciais que apresentaram maior atividade os de cidra e limão-taiti.

Os óleos essenciais de cidra e limão-taiti apresentaram menores EC<sub>50</sub> devido ao sinergismo existente entre os componentes limoneno, neral e geranial.

## REFERÊNCIAS

ADAMS, R. P. **Identification of essential oils components by gas chromatography/mass spectroscopy**. 4th ed. Carol Stream: Allured, 2007. 804 p.

AHMAD, M. M. et al. Genetic variability to essential oil composition of four *Citrus* species. **Pakistan Journal Botany**, Karachi, v. 38, n. 2, p. 319-324, June 2006.

ALLEGRONE, G. et al. Comparison of volatile concentrations in hand-squeezed juices of four different lemon varieties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 54, p. 1844-1848, Mar. 2006.

BAILEY, J. A; JEGUER, M. J. **Colletotrichum: biology, pathology and control**. Wallingford: CAB International, 1992. 388p.

BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 46, n. 2, p. 446-475, Feb. 2008.

BELLETTI, N. et al. Modeling of combined effects of citral, linalool and  $\beta$ -pinene used against *Saccharomyces cerevisiae* in citrus-based beverages subjected to a mild heat treatment. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 136, n. 3, p. 283-289, Jan. 2010.

BIZZO, H. R. et al. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 3, p. 588-594, maio/jun. 2009.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 94, n. 3, p. 223-253, Aug. 2004.

CACCIONI, D. R. L. et al. Relationship between volatile components of citrus fruit essential oils and antimicrobial action on *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum*. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 43, p. 73-79, June 1998.

CARVALHO-FREITAS, M. I. R.; COSTA, M. Anxiolytic and sedative effects of extracts and essential oil from *Citrus aurantium* L. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v. 25, n. 12, p. 1629-1633, Dec. 2002.

CAVALCANTI, E. et al. Larvicidal activity of essential oils from Brazilian plants against *Aedes aegypti* L. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 99, n. 5, Ago. 2004.

CHOI, H. S. et al. Radical-scavenging activities of citrus essential oils and their components: detection using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl. **Journal of Agricultural Food and Chemistry**, Kochi, v. 48, n. 9, p. 4156-4161, Oct. 2000.

CHUTIA, M. et al. Antifungal activity and chemical composition of *Citrus reticulata* Blanco essential oil against phytopathogens from North East India. **LWT-Food Science and Technology**, Zurich, v. 42, n. 3, p. 777-780, Apr. 2009.

COELHO, A. F. S. et al. Controle pós-colheita da antracnose da banana-prata anã tratada com fungicidas e mantida sob refrigeração. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 34, n. 4, p. 1004-1008, jul./ago. 2010.

COLTURATO, A. B. et al. Eficiência e custo do controle químico da mancha de alternaria em tangor murcote. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 35, n. 3, p. 210-215, set. 2009.

CRISTANI, M. et al. Interaction of four monoterpenes contained in essential oils with model membranes: Implications for their antibacterial activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 55, p. 6300-6308, June 2007.

DEBA, F. et al. Chemical composition and antioxidant, antibacterial and antifungal activities of the essential oils from *Bidens pilosa* Linn. Var. Radiata. **Food Control**, Guildfor, v. 19, n. 4, p. 346-352, Apr. 2008.

DEMYTTENAERE, J. C. R.; VANOVERSCHELDE, J.; DE KIMPE, N. Biotransformation of (R)-(+)- and (S)-(-)-citronellol by *Aspergillus* sp. and *Penicillium* sp. and the use of solid phase microextraction for screening. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1027, n. 1-2, p. 137-146, Feb. 2004.

DEWICK, P. M. **Medicinal natural products: a biosynthetic approach**. 2nd ed. Ottawa: J. Wiley, 2002. 507 p.

DI PASQUA, R. et al. Membrane toxicity of antimicrobial compounds from essential oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 55, n. 12, p. 4863-4870, May 2007.

ETHUR, L. Z. et al. Presença dos gêneros *Trichoderma* e *Fusarium* em solo rizosférico e não rizosférico cultivado com tomateiro e pepineiro, em horta e estufa. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 1, p. 19-26, jan./fev. 2008.

FERHAT, M. A. et al. An improved microwave cleverger apparatus for distillation of essential oils from orange peel. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1112, n. 1-2, p. 121-126, Apr. 2006.

FERREIRA, D. F. **Sisvar**: versão 4.2. Lavras: DEX/UFLA, 2003. 79 p.

FERREIRA, M. M. C. Multivariate QSAR. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, Rio de Janeiro, v. 13, n. 6, p. 742-753, Nov./Dec. 2002.

GUIMARÃES, L. G. L. et al. Estudo do efeito fungitóxico do óleo essencial de capim-limão (*Cymbopogon citratus*) sobre *Colletotrichum gloeosporioides*. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 30., 2007, Águas de Lindóia. **Anais... Águas de Lindóia: SBQ**, 2007. p. 1, v. 30.

GUIMARÃES, L. G. L. et al. Influência da luz e da temperatura sobre a oxidação do óleo essencial de capim-limão (*Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf). **Química Nova**, São Paulo, v. 31, n. 6, p. 1476-1480, nov./dez. 2008.

HOSNI, K. et al. Composition of peel essential oils from four selected Tunisian *Citrus* species: Evidence for the genotypic influence. **Food Chemistry**, Reading, v. 123, n. 4, p. 1098-1104, Dec. 2010.

INSTITUTO AGRONÔMICO DE CAMPINAS. **Citros: principais informações e recomendações de cultivo**. Campinas, 2005. Disponível em: < <http://www.iac.sp.gov.br/tecnologias/Citros/Citros.htm> >. Acesso em: 08 jan. 2011.

KIMATI, H. et al. **Manual de fitopatologia**. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. 663 p.

KIRBASLAR, F. G. et al. Antimicrobial activity of Turkish *Citrus* peel oils. **Pakistan Journal of Botany**, Karachi, v. 41, n. 6, p. 3207-3212, Dec. 2009.

LADANIYA, M. S. **Citrus fruit biology, technology and evaluation**. 1<sup>st</sup> ed. San Diego: Academic Press, 2008. 558 p.

LIMA, R. K. et al. Caracterização química e atividade inseticida do óleo essencial de *Ageratum conyzoides* L. sobre a lagarta-docartucho do milho *Spodoptera frugiperda* (Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae). **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 26, n. 1, p. 01-05, jan./fev. 2010.

LIMA, L. C. et al. Controle da antracnose e qualidade de mangas (*Mangifera indica* L.) cv. haden, após tratamento hidrotérmico e armazenamento refrigerado em atmosfera modificada. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 2, p. 298-304, mar./abr. 2007.

LOTA, M. L. et al. Chemical variability of peel and leaf essential oils of 15 species of mandarins. **Biochemical Systematics and Ecology**, Oxford, v. 29, n. 1, p. 77-104, Jan. 2001.

LOTA, M. L. et al. Volatile components of peel and leaf oils of lemon and lime species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 50, n. 4, p. 796-805, Dec. 2002.

MINH TU, N. T et al. Characteristic odour components of *C. inflata* Hort. Ex Tanaka cold pressed peel oil. **Flavor Fragrance Journal**, Vandoeuvre-les-Nancy, v. 18, p. 454-459, Aug. 2003.

MINH TU, N. T et al. Volatile constituents of Vietnamese pummelo, orange, tangerine and lime peel oils. **Flavour and Fragrance Journal**, Vandoeuvre-les-Nancy, v. 17, n. 3, p. 169-174, May/June 2002.

NASCIMENTO, F. R. et al. Efeito do óleo essencial de pimenta longa (*Piper hispidinervum* C. DC) e do emulsificante Tween®80 sobre o crescimento micelial de *Alternaria alternata* (Fungi: Hyphomycetes). **Acta Amazônica**, Manaus, v. 38, n. 3, p. 503-508, jul. 2008.

NERI, F. et al. Fungicidal activity of plant volatile compounds for controlling *Monilinia laxa* in stone fruit. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 91, n. 1, p. 30-35, Jan. 2007.

NETO, J. M. M.; MOITA, G. C. An introduction analysis exploratory multivariate date. **Química Nova**, São Paulo, v. 21, n. 4, p. 467-469, July/Aug. 1998.

NJOROGE, S. et al. Volatile constituents of mandarin (*Citrus reticulata* Blanco) peel oil from Burundi. **Journal of Essential Oil Research**, Carol Stream, v. 18, p. 659-662, Nov./Dec. 2006.

OMIDBEYGI, M. et al. Antifungal activity of thyme, summer savory and clove essential oils against *Aspergillus flavus* in liquid medium and tomato paste. **Food Control**, Guildford, v. 18, n. 12, p. 1518-1523, Dec. 2007.

PALHANO, F. L. et al. Inactivation of *Colletotrichum gloeosporioides* spores by highhydrostatic pressure combined with citral or lemongrass essential oil. **International Journal of Food Microbiology**, Washington, v. 95, n. 1, p. 61-66, Aug. 2004.

PANERO, F. S.; SILVA, H. E. B. Application of exploratory data analysis for the characterization of tubular wells of the North of Brazil. **Microchemical Journal**, Lake Charles, v. 88, n. 2, p. 194-200, Apr. 2008.

PARK, M. J. et al. Antifungal activities of the essential oils in *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. Et Perry and *Leptospermum petersonni* Bailey and their constituents against various dermatophytes. **Journal Microbiology**, Seoul, v. 45, n. 5, p. 460-465, Oct. 2007.

PESSOA, W. R. L. S. et al. Efeito da temperatura e período de molhamento sobre o desenvolvimento de lesões de *Colletotrichum musae* em banana. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 33, n. 2, p. 147-151, abr./jun. 2007.

PIMENTEL, F. A. et al. Ação fungitóxica do óleo essencial de *Tanaecium nocturnum* (Barb. Rodr.) Bur. e K. Shum sobre o *Aspergillus flavus* isolado da castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa*). **Acta Amazônica**, Manaus, v. 40, n. 1, p. 213-220, mar. 2010.

PIMENTEL, F. A. et al. Influência da temperatura de secagem sobre o rendimento e a composição química do óleo essencial de *Tanaecium nocturnum* (Barb. rodr.) Bur. & K. Shum. **Química Nova**, São Paulo, v. 31, n. 3, p. 523-526, fev. 2008.

PONCE, A. G. et al. Natural essential oils as reducing agents of peroxidase activity in leafy vegetables. **LWT-Food Science and Technology**, Zurich, v. 37, n. 2, p. 199-204, Mar. 2004.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R**: a language and environment for statistical computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2010.

RIVERA-CARRILES, K. et al. Synergistic inhibitory effect of citral with selected phenolics against *Zygosaccharomyces bailii*. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 68, n. 3, p. 602-606, Mar. 2005.

SCOTT, A. J.; KNOTT, M. A. A cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. **Biometrics**, Raleigh, v. 30, n. 3, p. 507-512, 1974.

SAWAMURA, M. **Citrus Essential Oils: Flavor and Fragrance**. 1<sup>st</sup> ed. Ottawa: J. Wiley, 2010. 398 p.

SHARMA, N.; TRIPATHI, A. Effects of *Citrus sinensis* (L.) Osbeck epicarp essential oil on growth and morphogenesis of *Aspergillus niger* (L.) Van Tieghem. **Microbiological Research**, Copenhagen, v. 163, n. 3, p. 337-344, May 2008.

SHARMA, N.; TRIPATHI, A. Fungitoxicity of the essential oil of *Citrus sinensis* on post-harvest pathogens. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 22, n. 6, p. 587-593, June 2006.

SILVA, D. M. H.; BASTOS, C. N. Atividade antifúngica de óleos essenciais de espécies de Piper sobre *Crinipellis pernicioso*, *Phytophthora palmivora* e *Phytophthora capsici*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 32, n. 2, p. 143-145, abr. 2007.

SILVA, M. B. et al. Ação antimicrobiana de extratos de plantas medicinais sobre espécies fitopatogênicas de fungos do gênero *Colletotrichum*. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Botucatu, v. 10, n. 3, p. 57-60, set. 2008.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia**: da planta ao medicamento. 6. ed. Porto Alegre: Ed. da UFRGS, 2007. 1104 p.

SONBOLI, A. et al. Antimicrobial activity of six constituents of essential oil from *Salvia*. **Journal of Biosciences**, Karnataka, v. 61, n. 3-4, p. 160-164, Mar. 2006.

SOUZA JÚNIOR, T. I. et al. Efeito fungitóxico de óleos essenciais sobre *Colletotrichum gloeosporioides*, isolado do maracujazeiro amarelo. **Biotemas**, Florianópolis, v. 22, n. 3, p. 77-83, set. 2009.

SRIDHAR, S. R. et al. Antifungal activity of some essential oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 51, n. 26, p. 7596-7599, Nov. 2003.

VERZERA, A. et al. Essential oil composition of *Citrus meyerii* Y. Tan. and *Citrus medica* L. cv. Diamante and their lemon hybrids. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Washington, v. 53, p. 4890-4894, Nov. 2005.

VIEGAS JÚNIOR, C. et al. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 2, p. 326-337, mar./abr. 2006.

VIUDA-MARTOS, M. et al. Antifungal activity of lemon (*Citrus lemon* L.), mandarin (*Citrus reticulata* L.), grapefruit (*Citrus paradisi* L.) and orange (*Citrus sinensis* L.) essential oils. **Food Control**, Guildford, v. 19, n.11 p. 1130-1138, Nov. 2008.

ZACARONI, L. M. et al. Potencial Fungitóxico do óleo essencial de *Piper hispidinervum* (pimenta Longa) sobre os fungos fitopatogênicos *Bipolaris sorokiniana*, *Fusarium oxysporum* e *Colletotrichum gloeosporioides*. **Acta Amazônica**, Manaus, v. 39, n. 1, p. 193-198, mar. 2009.

## APÊNDICE A

Tabela 1A Análise de variância com aplicação do teste de F (1%) para os valores do rendimento e teor de umidade em relação a cinco espécies do gênero *Citrus*

FV	GL	QM <sub>rendimento</sub>	QM <sub>umidade</sub>
Óleos Essenciais	4	1,61**	129,07**
Erro	10	0,02	7,27
C. de variação		10,75%	3,9%
Média Geral		1,51	69,07

\*\*Significativo a 1% pelo teste de F

Tabela 2A Análise de variância com aplicação do teste de F (1%) para os valores da porcentagem da inibição do crescimento micelial do *F. oxysporum*, *A. alternata*, *C. musae* expostos às diferentes concentrações dos óleos essenciais de cinco espécies do gênero *Citrus*

FV	GL	QM <sub><i>F. oxysporum</i></sub>	QM <sub><i>A. alternata</i></sub>	QM <sub><i>C. musae</i></sub>
Óleos Essenciais	4	1979,36**	2432,83**	1526,65**
Concentrações	5	11054,11**	8307,49**	7677,24**
O.E.*Concentrações	20	368,11**	394,78**	359,32**
Erro	60	17,55	28,36	29,47
C. de variação		14,87%	20,18%	24,53%
Média Geral		28,17	26,40	22,14

\*\*Significativo a 1% pelo teste de F

**APÊNDICE B**Tabela 1B Resultados do rendimento e do teor de umidade de cinco espécies do gênero *Citrus*.

Óleo Essencial	Rendimento (%)	Umidade (%)
Laranja	2,21 a	68 b
Tangerina Ponkan	2,08 a	69 b
Limão-Rosa	1,81 a	64 b
Limão-Taiti	0,73 b	64 b
Cidra	0,71 b	80 a

Médias seguidas da mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

## APÊNDICE C

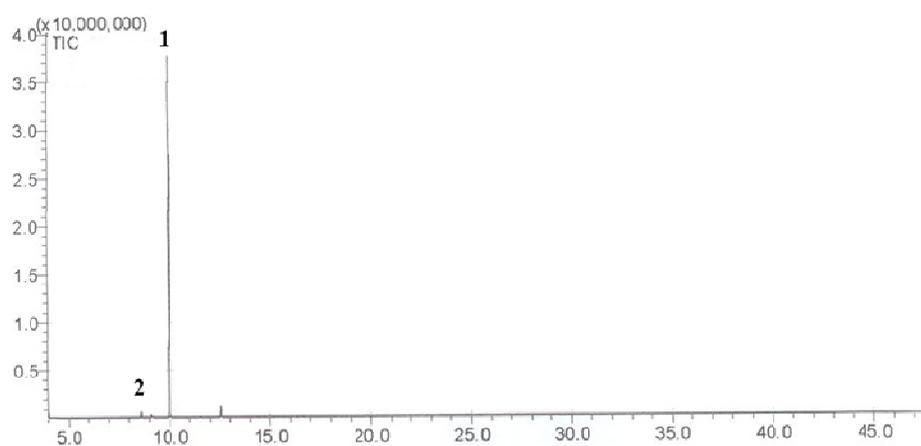


Figura 1C Cromatograma do óleo essencial de laranja (*Citrus sinensis*).  
(1) limoneno, (2) mirceno

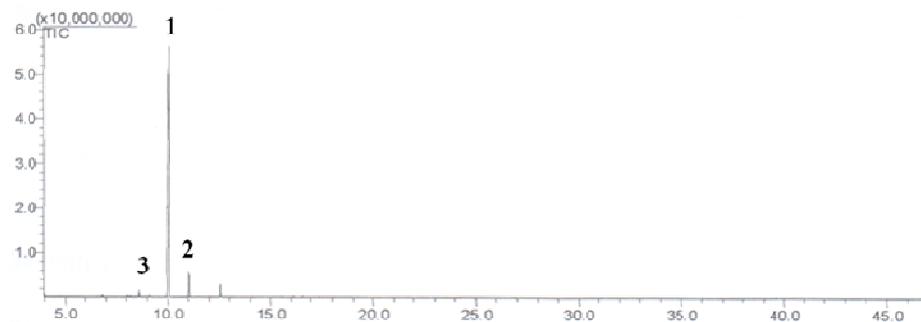


Figura 2C Cromatograma do óleo essencial de tangerina ponkan (*Citrus reticulata*).  
(1) limoneno, (2)  $\gamma$ -terpineno e (3) mirceno

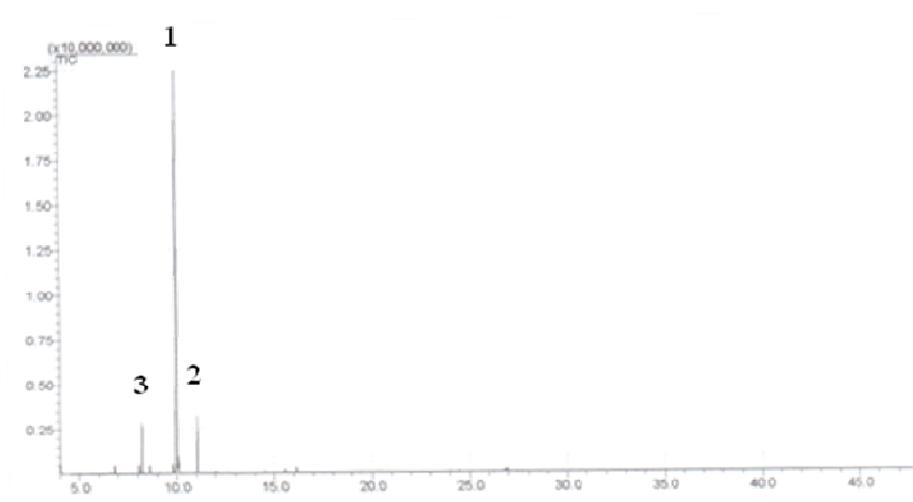


Figura 3C Cromatograma do óleo essencial de limão-rosa (*Citrus limonia*).  
(1) limoneno, (2)  $\gamma$ -terpineno e (3)  $\beta$ -pineno

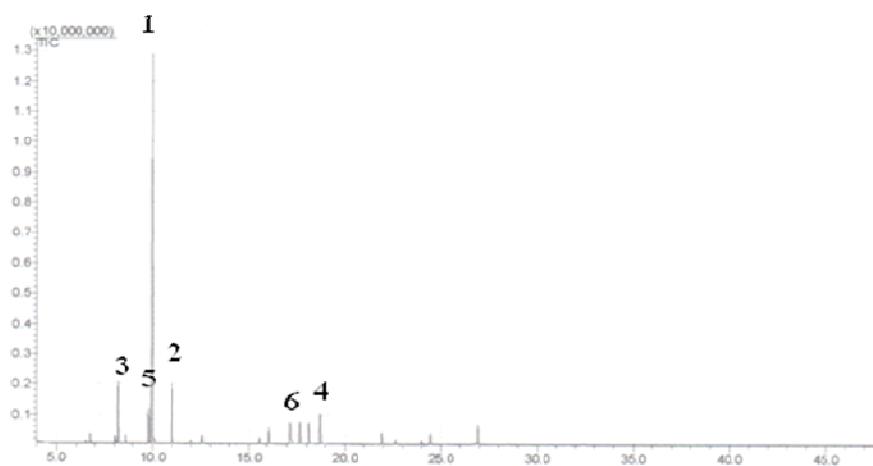


Figura 4C Cromatograma do óleo essencial de limão-taiti (*Citrus aurantifolia*).  
(1) limoneno, (2)  $\gamma$ -terpineno, (3)  $\beta$ -pineno, (4) geranial, (5) p-cimeno e (6) neral

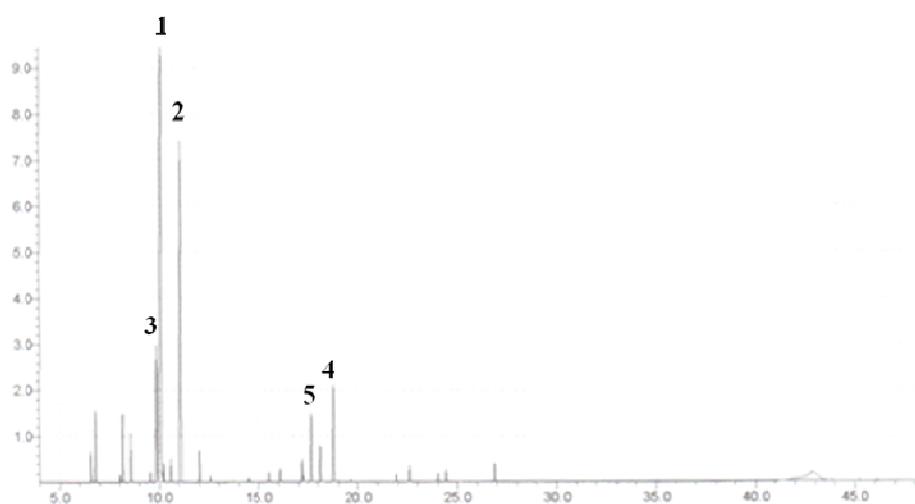


Figura 5C Cromatograma do óleo essencial de cidra (*Citrus medica*).  
(1) limoneno, (2) γ-terpineno, (3) p-cimeno, (4) geranial e (6) neral

## APÊNDICE D

Tabela 1D Porcentagem da inibição do crescimento micelial do *F. oxysporum* exposto às diferentes concentrações dos óleos essenciais de cinco espécies do gênero *Citrus*.

Fungo	Concentração $\mu\text{g mL}^{-1}$	Inibição do crescimento micelial (%)				
		Laranja	Ponkan	L. R.	L. T.	Cidra
<i>Fusarium Oxysporum</i>	T.A.	0 Ae	0 Ad	0 Ae	0 Ae	0 Af
	125	6,9 Ad	1 Ad	5,6 Ae	2,9 Ae	10,4 Ae
	250	13,3 Bd	17,3 Bc	10,8 Bd	13,5 Bd	26,9 Ad
	500	21,5 Cc	29,4 Bb	18,9 Cc	29,6 Bc	55 Ac
	1000	28,5 Cb	32,7 Cb	27,7 Cb	60,2 Bb	69,4 Ab
	2000	59,4 Ba	54,2 Ca	50 Ca	100 Aa	100 Aa

T.A. =Testemunha Absoluta; L. R.= Limão-Rosa; L. T. =Limão-Taiti

Médias seguidas da mesma letra, sendo a minúscula na coluna e a maiúscula na linha, não diferem significativamente entre si a 5% de probabilidade, pelo teste de Scott-Knott.

Tabela 2D Porcentagem da inibição do crescimento micelial do *A. alternata* exposto às diferentes concentrações dos óleos essenciais de cinco espécies do gênero *Citrus*.

Fungo	Concentração $\mu\text{g mL}^{-1}$	Inibição do crescimento micelial (%)				
		Laranja	Ponkan	L. R.	L. T.	Cidra
<i>Alternaria alternata</i>	T.A.	0 Ad	0 Ac	0 Ae	0 Af	0 Af
	125	4,8 Ad	4,2 Ac	9,2 Ad	10,3 Ae	14,3 Ae
	250	12,6 Bc	5,7 Cc	16,4 Bc	29,1 Ad	28,8 Ad
	500	17,3 Bc	17,5 Bb	22,1 Bc	39,8 Ac	38,3 Ac
	1000	35,6 Bb	23,2 Cb	30,5 Bb	55,2 Ab	48,6 Ab
	2000	50,9 Ba	29,5 Ca	48 Ba	100 Aa	100 Aa

\*T.A. =Testemunha Absoluta; L. R.= Limão-Rosa; L. T. =Limão-Taiti

Médias seguidas da mesma letra, sendo a minúscula na coluna e a maiúscula na linha, não diferem significativamente entre si a 5% de probabilidade, pelo teste de Scott-Knott.

Tabela 3D Porcentagem da inibição do crescimento micelial do *C. musae* exposto às diferentes concentrações dos óleos essenciais de cinco espécies do gênero *Citrus*.

Fungo	Concentração $\mu\text{g mL}^{-1}$	Inibição do crescimento micelial (%)				
		Laranja	Ponkan	L. R.	L. T.	Cidra
<i>Colletotrichum musae</i>	T.A.	0 Ac	0Ac	0 Ad	0 Ad	0 Ae
	125	2,1 Ac	1,1 Ac	2,8 Ad	8 Ac	6,9 Ad
	250	4,6 Ac	5,7 Ac	8,5 Ad	13,8 Ac	12,6 Ad
	500	9,2 Cc	26,4 Ab	19,3 Bc	32,6 Ab	27,6 Ac
	1000	20,7 Cb	34,5 Ba	26 Cb	39,1 Bb	70,1 Ab
	2000	40,2 Ca	40,2 Ca	48,7 Ca	63,2 Ba	100 Aa

\*T.A. =Testemunha Absoluta; L. R. =Limão-Rosa; L. T.= Limão-Taiti;

Médias seguidas da mesma letra, sendo a minúscula na coluna e a maiúscula na linha, não diferem significativamente entre si a 5% de probabilidade, pelo teste de Scott-Knott.

## APÊNDICE E

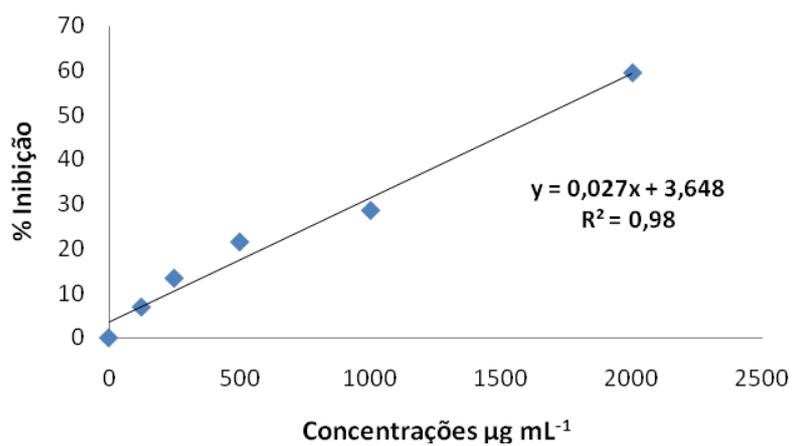


Figura 1E Atividade antifúngica do óleo essencial de laranja sobre a inibição do crescimento micelial do fungo *Fusarium oxysporum*

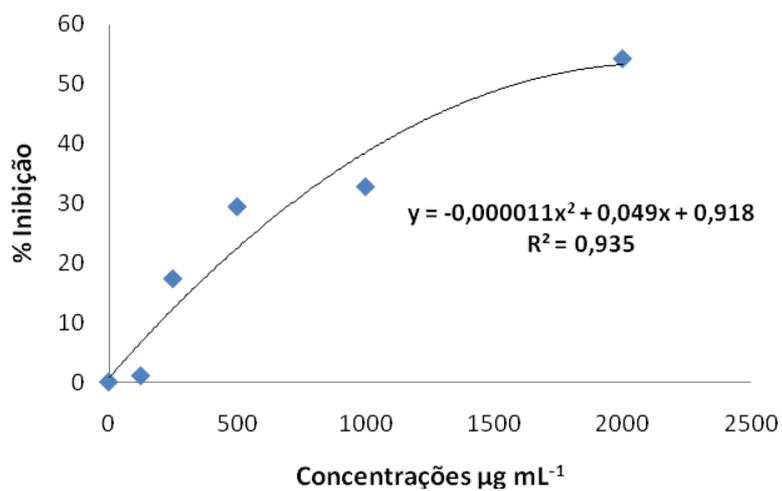


Figura 2E Atividade antifúngica do óleo essencial de ponkan sobre a inibição do crescimento micelial do fungo *F.oxysporum*

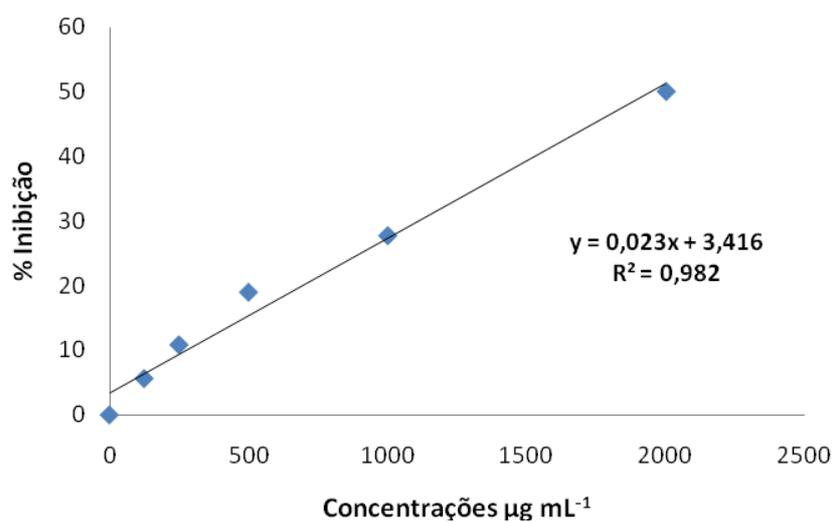


Figura 3E Atividade antifúngica do óleo essencial de limão-rosa sobre a inibição do crescimento micelial do fungo *F.oxysporum*

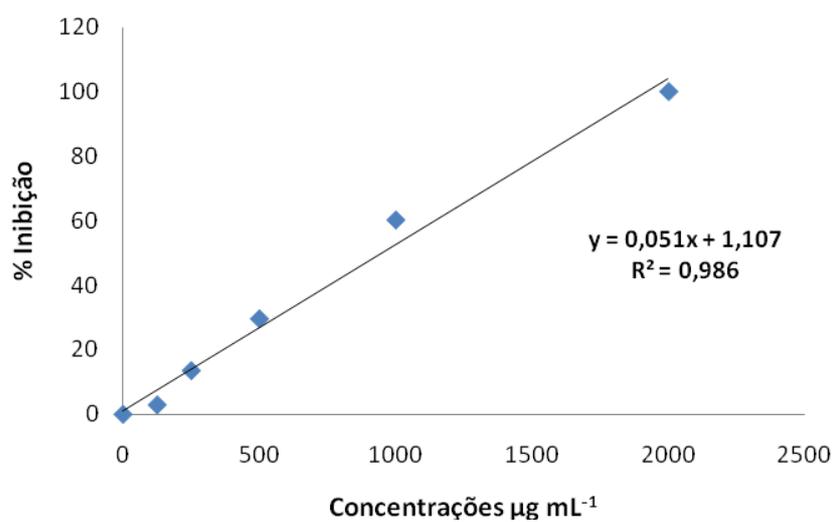


Figura 4E Atividade antifúngica do óleo essencial de limão-taiti sobre a inibição do crescimento micelial do fungo *F.oxysporum*

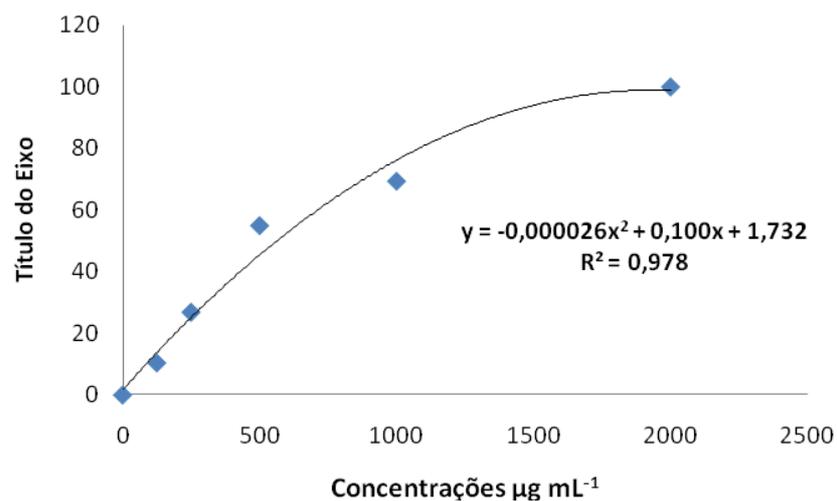


Figura 5E Atividade antifúngica do óleo essencial de cidra sobre a inibição do crescimento micelial do fungo *F.oxysporum*

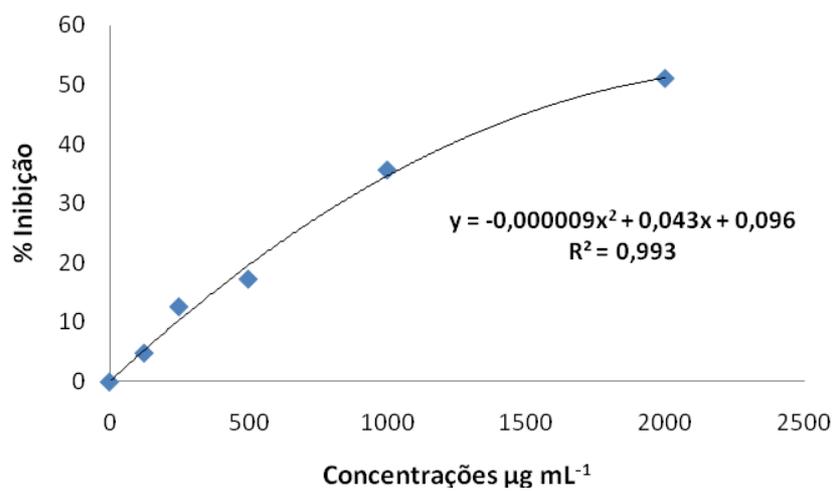


Figura 6E Atividade antifúngica do óleo essencial de laranja sobre a inibição do crescimento micelial do fungo *Alternaria alternata*

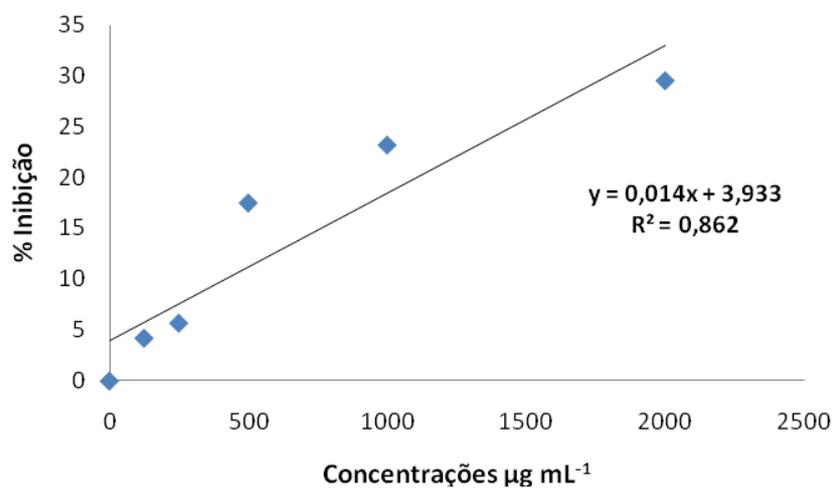


Figura 7E Atividade antifúngica do óleo essencial de ponkan sobre a inibição do crescimento micelial do fungo *A. alternata*

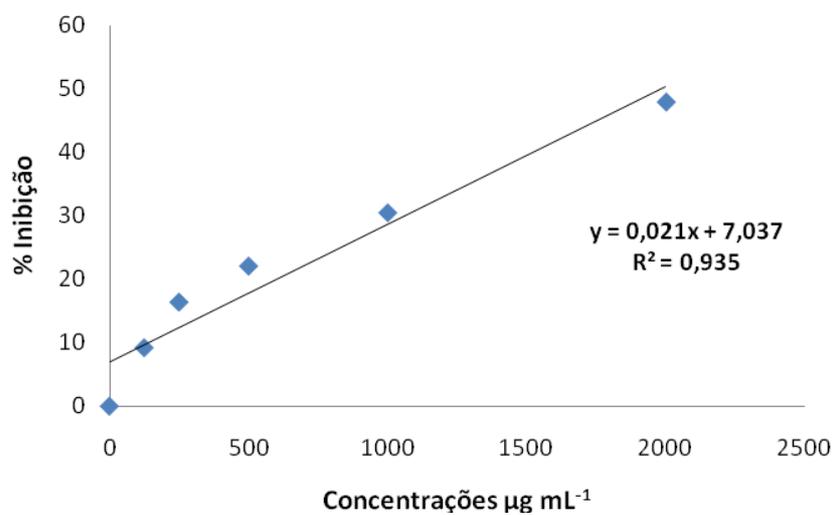


Figura 8E Atividade antifúngica do óleo essencial de limão-rosa sobre a inibição do crescimento micelial do fungo *A. alternata*

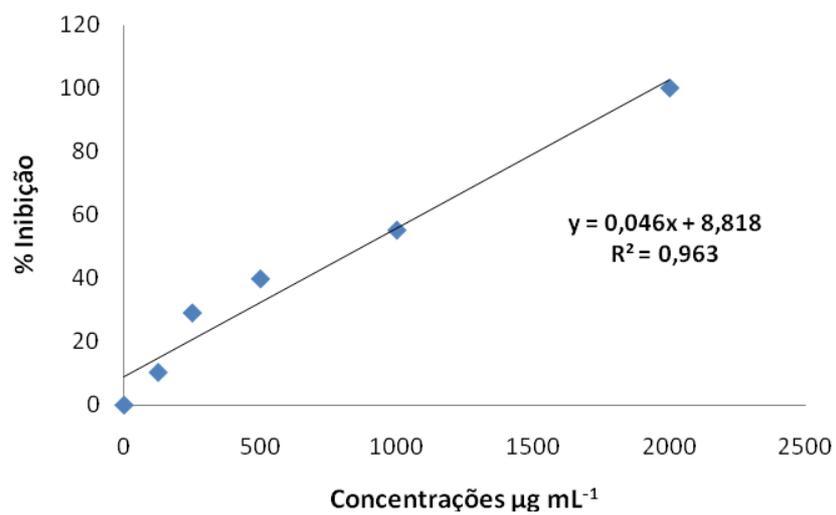


Figura 9E Atividade antifúngica do óleo essencial de limão-taiti sobre a inibição do crescimento micelial do fungo *A. alternata*

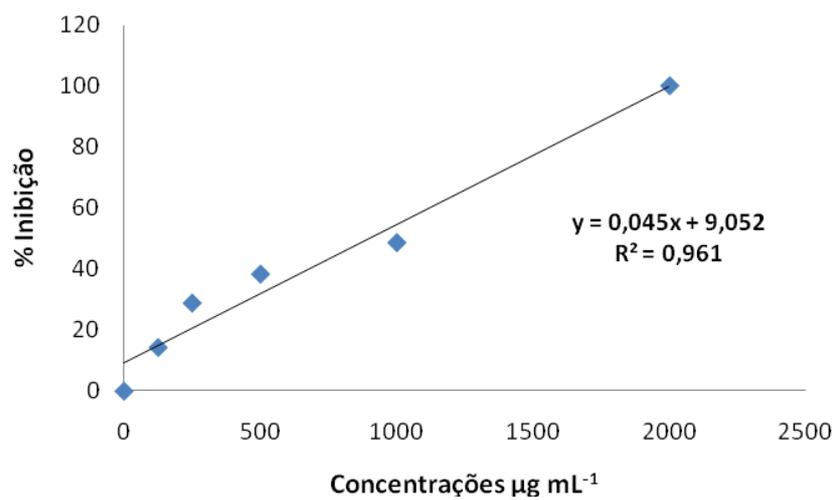


Figura 10E Atividade antifúngica do óleo essencial de cidra sobre a inibição do crescimento micelial do fungo *A. alternata*

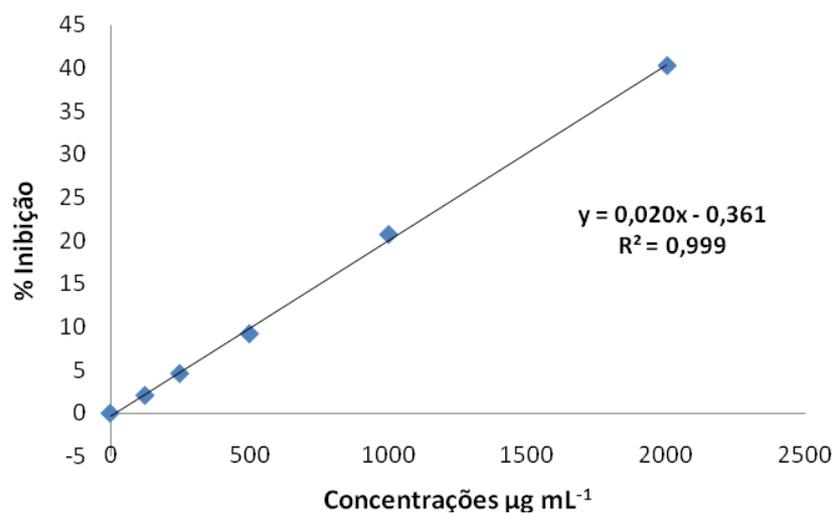


Figura 11E Atividade antifúngica do óleo essencial de laranja sobre a inibição do crescimento micelial do fungo *Colletotrichum musae*

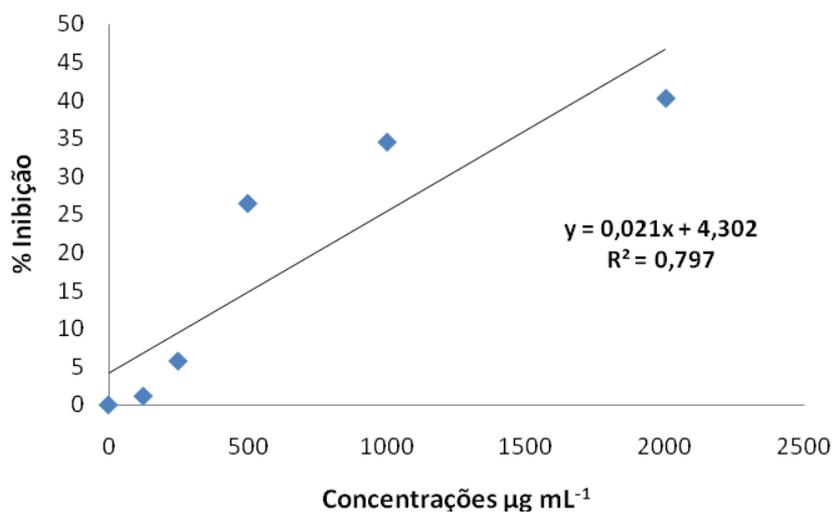


Figura 12E Atividade antifúngica do óleo essencial de ponkan sobre a inibição do crescimento micelial do fungo *C.musae*

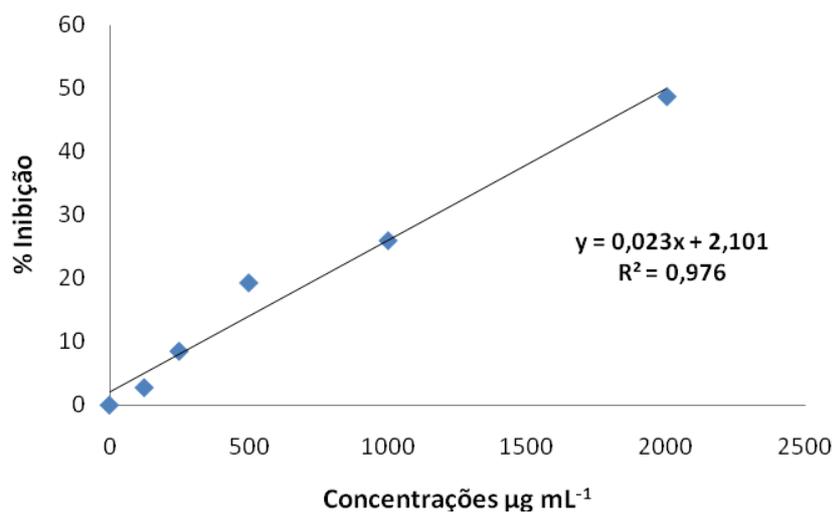


Figura 13E Atividade antifúngica do óleo essencial de limão-rosa sobre a inibição do crescimento micelial do fungo *C.musae*

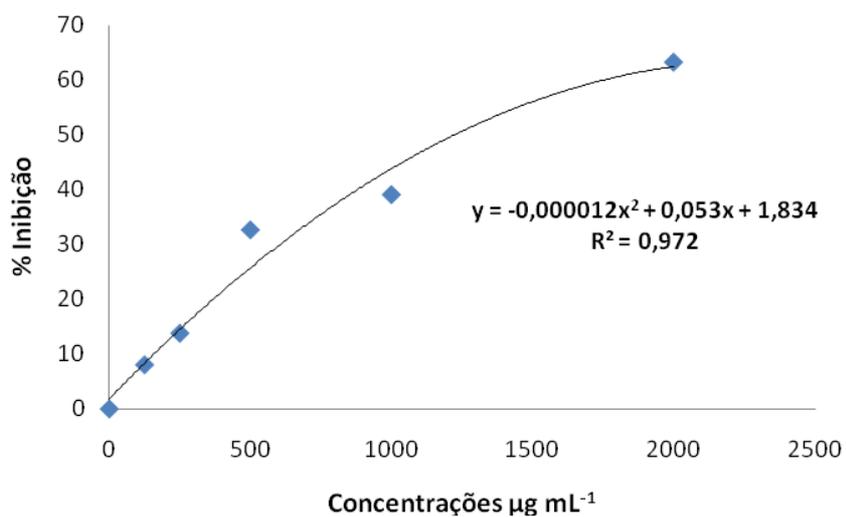


Figura 14E Atividade antifúngica do óleo essencial de limão-taiti sobre a inibição do crescimento micelial do fungo *C.musae*

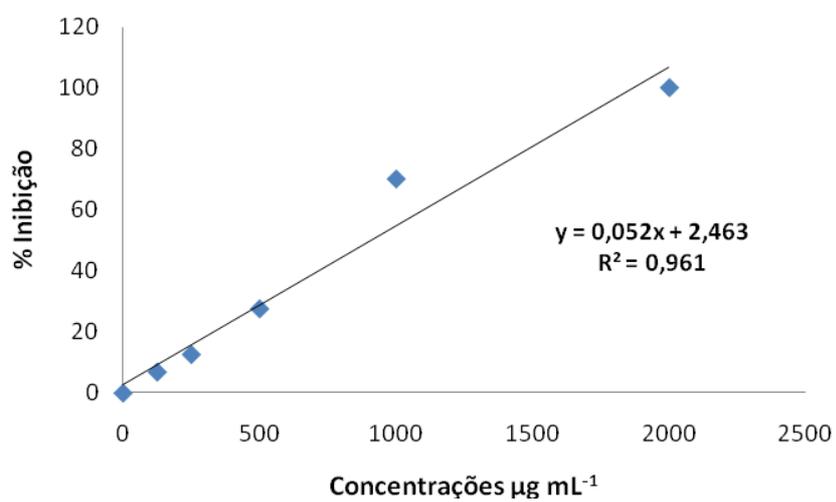


Figura 15E Atividade antifúngica do óleo essencial de cidra sobre a inibição do crescimento micelial do fungo *C.musae*