

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA PROGRAMA DE  
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA PARA RECURSOS  
AMAZÔNICOS (PPGCTRA)

**Economia circular aplicada aos resíduos dos frutos de *Citrus*  
*sinensis* (L.)**

MAYANNA EMÍLIA TENÓRIO VICENTE

ITACOATIARA – AM

2023

MAYANNA EMÍLIA TENÓRIO VICENTE

**Economia circular aplicada aos resíduos dos frutos de *Citrus  
sinensis* (L.)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia para Recursos Amazônicos, da Universidade Federal do Amazonas, ICET/Itacoatiara, como requisito para obtenção do título de Mestre. Área: Prospecção química e biológica.

**Orientador:** Prof. Dr. Paulo José de Sousa Maia

**Coorientadora:** Dominique Fernandes de Moura do Carmo

ITACOATIARA – AM

2023

## Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

V632e Vicente , Mayanna Emília Tenório  
Economia circular aplicada aos resíduos dos frutos de Citrus  
sinensis (L.) / Mayanna Emília Tenório Vicente . 2023  
72 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Paulo José de Sousa Maia  
Coorientadora: Dominique Fernandes de Moura do Carmo  
Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia para Recursos  
Amazônicos) - Universidade Federal do Amazonas.

1. economia circular. 2. acetilcolinesterase. 3. bioatividade. 4.  
citrus sinensis (L). 5. alelopatia. I. Maia, Paulo José de Sousa. II.  
Universidade Federal do Amazonas III. Título

## AGRADECIMENTO

Ao meu Deus, pela oportunidade de viver e poder realizar meus sonhos.

Aos meus pais, Manuel Vicente Neto e Tereza Emília da Costa Tenório que depositam e me proporcionam todo amor e incentivo, minha irmã, Manuele Francisca Tenório Vicente pelos afagos de alegria.

A minha coorientadora, a professora Dra. Dominique Fernandes de Moura do Carmo, por todo o apoio, desenvolvimento, excelência, humanidade e saber no progresso desse trabalho.

Ao meu orientador, o professor Dr. Paulo José de Sousa Maia por toda sua atenção, seu compromisso com a ciência, educação e pesquisa, seus ensinamentos e sua afetuosidade proeminente em quem ama ensinar.

Ao meu professor Dr. Nazareno de Pina Braga, colega de profissão, motivador em vários momentos de minha vida acadêmica.

Ao professor Dr. Geraldo José Nascimento de Vasconcelos, pelos ensinamentos e contribuição nesse trabalho.

A professora Dra. Maiara de Souza Nunes Ávila, pela contribuição, inclinação e ensinamento nesse trabalho.

A Professora Dra. Jaqueline de Araújo Bezerra, pela disponibilidade, parceria, ensinamento e recepção para com esse trabalho.

Ao amigo de laboratório, Josias Martins dos Anjos Cruz, pelo amparo nas atividades laboratoriais.

Ao amigo, Técnico de Laboratório do Departamento de Engenharia Química Samuel Rosa pelo auxílio no desenvolvimento dos experimentos.

A todos os amigos de caminhada, da graduação a pós-graduação, em especial Aniele Neves, Eberlanny Rolim e Jackline de Nazaré, amizades verdadeiras que levo no meu coração.

A CAPES/FAPEAM pelo investimento e incentivo a pesquisa.

A todos os professores que passam por minha vida, com toda ternura, amorosidade, dedicação, inspiração, resiliência e deixam um pouco de si em mim.

Meus sinceros agradecimentos!

Muito Obrigada!

*“Se você quiser ter boas ideias, você deve ter muitas ideias. A maioria delas estará errada e o que você tem que aprender é quais jogar fora.” Linus Pauling*

## Resumo

A economia circular é chave para o tratamento de resíduos, a exemplo tem-se a transformação dos resíduos da indústria do suco de laranja (*Citrus sinensis*) em produtos de primeira linha. A transformação dos resíduos das cascas da laranja em óleo essencial, impulsiona a bioeconomia. O objetivo foi avaliar o potencial inibitório *in vitro* e *in silico* frente a enzima acetilcolinesterase (AChE), investigar o efeito antimicrobiano, testar o efeito alelopático no feijão manteiguinha, analisar a atividade antioxidante e bioatividade inseticida por fumigação do óleo essencial das cascas de *C. sinensis* (L.). O óleo essencial (OE), foi extraído por hidrodestilação em aparato de Clevenger e analisado por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG-EM). Na ação antimicrobiana foi utilizada a técnica de difusão em ágar, frente as cepas; *Escherichia coli* (ATC25922), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Candida albicans* (ATCC 10231), *Mycobacterium smegmatis* (ATCC 14468), o teste do efeito alelopático utilizou a aplicação do tratamento por contato no feijão, a atividade antioxidante foi mensurada através dos testes de ABTS•+ e DPPH, a análise da bioatividade inseticida por fumigação foi testada em adultos de *Sitophilus oryzae*, e como padrão o limoneno, com pureza  $\geq 95\%$ , as leituras de mortalidade foram realizadas após 24, 48 e 72 horas. No CG-EM foram identificados 33 constituintes da classe dos monoterpenos e sesquiterpenos, destacando-se como majoritários;  $\beta$ -Citroneleno (7,33%),  $\beta$ -Pinoeno (9,63%), Car-3-en-2-one (8,43%), Eugenol (4,24%), Limoneno-10-ol (8,26%),  $\alpha$ -Humuleno (10,52%),  $\alpha$ -neo-Clovene (4,83%) e  $\beta$ -Acoradieno (12,47%). Para ação antimicrobiana, o OE apresentou potencial inibitório entre baixo (+) e moderado (++) . No ensaio alelopático, observou-se para a dosagem T4, 500 $\mu$ L de OE, mudanças entre o índice de crescimento radicular e a velocidade de germinação das sementes do feijão. No teste de capacidade antioxidante ABTS•+, o OE demonstrou IC<sub>50</sub> de 0,951  $\pm$  0,045 ( $\mu$ mol ET/mL), no método DPPH, o OE não exibiu atividade antioxidante. No ensaio de fumigação com o OE, a taxa de mortalidade corrigida foi de 6,7%, não houve significância na CL<sub>25</sub> % e para as maiores dosagens ocorreu o fenômeno da hormoligose, o padrão limoneno apresentou, taxa de mortalidade corrigida de 6,4 e 14,9% e CL<sub>25%</sub> de 19,75%, ambos no tempo de 48h. No teste anticolinesterásico *in vitro*, o óleo essencial mostrou um valor de concentração inibitória de CI<sub>50</sub> = 72  $\mu$ g/mL, tal resultado foi corroborado com o teste anticolinesterásico *in silico* onde foi possível observar a inibição da enzima acetilcolinesterase pelos constituintes  $\beta$ -citroneleno, limoneno,  $\beta$ -acoradieno e  $\alpha$ -humuleno, para o resultado *in silico* os valores de energia de ligação variaram entre -6,2 e -9,6 kcal/mol, valores próximos ao inibidor galantamina (energia de ligação do *redocking* = -9,8 kcal/mol, RMSD 0,3678 Å). Os resultados obtidos sugerem que o OE proveniente das cascas de laranjas da região Amazônica, possui a capacidade de inibir a enzima acetilcolinesterase, tais achados além de explorar e elucidar a aplicação biológica desse óleo, incentivam a adoção da economia circular, aproveitando os resíduos provenientes da indústria de sucos. Não apenas contribuindo para minimizar o desperdício, mas também agrega valor ao produto final, impulsionando o interesse em seu uso nas áreas da agricultura e medicina.

**Palavras chaves:** economia circular, alelopatia, fumigação, bioatividade, *citrus sinensis* (L), acetilcolinesterase.

## Abstract

The circular economy is key to waste treatment, for example, the transformation of waste from the orange juice (*Citrus sinensis*) industry into first-rate products. The transformation of orange peel residues into essential oil boosts the bioeconomy. The objective was to evaluate the in vitro and in silico inhibitory potential against the enzyme acetylcholinesterase (AChE), investigate the antimicrobial effect, test the allelopathic effect on butter beans, analyze the antioxidant activity and insecticidal bioactivity by fumigation of the essential oil from *C. sinensis* (L.). The essential oil (EO) was extracted by hydrodistillation in a Cleveng apparatus and analyzed by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS). For antimicrobial action, the agar diffusion technique was used against the strains; *Escherichia coli* (ATC25922), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Candida albicans* (ATCC 10231), *Mycobacterium smegmatis* (ATCC 14468), the allelopathic effect test used the application of contact treatment on beans, the antioxidant activity was measured through the tests of ABTS•+ and DPPH, the analysis of insecticidal bioactivity by fumigation was tested on adults of *Sitophilus oryzae*, and limonene as standard, with purity  $\geq 95\%$ , mortality readings were taken after 24, 48 and 72 hours. In CG-ME, 33 constituents from the class of monoterpenes and sesquiterpenes were identified, standing out as the majority;  $\beta$ -Citronelene (7.33%),  $\beta$ -Pinene (9.63%), Car-3-en-2-one (8.43%), Eugenol (4.24%), Limonene-10-ol (8.26%),  $\alpha$ -Humulene (10.52%),  $\alpha$ -neo-Cllovene (4.83%) and  $\beta$ -Acoradiene (12.47%). For antimicrobial action, EO showed inhibitory potential between low (+) and moderate (++) in the allelopathic test, changes were observed for the T4 dosage, 500 $\mu$ L of EO, between the root growth index and the germination speed of the bean seeds. In the ABTS•+ antioxidant capacity test, the EO demonstrated an IC<sub>50</sub> of  $0.951 \pm 0.045$  ( $\mu$ mol ET/mL), in the DPPH method, the EO did not exhibit antioxidant activity. In the fumigation test with EO, the corrected mortality rate was 6.7%, there was no significance in LC<sub>25</sub>% and for the highest dosages the phenomenon of hormoligosis occurred, the limonene standard presented a corrected mortality rate of 6.4 and 14.9% and CL<sub>25</sub>% of 19.75%, both within 48 hours. In the in vitro anticholinesterase test, the essential oil showed an inhibitory concentration value of IC<sub>50</sub> = 72  $\mu$ g/mL, this result was corroborated with the in silico anticholinesterase test where it was possible to observe the inhibition of the acetylcholinesterase enzyme by the constituents  $\beta$ -citronelene, limonene,  $\beta$ -acoradiene and  $\alpha$ -humulene, for the in silico result the binding energy values varied between -6.2 and -9.6 kcal/mol, values close to the galantamine inhibitor (redocking binding energy = -9.8 kcal/mol, RMSD 0.3678 Å). The results obtained suggest that EO from orange peels from the Amazon region has the ability to inhibit the enzyme acetylcholinesterase. These findings, in addition to exploring and elucidating the biological application of this oil, encourage the adoption of the circular economy, taking advantage of waste from juice industry. Not only contributing to minimizing waste, but also adding value to the final product, driving interest in its use in the areas of agriculture and medicine.

**Keywords:** circular economy, allelopathy, fumigation, bioactivity, *citrus sinensis* (L), acetylcholinesterase.

## LISTA DE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| Figura 1. Modelo de transição da economia linear para a circular. ....  | 16 |
| Figura 2. Componente da estrutura da laranja <i>Citrus sinensis</i> . ....  | 17 |
| Figura 3. Produção do fruto de laranja safra 2021, processamento da indústria do suco e quantitativo de resíduo 2021.....   | 18 |
| Figura 4. Produção de óleos essenciais no Brasil, divisão por CNAE. ....  | 19 |
| Figura 5. Constituintes majoritários encontrados no OE de <i>Citrus sinensis</i> , dentre os 33 constituintes identificados. ....   | 35 |
| Figura 6. Método de antibiose por difusão em ágar: (A) <i>C. albicans</i> ATCC 10231; (B) <i>M. smegmatis</i> ATCC 14468, Ensaio antimicrobiano da amostra: (C) <i>E. faecalis</i> ATCC 29212; (D) <i>E. coli</i> ATCC 25922.....   | 37 |
| Figura 7. Ilustração do óleo essencial adentrando as membranas bacterianas gram-positiva e gram-negativa. ....  | 38 |
| Figura 8. Método de antibiose por difusão em ágar, ensaio antimicrobiano frente as bactérias indicadoras: (A) <i>Candida albicans</i> ATCC 10231, (B) <i>Mycobacterium smegmatis</i> ATCC 14468, (C) <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922, (D) <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923..... | 40 |
| Figura 9. Teste de fumigação com <i>Sitophilus oryzae</i> adultos, com diferentes concentrações de óleo essencial de <i>Citrus sinensis</i> .....   | 43 |
| Figura 10. Teste de fumigação com <i>Sitophilus oryzae</i> adultos, com diferentes concentrações de limoneno. ....  | 46 |
| Figura 11. Crescimento das radículas das sementes de feijão manteiguinha ao final do período de 7 dias.....   | 50 |
| Figura 12. Principais interações observadas para o complexo galantamina-AChE em 2D (A) e 3D (B).....  | 54 |
| Figura 13. Modos de ligação simulados dos compostos $\beta$ -Citroneleno (A), Limoneno (B), $\beta$ -Acoradieno (C) e $\alpha$ -Humuleno (D) com TcAChE por diagrama.....   | 55 |
| Figura 14. Modos de ligação simulados dos compostos $\beta$ -Citroneleno (A), Limoneno (B), $\beta$ -Acoradieno (C) e $\alpha$ -Humuleno (D) com TcAChE por diagrama 3D.....  | 56 |



## LISTA DE TABELAS

|  |    |
|--|----|
| Tabela 1. Rendimento do óleo essencial da casca da espécie <i>Citrus sinensis</i> (L.) .....   | 32 |
| Tabela 2. Composição química de 33 compostos do OE de <i>Citrus sinensis</i> . .....   | 32 |
| Tabela 3. Resultado das atividades antimicrobianas do óleo essencial de <i>C. sinensis</i> frente aos microrganismos <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Candida albicans</i> e <i>Mycobacterium smegmatis</i> , bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e fungo..... | 36 |
| Tabela 4. Valores estatísticos para aplicação de diferentes dosagens do OE de <i>Citrus sinensis</i> , Grau de Liberdade (GL) e Probabilidade de significância. ....   | 41 |
| Tabela 5. Mortalidade corrigida para o tempo de 48 h, teste com OE de <i>Citrus sinensis</i> , da espécie <i>Sitophilus oryzae</i> adultos. ....   | 42 |
| Tabela 6. Valores estatísticos para o teste com o padrão limoneno com pureza de $\geq 95\%$ , Grau de Liberdade (GL) e Probabilidade de significância; .....   | 44 |
| Tabela 7. Mortalidade corrigida para o tempo de 48 h, teste com o limoneno padrão, na espécie <i>Sitophilus oryzae</i> adultos. ....   | 44 |
| Tabela 8. Concentração Letal - CL25% limoneno teste de delineamento casualizados;.....   | 45 |
| Tabela 9. Resumo das médias de germinação de sementes de feijão-manteiguinha sob efeito do OE de <i>Citrus sinensis</i> , com as diferentes concentrações aplicadas. ....  | 47 |
| Tabela 10. Resultados de ensaio antioxidante no óleo essencial de <i>Citrus sinensis</i> .....   | 51 |
| Tabela 11. Resultados de docking para os principais constituintes do OE de <i>C. sinensis</i> ativos frente a AChE. ....   | 53 |

## LISTA DE GRÁFICOS

|  |    |
|--|----|
| Gráfico 1. Velocidade de germinação do feijão frente aos tratamentos por contato com o óleo essencial de <i>Citrus sinensis</i> com óleo de soja, água e óleo de soja e como controle, T0, T1, T3, T4 e T5. .... | 48 |
| Gráfico 2. Comprimento radicular feijão manteiguinha frente a tratamentos com OE de <i>C. Sinensis</i> .....   | 48 |
| Gráfico 3. Germinação, Tamanho médio de germinação (TMG), Índice de velocidade de germinação (IVG) do feijão manteiguinha frente a tratamentos com OE de <i>C. Sinensis</i> . .....                              | 49 |

## LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

**AchE** – Acetilcolinesterase

**ABTS** - 3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico

**PIB** – Produto Interno Bruto

**PIA** - Pesquisa Industrial Anual

**USDA** – Departamento de Agricultura do Estados Unidos

**CFC** – Cascas de Frutas Cítricas

**IPT** - Instituto de Pesquisa Tecnológicas

**CEMPRE** - Compromisso Empresarial para Reciclagem

**ONGs** – Organização Não Governamental (Plural)

**IFAM** – Instituto Federal do Amazonas

**IBGE** - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

**DA** – Doença de Alzheimer

**CG/EM** – Cromatografia Gasosa/Espectrometria de Massa

**IA** - índice aritmético

**CL** – Concentração Letal

**IC** – Intervalo de Confiança

**OE de *C. sinensis*** – óleo essencial de *Citrus sinensis*

**pH** – potencial hidrogênio

**Ton** – Tonelada

**%** - porcentagem

**L** – Litro

**(g)** – grama

**h** – Hora

**°C** – grau celsius

**mm** – milímetro

**µm** – micrómetro

**mg** – micrograma

**uL** – microlitro

**mL** – mililitro

**nm** – nanômetro

**μmol** – micromol

**mg/mL** miligrama por mililitro

**NaClO** – Hipoclorito de sódio

## SUMÁRIO

|   |    |
|---|----|
| 1. INTRODUÇÃO .....   | 14 |
| 2. REVISÃO DA LITERATURA .....  | 16 |
| 2.1. Economia circular .....  | 16 |
| 2.2. A laranja .....  | 17 |
| 2.3. Resíduos da indústria do suco de laranja .....                               | 18 |
| 2.4. A produção do óleo essencial de laranja no Brasil .....                      | 19 |
| 2.5. Componentes químicos da laranja .....  | 20 |
| 2.6. Metabolismos secundários e defesa vegetal .....                              | 21 |
| 2.7. Alelopatia .....   | 22 |
| 2.8. Biopesticidas .....  | 22 |
| 2.9. Atividades biológicas .....  | 23 |
| 2.10. Atividade antioxidante .....  | 23 |
| 2.11. Acetilcolinesterase e inibição .....  | 24 |
| 3. OBJETIVOS .....  | 25 |
| 3.1. Objetivo Geral .....   | 25 |
| 3.2. Objetivos Específicos .....  | 25 |
| 4. METODOLOGIA .....  | 26 |
| 4.1. Coleta do material vegetal .....   | 26 |
| 4.2. Isolamento do óleo essencial das cascas de <i>Citrus sinensis</i> (L.) ..... | 26 |
| 4.3. Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/EM) .....       | 26 |
| 4.4. Ensaio biológicos .....  | 27 |
| 4.4.1. Avaliação da atividade antimicrobiana .....                                | 27 |
| 4.5. Avaliação da atividade antioxidante .....                                    | 27 |
| 4.5.1. Ensaio com o cátion radical ABTS <sup>•+</sup> .....                       | 27 |
| 4.6. Efeito alelopático .....   | 28 |
| 4.6.1. Bioensaio para avaliação do efeito fitotóxico .....                        | 28 |
| 4.7. Bioatividade inseticida por fumigação de óleo essencial .....                | 29 |
| 4.8. Avaliação da inibição da acetilcolinesterase <i>in vitro</i> .....           | 30 |
| 4.9. Avaliação da inibição da acetilcolinesterase <i>in sílico</i> .....          | 31 |
| 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....   | 32 |
| 5.1. Da extração .....  | 32 |
| 5.2. Composição química .....   | 32 |
| 5.3. Ensaio biológicos .....  | 36 |

|   |    |
|---|----|
| 5.3.1. Determinação da atividade antimicrobiana.....  | 36 |
| 5.4.1. Óleo essencial de cascas de <i>Citrus sinensis</i> .....                                       | 41 |
| 5.5. Avaliação do efeito alelopático .....  | 46 |
| 5.6. Avaliação do teste antioxidante ABTS•+ e DPPH.....   | 51 |
| 5.7. Avaliação da inibição da acetilcolinesterase <i>in vitro</i> .....                               | 52 |
| 5.8. Avaliação da inibição da acetilcolinesterase <i>in silico</i> por <i>docking</i> molecular ..... | 53 |
| 6. CONCLUSÃO.....   | 57 |
| 7. REFERÊNCIAS .....  | 59 |

## 1. INTRODUÇÃO

A economia circular estimula novas práticas de gestão, fonte de inovação ao nível de produtos, processos e modelo de negócio, permitindo a redução da procura de recursos naturais com a recuperação de desperdícios e resíduos (Leitão, 2015). Como um novo paradigma para conciliar o crescimento econômico com o uso de recursos naturais, a economia circular enfatiza aspectos econômicos e ambientais e aborda vários objetivos de desenvolvimento sustentável (Schneider, 2014).

A economia Circular é um conceito estratégico que assenta na redução, reutilização, recuperação e reciclagem de materiais e energia, nos permitem repensar as práticas econômicas da sociedade atual a partir do funcionamento da própria natureza (Circular, 2017). Fornece, portanto, o princípio fundamental para o melhor uso dos recursos naturais e na minimização da geração e disposição de resíduos, que assim o conduz ao desenvolvimento econômico e social sustentável (Stahel, 2016).

A agricultura desempenha um papel vital no desenvolvimento socioeconômico mundial. No Brasil, a agricultura é reconhecida como altamente competitiva e geradora de empregos, de riqueza, de alimentos, de fibras e de bioenergia para o Brasil e para outros países. É um dos setores que mais contribui para o crescimento do PIB nacional e que responde por 21% da soma de todas as riquezas produzidas, um quinto de todos os empregos e 43,2% das exportações brasileiras, chegando a US\$ 96,7 bilhões em 2019 (Mahato *et al.*, 2019).

A indústria cítrica, com uma produção superior a 100 milhões de toneladas por ano, representa a maior produção de frutas do mundo, com as principais peças produzidas na Ásia (44%), Europa (20%) e América do Sul (18%) (Mahato, *et al.*, 2019; USDA, 2020). O Brasil é o maior produtor e exportador mundial com aproximadamente 68% da produção e 79% das exportações mundiais. Em média, 70% da laranja produzida no Brasil é destinada para processamento. Os Estados Unidos, que são o segundo maior produtor mundial, respondem por 14% da produção de suco de laranja e o México é o segundo maior exportador com 10% do comércio mundial do produto (USDA, 2018).

Uma grande parte das frutas cítricas é utilizada na indústria de processamento de alimentos, principalmente na produção de suco. Aproximadamente 60% da massa do fruto permanecem após o processamento, como cascas, sementes e resíduo de membrana, sendo estes

resíduos transformados em outros produtos. Estima-se que os resíduos cítricos gerados pelas indústrias de processamento de alimentos sejam mais de 54 milhões de toneladas em todo o mundo composta principalmente por resíduos não comestíveis de cascas de frutas cítricas (CFC) (Mahato, *et al.*, 2019). Nesse contexto, as cascas representam um desafio para a indústria de resíduos de uma perspectiva ambiental, uma vez que as mesmas são parcialmente usadas e na sua maior parte são aterradas, incineradas ou compostadas (Teigiserova *et al.*, 2021).

De uma perspectiva da bioeconomia circular, uma opção é usar as cascas de frutas cítricas para extrair compostos de alto valor (Ozturk *et al.*, 2019), tais como o limoneno o qual pode ser obtido no óleo essencial destas cascas, levando a valorização mais lucrativa desse resíduo. O limoneno é um monoterpene cíclico (C<sub>10</sub>H<sub>16</sub>) que compõe cerca de 90% dos óleos essenciais cítricos. Pode ser usado para uma variedade de aplicações na indústria alimentícia, farmacêutica e médica, solvente verde, inseticida natural e agente quimiopreventivo com propriedades anticancerígenas (Mahato *et al.*, 2019; USDA, 2020; Teigiserova *et al.*, 2021).

Dentro deste contexto, o propósito do presente estudo consistiu em avaliar potenciais bioatividades inerentes ao óleo essencial extraído das cascas de frutos cítricos da espécie *Citrus sinensis*. Este incluiu a avaliação da capacidade inibitória tanto *in vitro* como *in silico* frente à enzima acetilcolinesterase (AChE), além da exploração do efeito antimicrobiano, a investigação das propriedades alelopáticas sobre o feijão manteiguinha, a análise da atividade antioxidante e a avaliação da bioatividade inseticida através do método de fumigação empregando o óleo essencial.

Dessa forma, o presente trabalho visa a bioprospecção do óleo essencial das cascas de *Citrus sinensis* da região amazônica, através destes estudos pretende-se contribuir cientificamente para o reaproveitamento dos resíduos gerados pelo descarte das cascas da laranja afim de contribuir com a elucidação de questões ambientais e disponibilizar dados científicos para o tratamento de doenças e pragas.



## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1. Economia circular

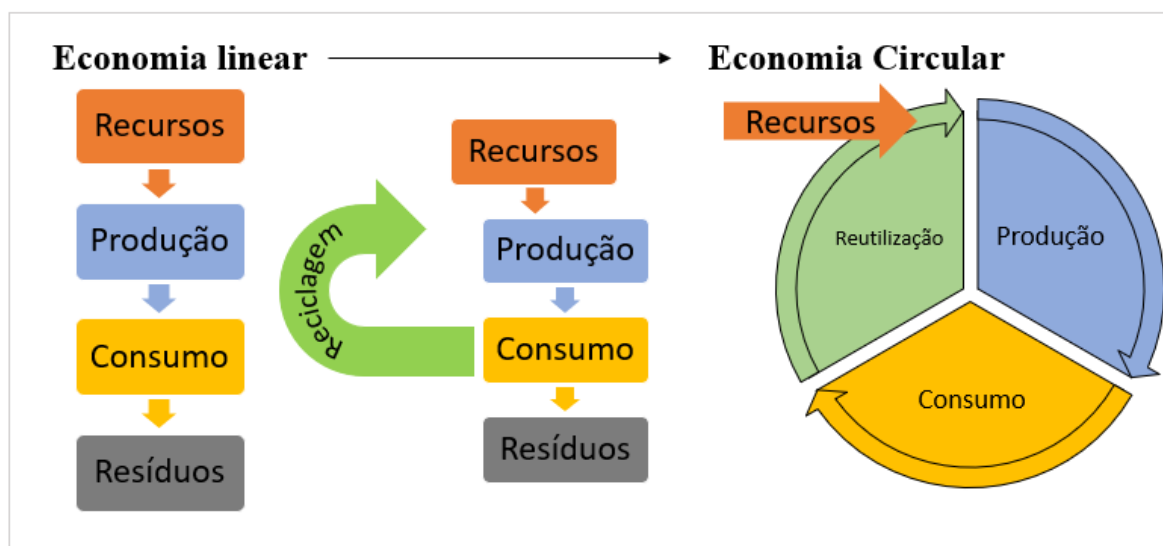
O conceito de Economia Circular enquanto proposta inovadora de implementação de um novo sistema de processo produtivo, propõe profundas modificações estruturais e assume um maior protagonismo ao contradizer o sistema usual da economia linear (Abdalla, 2018).

A economia circular vem como um viés atrelado a sustentabilidade, para a redução da poluição causada pela revolução industrial. Segundo Silva *et al.*, (2021) tanto a comunidade científica quanto o mercado reconhecem que o caminho para reverter o cenário passa pela economia circular, englobar ações de; reciclagem, reuso, remanufatura e logística reversa.

A diferença entre a economia linear e a circular é que, na primeira há a transformação linear da matéria prima em produtos, embalados, vendidos, consumidos e descartados, ignorando a necessidade de atentar ao descarte e a reutilização das embalagens (De Assunção, 2019). Na economia circular, o que é considerado rejeito é alimento para o próximo sistema, com uma logística de reaproveitamento, inclusive da embalagem, para que ela não perca valor (Borges, 2015).

A Figura 1 ilustra um modelo de transição da economia linear para a economia circular, o qual vislumbra o recurso natural como um segundo viés de abastecimento da indústria, não como forte principal, poupando desperdícios de recursos naturais.

Figura 1. Modelo de transição da economia linear para a circular.



Fonte: A autora, 2023, modificado de Portal da Circular Economy Portugal (2019), (Borges, 2015, *apud*, De Assunção, 2019).

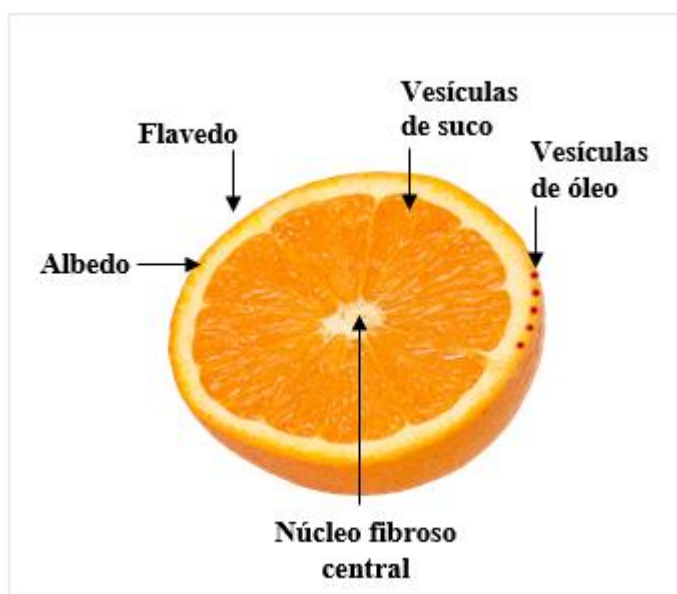
Destaca-se a geração de resíduos sólidos orgânicos, que contribui com uma parcela significativa do volume global. Estudos apresentados pelo Instituto de Pesquisa Tecnológicas (IPT) em parceria com a ONGs e o Compromisso Empresarial para Reciclagem (CEMPRE), estimam que a população brasileira esteja gerando 241.614 toneladas de resíduos sólidos por dia, sendo que grande parte destes resíduos é composta de alimentos (Oliveira, 2006).

## 2.2. A laranja

Os citrus, pertencem à família das Rutáceas e têm como gêneros de interesse econômico *Citrus*, *Poncirus* e *Fortunella*, principalmente o primeiro, que abrange a laranja (*Citrus sinensis* (L) Osbeck) (De Souza, 2017). A laranja é uma fruta cítrica, sendo que as inúmeras variedades existentes apresentam forma arredondada e alongada, casca lisa de coloração verde ou amarela, polpa suculenta, aroma característico e baixa acidez como características básicas (Koller, 1994, *apud*, Da Silva, 2020).

A casca da laranja é subdividida em uma fina camada externa chamada flavedo e uma porção interna fibrosa chamada albedo. Os carotenoides, substâncias que conferem a cor laranja à fruta, e as vesículas do óleo, pequenas cavidades contendo óleo que contribuem para o aroma, estão presentes no flavedo (Sharma *et al.*, 2017). A Figura 2 ilustra a estrutura da laranja.

Figura 2. Componente da estrutura da laranja *Citrus sinensis*.



Fonte: Modificado de SUZUKI, 2019; TETRA PACK, 2018.

Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2021), a produção brasileira de laranja foi de 16.214.982 toneladas em 578.057 mil hectares, destacando-se como maior produtor nacional o estado de São Paulo. No estado do Amazonas a produção de laranja chegou a 21.059 toneladas em 1.109 hectares, sendo destaque no estado o município de Rio Preto da Eva.

O Brasil é o maior produtor e exportador mundial com aproximadamente 68% da produção e 79% das exportações mundiais. Em média, 70% da laranja produzida no Brasil é destinada para processamento (Rissato, et al., 2021), sendo a porcentagem restante consumida *in natura*.

### 2.3. Resíduos da indústria do suco de laranja

Uma grande preocupação da indústria do suco de laranja são os impactos na geração de resíduo dos processos, e como esse resíduo pode ser reaproveitado, o bagaço da laranja, o qual é composto pelas cascas, flavedo, albedo e semente. Segundo (Abecitrus, 2009), industrialização de citros para a produção de sucos gera grandes quantidades de resíduos, que equivale a 50% do peso da fruta e tem uma umidade aproximada de 82%. Atualmente, os resíduos da laranja são utilizados principalmente como complemento para ração animal.

Figura 3. Produção do fruto de laranja safra 2021, processamento da indústria do suco e quantitativo de resíduo 2021.



Fonte: A autora, adaptado (IBGE, 2021; RISSATO, et al., 2021).

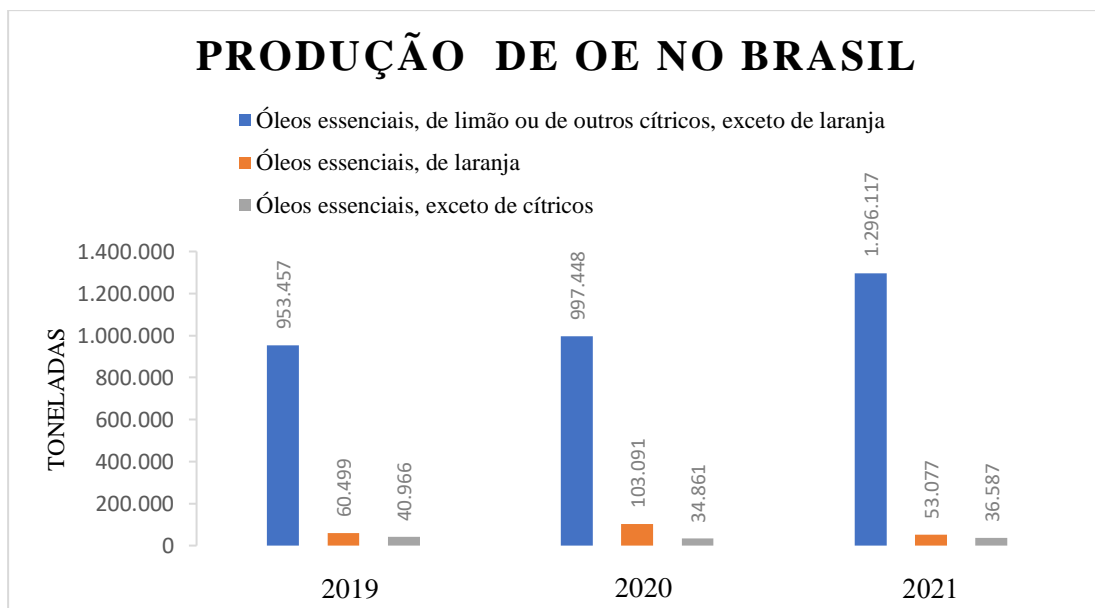
O aproveitamento do resíduo do suco de laranja pode ser valorado e gerar diversos produtos além da ração animal, como: pectina, óleos essenciais, enzimas, biogás, etanol, fertilizante orgânico, fibra dietética, carotenoides, adsorventes, biossurfactantes e carvão ativado (Suzuki, 2019; Da Silva *et al.*, 2020).

#### 2.4. A produção do óleo essencial de laranja no Brasil

Óleos essenciais (OEs) são definidos, segundo a norma 9235 da *International Organization for Standardization (ISO)*, como “produtos obtidos de matérias-primas naturais de origem vegetal, por destilação a vapor, por processos mecânicos a partir do epicarpo de frutos cítricos, ou por destilação a seco, após a separação da fase aquosa - se houver - por processos físicos” (International Organization for Standardization, 2021).

É crescente a busca por produtos naturais, nos setores alimentícios, farmacológicos, cosméticos naturais, segundo dados do IBGE, 2022, a Pesquisa Industrial Anual por Produto – PIA, relaciona a produção e venda de óleos essenciais no Brasil, no ano de 2021 a receita líquida com a venda de óleos de laranja atingiu o montante R\$ 743.702,15, a Figura 4 abaixo, ilustra a produção de óleos essenciais cítricos e não cítricos no Brasil por tonelada.

Figura 4. Produção de óleos essenciais no Brasil, divisão por CNAE.



Fonte: A autora, IBGE, 2022; PIA - Produto - Pesquisa Industrial Anual – Produto.

No ambiente industrial, o óleo essencial é obtido durante o processamento por prensagem a frio. Em tal processo, os frutos inteiros são despejados em uma prensa hidráulica

a qual realiza o esmagamento dos mesmos, extraindo o suco e o óleo presente na casca simultaneamente (Silva *et al.*, 2009). Por diferença de densidade, o óleo essencial deposita-se sobre o mesmo após a prensagem, sendo removido mecanicamente por meio de jatos d'água, formando uma emulsão pouco concentrada contendo, além do óleo, fragmentos sólidos e outros detritos que são removidos posteriormente por um ciclone (De Mello, 2019).

A emulsão resultante passa por um processo de clarificação em uma sequência de centrifugas, obtendo, por decantação, um sistema ternário com três fases resultantes: uma fase leve (rica em óleo), uma fase pesada (rica em sólidos insolúveis) e uma fase intermediária (rica em água). A fração leve passa por um novo processo de centrifugação, seguido por decantação para a obtenção do produto final, o óleo essencial (De Mello, 2019, p. 14).

O óleo essencial de cascas de laranja, também pode ser extraído por hidrodestilação:

A extração do óleo essencial da laranja, a partir do bagaço também pode ser efetuado através do processo de arraste de vapor, após a extração do suco o bagaço é condicionado a equipamento de hidrodestilação, após a evaporação e condensação o óleo é separado da água e centrifugado. Tal processo envolve um gasto maior de energia, maior controle de temperatura, para a não degradação do óleo e possíveis perdas de componentes químicos voláteis do óleo (Jonhson, 1983, *apud*, De Mello, 2019, 14-15).

As empresas investidoras no processo industrial, durante o planejamento básico da planta indústria, consideram o volume de processamento de frutos destinados à produção de suco. Além disso, elas também incorporam a aquisição de maquinário para aproveitar os resíduos gerados no processo. Esses resíduos podem ser utilizados de duas formas principais: primeiro, através de secagem e moagem para produzir insumos utilizados na fabricação de ração animal; e segundo, por meio de um processo contínuo de extração de óleo essencial.

Para ambos os casos, é necessário aplicar um tratamento adequado aos resíduos, visando a perda das propriedades químicas indesejadas nos insumos. Dessa forma, a empresa garante a eficiência e qualidade dos subprodutos obtidos a partir do processamento dos frutos, além de contribuir para a redução do desperdício e o aproveitamento sustentável dos recursos disponíveis. Essas medidas fazem parte de um planejamento estratégico voltado para a maximização dos resultados econômicos e a minimização do impacto ambiental, tornando o processo industrial mais completo e responsável.

## **2.5. Componentes químicos da laranja**

Vários tipos de compostos químicos foram identificados em frutas, cascas, folhas, suco e raízes de *C. sinensis*, que incluem os seguintes grupos: flavonoides, esteroides, hidroxiamidas, alcanos e ácidos graxos, cumarinas, peptídeos, carboidratos, carbamatos e alquilaminas, carotenoides, compostos voláteis e elementos nutricionais como potássio, magnésio, cálcio e sódio (Favela-Hernández, 2016). Os resíduos são uma valiosa fonte de óleo essencial, d-limoneno, flavonoides, carotenoides, fibras dietéticas, açúcares solúveis, celulose, hemicelulose, pectina, polifenóis, ácido ascórbico e metano (Sharma *et al.*, 2017).

Compostos químicos de óleos essenciais cítricos estão entre os componentes mais distintos para identificação e avaliação das variedades (Njoroge *et al.*, 2005). Essas variações em relação a este estudo podem ser devidas a fatores como idade vegetativa do fruto, variação geográfica e sazonal, espécie da planta e tipo de equipamento utilizado para o processo de extração (Oyedeji *et al.*, 2020).

## **2.6. Metabolismos secundários e defesa vegetal**

Os metabólitos secundários são compostos naturais produzidos em plantas com objetivo principal de proteção a estresses abióticos e bióticos, além de possuírem valores nutricionais e farmacológicos importantes na nutrição humana e aditivos aromáticos e corantes (Pacheco e Alves, 2020).

Atualmente sabemos que muitos produtos do metabolismo secundário têm função ecológicas importantes na devesa dos vegetais:

Eles protegem as plantas contra os herbívoros e contra a infecção por microrganismos patogênicos. Eles agem como atrativos (odor, cor ou sabor) para animais polinizadores e dispersores de sementes. Eles atuam como agentes nas simbioses plantas e microrganismos. Tais compostos aumentam o desempenho reprodutivo da planta, ao agirem na defesa vegetal (Taiz *et al.*, 2017, p. 370).

Modificando e regulando os processos fisiológicos das plantas, por intermédio do estímulo do crescimento, aumento da produção da cultura e minimização dos estresses gerados pelo ambiente em que estão inseridas (Da Silva., 2023).

Os óleos essenciais, contêm uma variedade de componentes bioativos, como terpenos e compostos aromáticos, que podem beneficiar o crescimento e a resistência das plantas. Ao aplicar esses óleos essenciais como bioestimulantes, é possível melhorar o desempenho das culturas, estimulando seu crescimento, aumentando a tolerância a estresses ambientais e reforçando suas defesas naturais contra pragas e doenças.

## 2.7. Alelopatia

O conceito descreve a influência de um indivíduo sobre o outro, seja prejudicando ou favorecendo, sugere que o efeito é realizado por biomoléculas (denominadas aleloquímicos) produzidas por uma planta e lançadas no ambiente, seja na fase aquosa do solo ou substrato, seja por substâncias gasosas volatilizadas no ar que cerca as plantas terrestres (Rizvi *et al.*, 1992, *apud*, Ferreira *et al.*, 2000).

O potencial alelopático entre plantas cultivadas no controle das invasoras, surge da necessidade de redução de custos da produção agrícola, com relação à utilização de herbicidas, bem como, no que diz respeito à redução do impacto ambiental causado pelo uso desordenado e crescente de agrotóxicos (Tokura *et al.*, 2006).

## 2.8. Biopesticidas

Os óleos essenciais sendo produtos naturais, biodegradáveis e ecologicamente seguros são candidatos emergentes como substitutos de pesticidas sintéticos no programa de manejo de pragas (Chaubey, M. K. *et al.*, 2011). O pulgão da faia, *Phyllaphis fagi*, e o gorgulho do arroz, *Sitophilus oryzae*, são pragas sérias mundialmente (Yazdgerdian *et al.*, 2015). Controle desta praga depende principalmente da aplicação repetida de inseticidas sintéticos (Hasan e Reichmuth, 2004).

*Sitophilus oryzae* caracteriza-se por apresentar o protórax densamente coberto por depressões circulares, os adultos têm 2,4, 4,0 mm de comprimento e variam de marrom a preto. Eles são bons voadores e podem infestar grãos no campo (Saini e Rodríguez, 2004). Alternativas biológicas começaram a ser utilizadas, dentre as quais estão os metabólitos secundários de espécies botânicas eficazes em seu controle (Herrera, 2018).

Esses óleos essenciais contém metabólitos secundários e sua toxicidade funcionou contra muitos insetos de grãos armazenados, e suas atividades diferem enormemente de planta para planta, devido ao produto vegetal secundário (Devi, Mayanglambam Alina *et al.*, 2020).

É importante ressaltar que a aplicação de óleos essenciais como biopesticidas deve ser cuidadosamente estudada e monitorada, para garantir que não haja efeitos negativos sobre as plantas ou o ecossistema circundante. Pesquisas contínuas são necessárias para avaliar a eficácia, segurança e dosagens adequadas, a fim de maximizar os benefícios dessa abordagem no armazenamento.

## 2.9. Atividades biológicas

Os óleos essenciais cítricos tornaram-se o foco de vários estudos porque eles têm atividades biológicas amplas que resultam de suas composições químicas (Magalhães *et al.*, 2020). Apresentam compostos aromáticos voláteis como terpenos e seus derivados (carvacrol, timol, eugenol, terpineno, linalol e carvona), que são os principais responsáveis por sua atividade antimicrobiana (Pombo *et al.*, 2018).

Os extratos de casca de frutas cítricas mostraram uma boa atividade antibacteriana, antifúngica e antiviral contra todas as diferentes bactérias patogênicas, tais como *Streptococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhi* e *Escherichia coli* (Atolani *et al.*, 2020). Os extratos da casca de *C. sinensis* e *C. reticulata* exibiram boa atividade antibacteriana e antifúngica (Gupta *et al.*, 2021). A resistência antimicrobiana é um risco vital quando se trata da saúde e bem-estar das pessoas, bem como, dos animais o que acaba por ter um grande efeito em termos de segurança alimentar (Zubair, 2020).

Os patógenos alimentares são grandes causadores de doenças gastrointestinais, que podem causar sintomas leves, como náuseas e vômitos ou mais graves podendo levar o paciente à óbito (Valeriano *et al.*, 2012, *apud*, Da Rocha, 2022). A *Saumonella.*, a *Listeria monocytogenes*, a *Escherichia Coli* e os *Staphylococcus*. Estão entre os patógenos que mais causam contaminação alimentar (Reis *et al.*, 2020; Noronha *et al.*, 2019, *apud*, Da Rocha, 2022).

A resposta antimicrobiana contra bactérias patogênicas de origem alimentar pode ser atribuída também a natureza fenólica dos óleos essenciais. Os mecanismos de ação referem-se à capacidade dos compostos fenólicos de alterar a permeabilidade da célula microbiana, danificando as membranas citoplasmáticas, o que, conseqüentemente, resulta em morte celular (Bajpai *et al.*, 2012, p. 121).

A utilização de óleos essências e extratos de plantas com ação a agentes patológicos, em atividades antimicrobianas é amplamente utilizado e vem sendo cada vez mais explorado, impulsionando o uso de produtos naturais, com eficácia por comprovação científica e avanço da tecnologia.

## 2.10. Atividade antioxidante



O estresse oxidativo corresponde a um desequilíbrio entre agentes oxidantes e antioxidantes, que levam ao predomínio de espécies reativas de oxigênio, e como resultante podem provocar danos celulares e contribuir para o desenvolvimento de doenças e envelhecimento (Da Silva Barbosa *et al.*, 2019). Pesquisas científicas apontam que produtos naturais com base em plantas medicinais e óleos essenciais produzem potente ação antioxidante (Bakkali *et al.*, 2008).

O efeito antioxidante dos óleos vegetais pode ser justificado principalmente pela presença dos compostos fenólicos, no entanto outros compostos como os flavonoides e terpenoides também apresentam pequena capacidade de efeito antioxidativo. Dessa forma essas substâncias neutralizam os radicais livres, impedindo a continuidade do processo oxidativo (Gutierrez; Barry-Ryan; Bourke, 2008).

### **2.11. Acetilcolinesterase e inibição**

A acetilcolinesterase (AChE) tem uma importância inquestionável para o adequado funcionamento das sinapses colinérgicas presentes em nosso sistema nervoso central e periférico, fato que torna esta enzima um alvo atraente para o desenvolvimento de novas drogas (Araújo *et al.*, 2016).

A disponibilidade desse neurotransmissor responsável por estímulos no nosso organismo, estabelecendo um equilíbrio em nossas funções orgânicas.

O conteúdo dessas AChE liberada entra na sinapse e se liga ao receptor. A AChE que é liberada possui uma meia-vida muito curta devido à presença de grandes quantidades de ligação éster na molécula de AChE, levando à sua perda de atividade estimuladora. A inibição da AChE, portanto, resulta em um prolongamento da existência e atividade da AChE (Souza *et al.*, 2012, p. 260).

A doença de Alzheimer é a patologia neurodegenerativa mais frequentemente associada à idade, cujas manifestações cognitivas e neuropsiquiátricas resultam em deficiência progressiva e incapacitação (Sereniki *et al.*, 2008). O déficit de acetilcolina é uma característica neuroquímica de pacientes diagnosticados com Alzheimer, usar inibidores de acetilcolinesterase (AChE) para retardar a hidrólise catabólica da acetilcolina, tem sido um remédio para a DA (Souza *et al.*, 2012).

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo Geral**

Aplicação do conceito da economia circular em aproveitamento dos resíduos dos frutos de *Citrus sinensis* para avaliação do perfil químico e atividades biológicas.

#### **3.2. Objetivos Específicos**

- Quantificar o rendimento e analisar a composição química do OE das cascas de *C. sinensis*, através da técnica de CG/EM;
- Avaliar inibição da enzima acetilcolinesterase (Ache) *in vitro* e *in silico* através de simulações de *docking* molecular pelos programas AutoDock;
- Investigar a ação antimicrobiana frente as cepas: *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Candida albicans* (ATCC 10231), *Mycobacterium smegmatis* (ATCC 14468);
- Testar o efeito alelopático do OE de *C. sinensis* frente ao feijão manteiguinha;
- Analisar a atividade antioxidante através dos métodos ABTS•+ e DPPH;
- Avaliar bioatividade inseticida por fumigação em adultos *Sitophilus oryzae*
- Elucidar as contribuições deste estudo para a economia circular;

## **4. METODOLOGIA**

### **4.1. Coleta do material vegetal**

Frutos da espécie *Citrus sinensis* (L.) foram originados e adquiridos do município de Rio Preto da Eva/Amazonas em novembro de 2019. Os frutos frescos foram higienizados com água corrente e posteriormente descascados, com o auxílio de ferramenta cortante. O epicarpo (casca) foi separado do fruto, cortado em lascas, as quais logo em seguida foram pesadas e submetidas à hidrodestilação.

### **4.2. Isolamento do óleo essencial das cascas de *Citrus sinensis* (L.)**

O óleo essencial da casca da espécie *Citrus sinensis* (L.) foi obtido por hidrodestilação em aparelho de Clevenger, acoplado a um balão de fundo redondo, com 1L de água destilada e 400g de massa de cascas de laranja, por aproximadamente 3 h. Em seguida, as amostras de óleo essencial coletadas foram centrifugadas por 10 minutos a 3500 rpm para posterior separação óleo/água. Com auxílio de uma micropipeta graduada, foi possível realizar a separação dos líquidos. O isolamento do óleo essencial foi realizado em uma única extração. O OE obtido, foi armazenado em tubo de Eppendorf, vedado e conservado à -4°C, até a análise e testes. O rendimento obtido do óleo essencial foi calculado baseado no peso das cascas (g/mL) de acordo com a equação 1. O ensaio foi realizado no laboratório da UFAM/ICET.

$$R (\%) = \frac{\text{Volume (mL)} \times 100}{\text{Massa (g)}} \text{ (equação 1)}$$

### **4.3. Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/EM)**

A análise cromatográfica gasosa foi realizada nas dependências da UFAM, na Central Analítica, localizada no município de Manaus/AM. Os óleos essenciais foram analisados em um cromatógrafo (Trace Gc Ultra) acoplado ao detector de espectrometria de massas (MS), modelo ISQ Single Quadrupole (Thermo Scientific). Para cromatografia dos componentes foi empregada coluna DB-5MS, com 30 m x 0,25 mm, espessura do filme interno de 0,25µm. A solução de injeção foi preparada dissolvendo-se cerca de 1 mg de óleo essencial em 1 ml de

metanol. Foi injetado 1 $\mu$ L da solução estoque, em uma proporção de divisão de 1:50. A temperatura da coluna foi programada de 40 a 280°C em uma taxa constante de 4°C/min. A temperatura de 240°C foi mantida por 4 minutos. Depois disso, a temperatura voltou a subir em uma taxa de 10°C/min até a temperatura final de 280°C, onde permaneceu por mais dois minutos. A temperatura do injetor e da fonte foi configurada para 220°C e 250°C, respectivamente, com a faixa de massa: m/z 40 600. A identificação dos constituintes foi feita por interpretação de seus respectivos espectros de massas e índice de retenção linear (Índice de Kovat's), feito de acordo com a equação de Van der Dool and Kratz (Dool&Kratz, 1963), foi injetada uma série homóloga de hidrocarbonetos (C12-C40) e por comparação com dados da literatura. O índice aritmético (IA) calculado foi comparado com o de compostos isolados tabelados por Adams (2007).

#### **4.4. Ensaios biológicos**

##### **4.4.1. Avaliação da atividade antimicrobiana**

Para análise antimicrobiana foi utilizada a técnica de difusão em ágar (Kirby e Bauer, 1966) e quatro espécies microbianas foram testadas quanto a sua suscetibilidade ao óleo essencial de *C. sinensis* e o limoneno padrão: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* (ATC25922), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Candida albicans* (ATCC 10231), *Mycobacterium smegmatis* (ATCC 14468), as cepas são originárias do Centro de Biotecnologia da Amazônia - CBA/AM, bem como todo o teste foi realizado no CBA, as bactérias indicadoras padronizadas foram semeadas com o auxílio de swab estéril em placa de Petri contendo meio Ágar Mueller Hinton. Discos de papel 6 mm foram embebidos com 30  $\mu$ L do óleo solubilizados em metanol na concentração de 2 mg/mL e deixados evaporar por 24 h.

Os discos foram colocados nas placas previamente semeadas com os microrganismos testes padronizados. As placas foram armazenadas em geladeira *overnight* e então incubadas com a variação de temperatura de 35°C a 37 °C por 24h a 48h para bactérias e leveduras respectivamente. Após o período de incubação foi avaliado a formação do halo de inibição. Como controle positivo foi utilizado amoxicilina 10 mg/mL e o limoneno padrão utilizado foi o da marca Sigma-Aldrich, lot.: SHBL1002970331,  $\geq$  95%, (S)-(-)-Limonene na quantidade de 10  $\mu$ L.

#### **4.5. Avaliação da atividade antioxidante**

##### **4.5.1. Ensaio com o cátion radical ABTS<sup>•+</sup>**

Foi realizada a mistura de 5 mL de solução de ABTS•+ a 7 mm e 88 µL de persulfato de sódio a 140 mM, mantido no escuro por 16 horas. Após isso, 1 mL da solução foi misturado com etanol até absorvância de 0,70 (734nm). Dessa solução 3,0 mL foram misturados com 30 µL de amostra (1 mg/mL) e deixados para reagir no escuro por 6 minutos. Após isso realizou-se a leitura em espectrofotômetro a 734 nm. A curva padrão de Trolox foi construída entre 100 e 2000 µg mL<sup>-1</sup>, sendo expressa pela equação  $y = A$  e  $R^2 = B$ . Este ensaio foi realizado em triplicado e seus resultados foram expressos em µmol ET (Re *et al.*, 1999).

#### **4.5.1. Ensaio com o radical DPPH**

Foi misturado 100 µL da amostra (1 mg/mL) com 3,9 mL de solução de DPPH' (100 µM) e mantidos no escuro por 30 min. Após isso realizou-se a leitura das absorvâncias em espectrofotômetro a 515 nm. Uma curva padrão de Trolox foi construída de 100 a 2000 µg mL<sup>-1</sup>, expressa pela equação  $y = A$  e  $R^2 = B$ . Este ensaio foi realizado em triplicado e os resultados foram expressos em µmol ET (Molyneux, 2004). Os ensaios antioxidantes foram realizados no IFAM, laboratório de central analítica.

### **4.6.Efeito alelopático**

#### **4.6.1. Bioensaio para avaliação do efeito fitotóxico**

Para a realização do teste alelopático as sementes de feijão manteiga, os grãos de feijões foram adquiridos na feira local do município de Itacoatiara/Am, foram previamente sanitizados com NaClO (2%), por dois minutos. Após a secagem sobre folhas de papel filtro esterilizadas, as sementes foram colocadas em sacos plásticos contendo os tratamentos, todas as etapas dos procedimentos foram no realizadas no Laboratório de agronomia da UFAM/ICET.

Os tratamentos consistiram em formulações contendo os óleos essenciais solubilizados em óleo de soja nas concentrações de 10, 100, 500 e 1000 µg/mL, aplicados na dose de 50 mL/kg de semente, água e óleo de soja foi utilizada como controle, o tratamento consistiu por aproximadamente 60 s (Pereira *et al.*, 2022).

Os ensaios de germinação foram realizados em câmara de germinação do tipo BOD a temperatura de 25°C, utilizando o método do papel germitest®, previamente esterilizados a 105°C por 2 h. Sendo semeadas 50 sementes por rolo, dispostos em delineamento inteiramente casualizados com quatro repetições, o papel germitest® foi previamente umedecido com água destilada numa proporção de 2,5 vezes a massa seca do papel.

A taxa de germinação foi verificada a cada 24 h durante 7 dias possibilitando a avaliação da velocidade de germinação, anotando-se, diariamente, no mesmo horário, o número de plântulas que apresentarão protrusão de radícula durante os dias de avaliação.

Ao final do teste foram calculados os índices de velocidade de germinação, empregando-se a fórmula proposta por Maguire (1962):  $IVG = G1/N1 + G2/N2 + \dots + Gn/Nn$  Onde: IVG - índice de velocidade de germinação; G1, G2, Gn - número de plântulas germinadas na primeira, segunda, até a última contagem; N1, N2, Nn - número de dias da semeadura desde a primeira, segunda, até a última contagem. Ao final do sétimo dia foram contabilizados os números de plântulas anormais, normais e sementes mortas, os resultados foram expressos em porcentagem (Brasil, 1992).

Foram mensurados com auxílio de um paquímetro digital, o comprimento da parte aérea e da raiz de plântulas de feijão. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância pelo teste F e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, com auxílio do software Sisvar (Ferreira, 2011). O ensaio foi realizado em quadruplicada.

#### **4.7. Bioatividade inseticida por fumigação de óleo essencial**

No teste, primeiramente criou-se o *Sitophilus oryzae*, foram utilizados indivíduos coletados de arroz adquirido em comércio local. O arroz infestado foi dividido em unidades de criação, representadas por recipientes plástico, de tampa hermética, com volume de 350 mL. As unidades foram diariamente abertas, por cerca de 30 segundos, para renovação do ar. A cada 45 dias os adultos foram transferidos para novas unidades de criação contendo arroz desinfestados (submetido a 48 h na estufa a 50° C). Para identificação da espécie, dez espécimes adultos foram retirados do material coletado e dissecados para identificação, com base em Pereira e Almeida (2001). Periodicamente espécimes da criação serão coletados aleatoriamente para identificação, garantindo a pureza da criação.

A avaliação da atividade fumigante do óleo essencial foi baseada nas metodologias propostas por Estrela *et al.* (2006) e Coitinho *et al.* (2011), com modificações. Para isso, foram utilizados recipientes de vidro, de volume conhecido e com tampa hermética, como câmaras de fumigação. Para cada câmara foram transferidos 10 indivíduos adultos de *S. oryzae* e 5 g de arroz, como fonte de alimentação. O óleo essencial foi aplicado, com auxílio de micropipeta, em tiras de papel filtro fixadas na parte inferior da tampa da câmara de fumigação, nas dosagens de 2, 4, 8 e 16 µL, equivalentes às concentrações de 57,14 µl/L, 228,56 µl/L, 457,12 µl/L,

914,20 µL de ar, volume da câmara, respectivamente. No tratamento controle nada foi aplicado. As avaliações de mortalidade foram realizadas após os períodos de exposição de 24, 48 e 72 horas. Durante as avaliações, os insetos foram observados pelas paredes transparentes das câmaras, sendo considerados mortos quando permaneceram imóveis por mais de 1 minuto após a câmara ser levemente balançada. A pesquisa foi desenvolvida de janeiro de 2023 a fevereiro de 2023 no Laboratório de Acarologia e Entomologia Agrícola do Instituto de Ciências Exatas e Tecnologia de Itacoatiara/Universidade Federal do Amazonas (ICET/UFAM). Os ensaios foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizados. Para cada concentração do óleo essencial foi calculada, em cada tempo de exposição, a mortalidade corrigida em função da mortalidade natural da população, determinada através do tratamento controle (Abbott, 1925). Dessa forma, o efeito de cada amostra em cada tempo de exposição foi estimado através da determinação das médias da mortalidade corrigida. Em seguida foram submetidos à ANOVA e, quando o valor  $F_{ANOVA}$  foi significativo, as médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knott. Para cada tempo de exposição será determinada a Concentração Letal (CL) do óleo essencial. As  $CL_{25\%}$  e  $CL_{50\%}$  foram determinadas pelo método de análise de Probit (Finney, 1971). Os intervalos de confiança a 95% ( $IC_{95\%}$ ) de probabilidade, associados a cada CL, foram calculados e utilizados para comparação entre estas (Welch, 1938). Todas as análises foram realizadas com auxílio do Software R versão 4.1.0 (R Core Team, 2021), utilizando os pacotes estatísticos “asbio”, “BioStatR”, “bootstrap”, “comperes”, “easyanova”, “ecotoxicology” e “MASS”. Também para todas as análises foi adotado um nível de significância de 5% de probabilidade ( $p \leq 0,05$ ).

#### **4.8. Avaliação da inibição da acetilcolinesterase *in vitro***

A atividade enzimática da acetilcolinesterase foi determinada em microplacas pelo método espectrofotométrico de Ellman, modificado por Azevedo e colaboradores (2013). As enzimas utilizadas foram: Acetilcolinesterase (AChE) de *Electrophorus electricus* tipo VI (Sigma®), o 5,5'-dithiobis (ácido 2-nitrobenzoico) (DTNB), o substrato acetilcolina iodada e a eserina, todos da marca sigma. Em cada poço das microplacas foram adicionados 25 µL de acetilcolina iodada 15 mM, 125 µL de DTNB, 50 µL de tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,0, contendo 0,1% de BSA (Albumina do Soro Bovino) e 25 µL dos extratos das plantas em concentração de 1 mg mL<sup>-1</sup> (concentração final no ensaio de 0,1 mg mL<sup>-1</sup>). Metanol e tris-HCl foram usados como controles e eserina (10 µM), como inibidor padrão. A absorbância foi

medida 5 vezes a 405 nm utilizando o leitor de microplaca Thermoplate®, modelo TP-reader, com intervalos de 15s, após essas leituras foram adicionados nos poços 25 µL de acetilcolinesterase 0,22 U mL<sup>-1</sup>. As absorbâncias eram medidas novamente 9 vezes a 405 nm, com intervalos de 15s. Aumentos na absorbância devido à hidrólise espontânea do substrato foram corrigidos pela subtração da taxa de reação antes da adição da enzima. A porcentagem de inibição foi calculada pela comparação das taxas das amostras com os controles. Todos os ensaios foram realizados em triplicata. A atividade enzimática e o percentual de inibição da AChE foram calculados utilizando o programa Microsoft® Excel.

#### **4.9. Avaliação da inibição da acetilcolinesterase *in silico***

Os estudos de *docking* molecular foram realizados de acordo com uma abordagem previamente relatada (De Lima et al., 2019). Inicialmente, as estruturas tridimensionais (3D) do β-Citroneleno, β-Pineno, Limoneno, α-Humuleno e β-Acoradieno foram baixadas do PubChem em formato de arquivo de dados espaciais (SDF). Em seguida as estruturas com menor energia foram otimizadas pelo método semi-empírico PM7 (Stewart, 2013) utilizando o software MOPAC2016 (Stewart, 2016). A estrutura cristalina 3D do *Torpedo californica* (TcAChE) complexado com a galantamina foi recuperada do banco de dados de proteínas RCSB (Research Collaboratory for Structural Bioinformatics) sob PDB ID 1QTI (Bartolucci et al., 2001). Todos os experimentos de ancoragem foram realizados utilizando o software AutoDock Vina 1.1.2 (Trott & Olson, 2009) no qual o *grid box* foi centralizado no ligante (centro em x, y, z = 4.34, 64.37, 60.09); tamanho do espaço de busca (volume do *grid box*) foi definido como 18 x 28 x 26 Å. O Autodock Tools versão 1.5.6 foi usado para converter as moléculas do ligante e do receptor em formato de arquivo apropriado (pdbqt) para o AutoDock Vina (Morris *et al.*, 2009) com o Discovery Studio (Discovery Studiovisualizer, 2016) sendo usado para analisar as conformações de ligação.



## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Da extração

O óleo essencial extraído da casca da espécie *Citrus sinensis* (L.) apresentou um rendimento de 2,05% (v/p) conforme apresentado na Tabela 1.

Tabela 1. Rendimento do óleo essencial da casca da espécie *Citrus sinensis* (L.)

| Amostra vegetal             | Mês/ano           | Temperatura | Massa do vegetal(g) | Rendimento |
|-----------------------------|-------------------|-------------|---------------------|------------|
| <i>Citrus sinensis</i> (L.) | Novembro<br>/2019 | 27°C        | 400                 | 2,05%      |

Fonte: Autora, 2022.

De Lima *et al.*, (2019) em seus estudos sobre a avaliação da extração do óleo essencial da casca da laranja de espécie *Citrus sinensis* (L.) obtiveram rendimento de 2,36 % (v/p). O rendimento de 2,47% (v/p) de óleo essencial foi obtido por Oliveira Everton *et al.*, (2020), Leão (2015) obteve um rendimento de 2,00%, para destilações das cascas conduzidas por três horas. É possível notar uma variação nos rendimentos dentro da faixa de 2,00 a 2,47%. O rendimento proveniente da extração do trabalho em questão é de 2,05%, o qual se enquadra dentro dessa faixa mencionada. Isso permite classificar esse rendimento como satisfatório. Os métodos de extração dos óleos voláteis variam conforme a sua localização na planta e da utilização do mesmo (Simões *et al.*, 2002) e, dependendo do método, pode variar significativamente o rendimento deste óleo.

### 5.2. Composição química

A Tabela 2, mostra a composição química do óleo essencial das cascas de *Citrus sinensis*, juntamente com a área, tempo de retenção de cada composto, Índice de Kovats calculado e o Índice de Kovats tabelado.

Tabela 2. Composição química de 33 compostos do OE de *Citrus sinensis*.

| TR <sup>a</sup> | I.Kcal <sup>b</sup> | I.Ktab <sup>c</sup> | Substância     | CLASSE          | AREA % |
|-----------------|---------------------|---------------------|----------------|-----------------|--------|
| 9,18            | 934                 | 942                 | β -Citroneleno | MH <sup>d</sup> | 7,33   |
| 10,8            | 885                 | 884                 | Santeno        | MH              | 4,09   |

|       |      |      |                         |                 |       |
|-------|------|------|-------------------------|-----------------|-------|
| 11,54 | 945  | 945  | $\alpha$ -Fencheno      | MH              | 0,32  |
| 12,16 | 953  | 969  | $\beta$ -Pinenno        | MH              | 9,63  |
| 12,72 | 961  | 961  | Verbeneno               | MH              | 0,26  |
| 12,92 | 963  | 969  | Sabineno                | MH              | 1,87  |
| 13,37 | 1038 | 1032 | $\beta$ - Ocimeno       | MH              | 1,0   |
| 13,75 | 974  | 980  | trans Isolimoneno       | MH              | 2,56  |
| 14,07 | 978  | 982  | cis-Pinenno             | MH              | 0,35  |
| 15,19 | 1044 | 1044 | <(E)- $\beta$ ->Ocimeno | MH              | 0,15  |
| 15,69 | 1050 | 1054 | $\gamma$ -Terpineno     | MH              | 2,3   |
| 18,45 | 1087 | 1089 | $\rho$ Cimeneno         | MH              | 0,29  |
| 18,95 | 1094 | 1095 | Linalol                 | MO <sup>e</sup> | 0,16  |
| 22,37 | 1244 | 1244 | Car-3-en-2-one          | MO              | 8,43  |
| 24,05 | 1269 | 1271 | neo -Metil acetato      | SO <sup>f</sup> | 1,3   |
| 24,9  | 1301 | 1304 | iso-Metil acetato       | SO              | 0,17  |
| 25,28 | 1287 | 1287 | Fenchol -2-ethyl-endo-  | MO              | 3,56  |
| 25,81 | 1295 | 1293 | Isomentone -2-etil      | SO              | 1,22  |
| 26,23 | 1353 | 1356 | Eugenol                 | MO              | 4,24  |
| 26,64 | 1283 | 1288 | Limonen-10-ol           | MO              | 8,26  |
| 27,7  | 1376 | 1380 | Dauceno                 | SH <sup>g</sup> | 0,61  |
| 28,55 | 1389 | 1389 | Elemeno< $\beta$ ->     | SH              | 2,8   |
| 29,04 | 1448 | 1452 | $\alpha$ -Humuleno      | SH              | 10,52 |
| 29,45 | 1455 | 1452 | $\alpha$ -neo-Clovene   | SH              | 4,83  |
| 30,07 | 1466 | 1470 | $\beta$ -Acoradieno     | SH              | 12,47 |
| 30,83 | 1478 | 1478 | Muroleno< $\gamma$ ->   | SH              | 3,74  |
| 31,04 | 1482 | 1489 | Selineno< $\beta$ ->    | SH              | 0,49  |

|                         |      |      |                 |    |       |
|-------------------------|------|------|-----------------|----|-------|
| 31,51                   | 1490 | 1492 | Guaieno<cis-β-> | SH | 1,02  |
| 32,15                   | 1552 | 1554 | Vetiveneno <β-> | SH | 0,27  |
| 32,87                   | 1564 | 1566 | Maliol          | SO | 0,59  |
| 33,23                   | 1571 | 1576 | Santalenone     | SO | 0,86  |
| 33,57                   | 1577 | 1586 | Gleenol         | SO | 0,85  |
| 34,66                   | 1647 | 1649 | Eudesmol<β->    | SO | 3,07  |
| Monoterpenos            |      |      |                 |    | 30,5  |
| Monoterpenos Oxigenado  |      |      |                 |    | 24,65 |
| Sesquiterpeno           |      |      |                 |    | 8,06  |
| Sesquiterpeno Oxigenado |      |      |                 |    | 36,87 |
| Total                   |      |      |                 |    | 99,61 |

Fonte: Adams, 2017. <sup>a</sup>TR: Tempo de Retenção; <sup>b</sup>I. Kcal : Índice Aritmético calculado; <sup>c</sup>I.Ktab: Índice de Retenção; <sup>d</sup>MH: Monoterpeno de hidrocarboneto; <sup>e</sup>MO: Monoterpeno oxigenado; <sup>f</sup>SO: Sesquiterpeno oxigenado; <sup>g</sup>SH: Sesquiterpeno de hidrocarboneto;

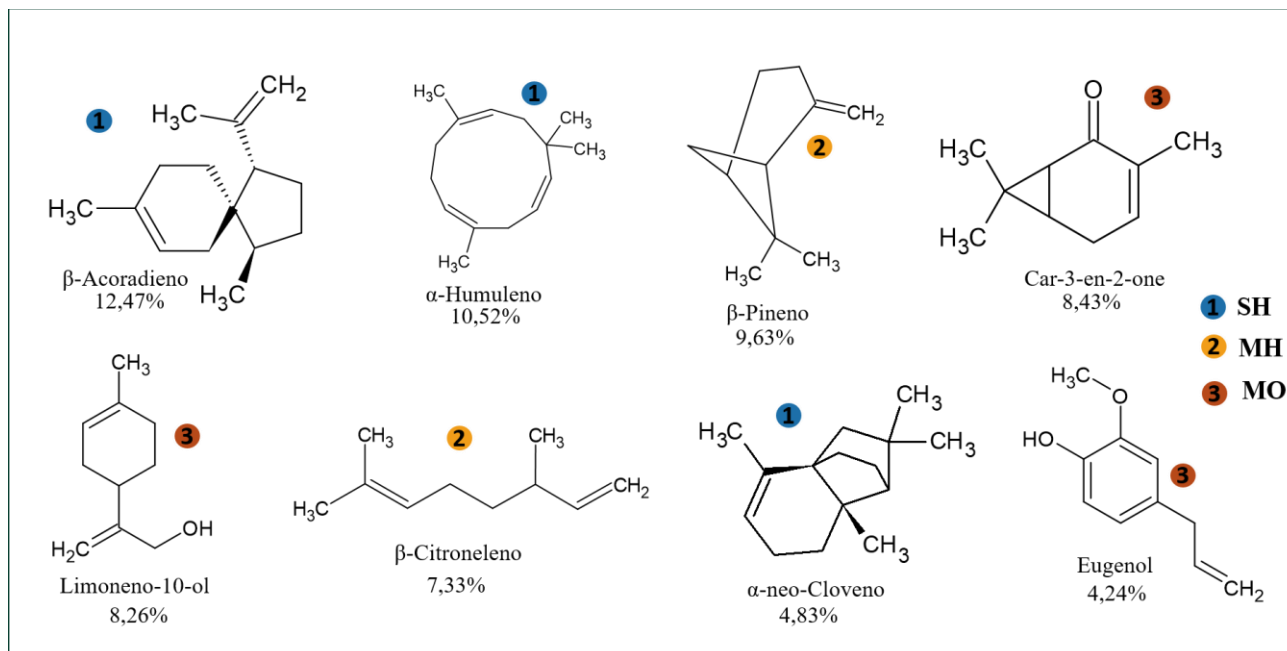
Um total de 33 compostos que foram detectadas por CG-EM e observadas no cromatograma, abrangendo os monoterpenos e os sesquiterpenos. Os compostos majoritários identificados foram os monoterpenos de hidrogênio: β-Citroneleno (7,33%), β-Pineno (9,63%), os monoterpenos oxigenados: Car-3-en-2-ono (8,43%), Eugenol (4,24%), Limoneno-10-ol (8,26%) e os sesquiterpenos de hidrogênio: α-Humuleno (10,52%), α-neo-Cloveno (4,83%) e β-Acoradieno (12,47%). A Figura 5, ilustra os constituintes majoritário encontrados no OE de *C. sinensis*.

Pesquisas desenvolvidas com 30 variedades de laranja para a obtenção e caracterização do óleo essencial de cascas de *C. sinensis* da região de Goiás-Brasil, apresentaram como majoritários uma variação de limoneno (93,19% a 99,61%), mirceno (0,18% a 1,18%), α-pineno (0,07% a 0,44%), sapineno (0,09% a 0,37%) (Santos *et al.*, 2023).

Em estudos conduzidos por (Dias *et al.*, 2019), com frutos originários da região de Goiás, cidade de Rio Verde-Brasil, relata a composição química do OE das cascas *C. sinensis* sendo identificado 4 componentes, que são: Limoneno (98,54%), δ-2-Careno (0,27%), δ-2-Careno (0,74%) e Triciclano (0,25%), quantificando o total de 99,80% do óleo, pode-se

observar o limoneno como majoritário na determinada área de Goiás, porém com variação nos outros componentes.

Figura 5. Constituintes majoritários encontrados no OE de *Citrus sinensis*, dentre os 33 constituintes identificados.



SH; sesquiterpenos hidrogenados, MH; monoterpênos hidrogenados, MO; monoterpênos oxigenados. Fonte: A autora, 2023.

Óleo originário da empresa Louis Dreyfus Company (Brasil), produtora de suco de laranja, o limoneno foi o principal componente identificado, compreendendo (96,1%), os 4,0% restantes eram uma mistura complexa de  $\alpha$ -pinoeno (2,4 %) e compostos oxigenados, como linalol (0,5%), octanal (0,4%), citronelal (0,3%), octanol (0,1%) geranial (0,1%),  $\alpha$ -terpineol (0,1%) (Gonçalves *et al.*, 2018).

Estudos conduzidos por Martins *et al.* (2017), com óleo essencial de *C. sinensis* e outros cítricos, sendo os óleos originários da indústria Ferquima Indústria e Comércio LTDA, apresentou d-limoneno (83,33%), mirceno (3,60%),  $\alpha$ -pinoeno (1,08%) e sabineno (1,02%) como majoritários.

O óleo essencial das cascas de *C. sinensis*, da região de Rio Preto da Eva/Amazonas, pode-se verificar a especificidade de sua composição, observando um total de 33 compostos, dos quais, em comparação com os óleos de outras regiões, não apresentou como majoritário o Limoneno, mas sim o  $\beta$ -Acoradieno (12,47%) e  $\alpha$ -Humuleno (10,52%) compostos quais não estiveram presentes nos óleos da demais regiões aqui citas, ademais pode-se verificar a distribuição mais igualitária na porcentagem dos majoritários.

A variação observada na composição química do óleo essencial estudado provenientes da espécie *Citrus sinensis*, proveniente da região Amazônica, pode ser atribuída a diversos fatores. Estes incluem: a região específica de cultivo, a influência de outras espécies vegetais nas proximidades da planta, práticas de manejo e conservação do fruto, a época em que a colheita ocorre, bem como o método e a duração do processo de extração.

### 5.3. Ensaios biológicos

#### 5.3.1. Determinação da atividade antimicrobiana

Através do ensaio pelo método de difusão em ágar foi possível determinar a atividade antimicrobiana para o óleo essencial de *C. sinensis* e o padrão limoneno, como mostrado na Tabela 3, resultados obtidos para o óleo essencial.

Tabela 3. Resultado das atividades antimicrobianas do óleo essencial de *C. sinensis* frente aos microrganismos *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Candida albicans* e *Mycobacterium smegmatis*, bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e fungo.

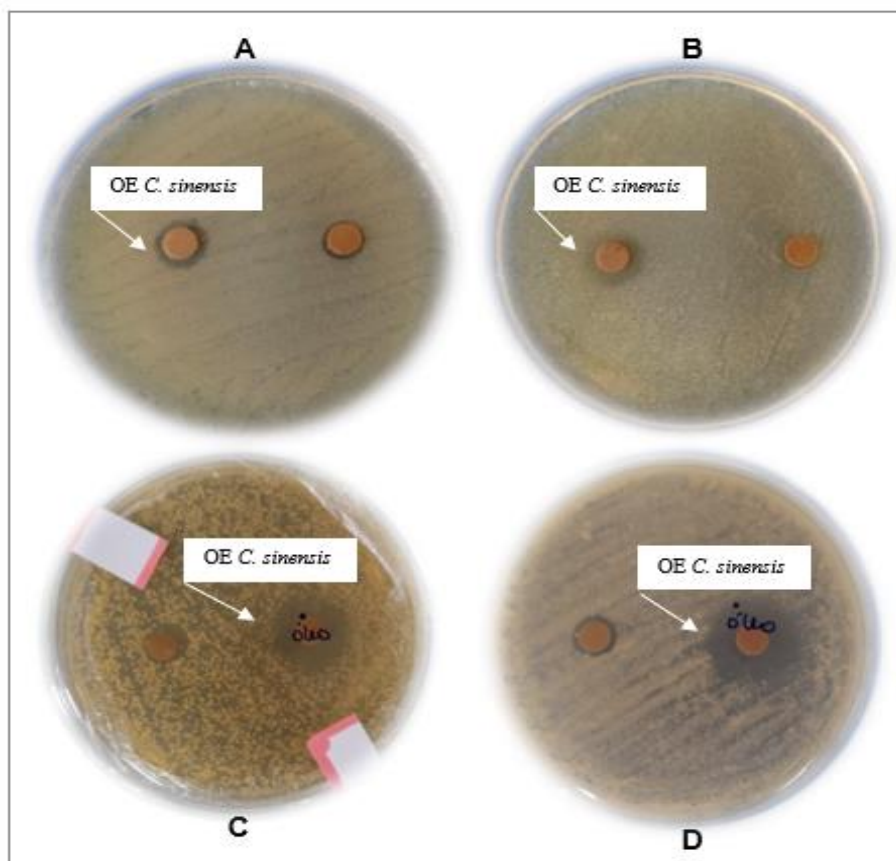
| <i>Amostra</i>            | <i>E. faecalis</i> | <i>E. coli.</i> | <i>C. albicans</i> | <i>M. smegmatis</i> |
|---------------------------|--------------------|-----------------|--------------------|---------------------|
| OE <i>Citrus sinensis</i> | ++                 | +               | ++                 | ++                  |

Baixa (+): diâmetro do halo de inibição entre 7 a 12 mm; Moderada (++) : diâmetro do halo de inibição entre 13 a 16 mm; Alta (+++) : diâmetro do halo de inibição superior a 17 mm; Negativo (-): ausência de halo

Os resultados indicaram atividade antimicrobiana frente *Enterococcus faecalis* e a *Escherichia coli*, através do halo de inibição de 13 mm (++) e halo 12 mm (+), respectivamente, bem como a atividade antimicrobiana frente a *Candida albicans* e a *Mycobacterium smegmatis*, com halos de inibição de 13 mm (++) e 16 mm (++) , apresentando intensidade de inibição entre baixa e moderada.

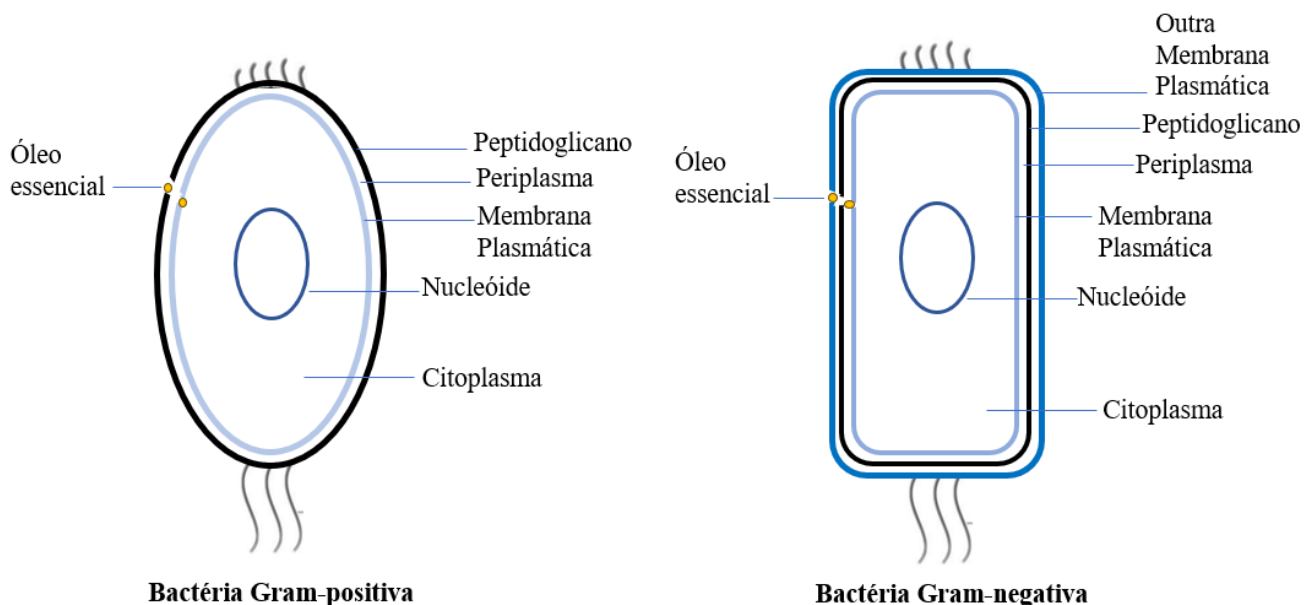
A figura 6. Ilustra o ensaio por difusão de ágar, formação dos halos de inibição com a aplicação do óleo essencial de *C. sinensis* as quatro cepas testadas.

Figura 6. Método de antibiose por difusão em ágar: (A) *C. albicans* ATCC 10231; (B) *M. smegmatis* ATCC 14468, Ensaio antimicrobiano da amostra: (C) *E. faecalis* ATCC 29212; (D) *E. coli* ATCC 25922.



Em estudos realizados por Bajpai e colaboradores, (2012), a ação antimicrobiana de óleos essenciais pode estar atribuída à sua capacidade em penetrar as membranas bacterianas e possibilitar a difusão e a ação dos óleos essenciais dentro das células (Lambert *et al.*, 2001; Randrianarivelo *et al.*, 2009). De fato, a permeabilidade das membranas celulares é dependente na hidrofobicidade dos solutos que têm que atravessar a membrana e a composição da membrana (Sikkema *et al.*, 1995). Esta alteração da permeabilidade também é citada por Lambert e colaboradores, (2001), confirmando que os compostos hidrofóbicos comprometem a integridade da membrana celular bacteriana. A Figura 7, ilustra o óleo essencial adentrando as membranas bacterianas.

Figura 7. Ilustração do óleo essencial adentrando as membranas bacterianas gram-positiva e gram-negativa.



A autora, 2023. Adaptado de <https://www.researchgate.net/>.

Costa e colaboradores, (2012), verificaram que a atividade antimicrobiana de óleos essenciais das cascas de frutas cítricas estudadas está relacionada a sua constituição química que pode ser influenciada pelo método de extração e pelas condições de cultivo da planta. Para a amostra testada, pôde-se comprovar uma moderada atividade antimicrobiana frente *E. faecalis*, este resultado pode indicar uma ação antimicrobiana de substâncias majoritárias como o Limonen-10-ol e o  $\beta$ -pineno ou o efeito sinérgico entre outros compostos.

Ambrósio *et al.*, (2016, conforme citado por Al-Bayati, 2008), sugeriram que bactérias gram-negativas são mais tolerantes a tratamentos com óleos essenciais devido ao fato de possuírem uma membrana externa impermeável, que bloqueia a passagem de óleos essenciais hidrofóbicos na membrana celular. Tal mecanismo foi observado com o microrganismo *Escherichia coli*. (Gram-negativa), a qual apresentou maior resistência, indicando halo de 7 a 12 mm baixa inibição (+), com a aplicação de 30  $\mu$ L na técnica de difusão em ágar. Estudos desenvolvidos por Atolani *et al.*, 2020, apresentaram halos de inibição variando entre 18 e 10 mm para a mesma bactéria. As cepas *Candida albicans*, *E. faecalis* as quais apresentaram halos de 13 a 16 mm, considerados moderados (++), estudos desenvolvidos por Gupta e colaboradores, 2021 apresentam para a bactéria *Candida albicans* halo de inibição de variando entre 12 e 14 mm (sendo esse um fungo) e halos de inibição de 11 mm para *E. faecalis* (Bozkurt *et al.*, 2017),

instruindo que o óleo essencial de *C. sinensis* mostrou ação inibitória, tratando-se de uma bactéria gram-positiva, disponibilizando uma rota de ataque mais fragilizada, em comparação as outras bactérias.

Abers *et al.*, (2021), analisaram a atividade antimicrobiana para a bactéria *M. smegmatis*, utilizando-se da variação de 20 a 40 µL de óleo essencial de *C. sinensis*, alcançaram o halo de inibição entre 19 e 22 mm, por analogia o óleo da região amazônica testado, firma sua eficácia a aplicabilidade, pois para o teste com a mesma cepa apresentou halo de inibição com a variação entre 13 e 16 mm para 30 µL, contribuindo para a eficiência da atividade antimicrobiana testada do óleo.

Na tabela 4 observamos os resultados das atividades antimicrobiana para o limoneno padrão.

Tabela 4. Resultados das atividades antimicrobianas do limoneno padrão frente aos microrganismos *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Candida albicans* e *Mycobacterium smegmatis*, bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e fungo.

| <i>Amostra</i>    | <i>S. aureus</i> | <i>E. coli.</i> | <i>C. albicans</i> | <i>M. smegmatis</i> |
|-------------------|------------------|-----------------|--------------------|---------------------|
| Limoneno (padrão) | +                | ++              | +++                | +++                 |

Baixa (+): diâmetro do halo de inibição entre 7 a 12 mm; Moderada (++): diâmetro do halo de inibição entre 13 a 16 mm; Alta (+++): diâmetro do halo de inibição superior a 17 mm; Negativo (-): ausência de halo

O padrão limoneno da mesma forma detectou da atividade antimicrobiana frente as cepas testadas entre baixa, moderada a alta intensidade, *Staphylococcus aureus*, com halo de inibição de baixo (+) de 12 mm, *Escherichia coli*, com halo de inibição moderado (++) de 15 mm, *Candida albicans* e *Mycobacterium smegmatis* indicaram halos de inibição alto (+++) com 30 mm e 20 mm respectivamente.

Em um comparativo entre o OE de *C. sinensis* e o limoneno padrão, pode-se observar a maior intensidade da ação antimicrobiana do padrão frente as cepas testadas, entretanto a atividade antimicrobiana do OE se manifestou, com halos de inibição entre baixo e moderado, indicando a potencialidade antimicrobiana do mesmo.

O limoneno é conhecido por ser ativo contra muitos agentes patogênicos bactérias envolvidas em diversas doenças, como doenças respiratórias ou de pele, estudos observam o limoneno como constituinte principal sendo uma razão para atividade antibacteriana demonstrada por óleos essenciais cítricos (Gupta; Jeyakumar; Lawrence, 2021).

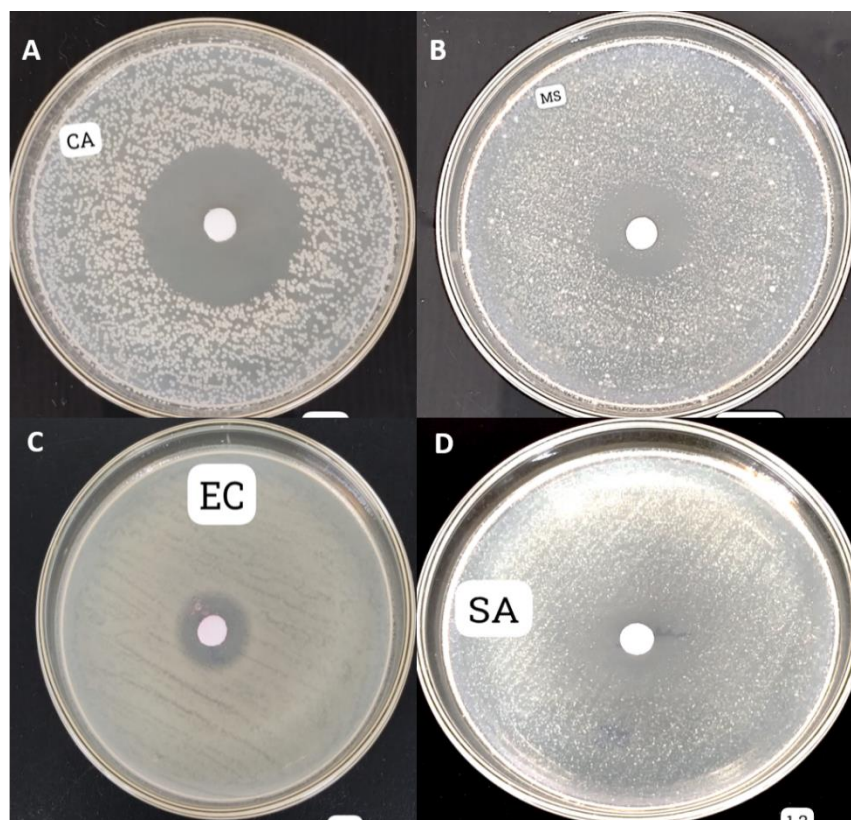


A aplicação de limoneno no nível de 40  $\mu\text{L}/\text{mL}$ , mostrou uma zona de inibição com  $14,4 \pm 0,6$  mm de diâmetro, inibição significativa a reprodução de *Candida tropicalis* (Yu *et al.*, 2022). O mesmo mostrou um efeito antibacteriano significativo a atividade no crescimento e reprodução de *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), bactéria Gram-positiva. O número de colônias diminuíram gradualmente com o aumento da concentração de limoneno. Além disso, quando a concentração de limoneno, nenhuma colônia foi observado crescimento nas placas de cultura para a aplicação de 20 ml/L (Han; Chen; Sun, 2021).

A aplicação de limoneno, demonstrou indicativos de efeitos inibitórios sobre o crescimento de *Zygosaccharomyces rouxii*, com zona de inibição de (7,8 mm), a dosagem de (0,75 e 3  $\mu\text{L}/\text{mL}$ ), tal microrganismos trata-se de uma levedura responsável para deterioração do concentrado de suco de maçã e outros alimentos industrializados com alto teor de açúcar (Cai *et al.*, 2019).

A figura 8. Ilustra o ensaio por difusão de ágar, formação dos halos de inibição com a aplicação do padrão limoneno as quatro cepas testadas.

Figura 8. Método de antibiose por difusão em ágar, ensaio antimicrobiano frente as bactérias indicadoras: (A) *Candida albicans* ATCC 10231, (B) *Mycobacterium smegmatis* ATCC 14468, (C) *Escherichia coli* ATCC 25922, (D) *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.



Por fim, destaca-se o potencial biológico do óleo essencial de *Citrus sinensis* em sua atividade antimicrobiana no controle de microrganismos patogênicos, incluindo bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e fungos. No entanto, é importante notar que sua capacidade de inibição é menos intensa do que a do padrão limoneno. Essa diferença pode ser atribuída à composição química do óleo estudado, que possui um teor de limoneno mais baixo em comparação com os óleos essenciais cítricos de *Citrus sinensis* de outras regiões.

#### 5.4. Bioatividade inseticida por fumigação com adultos da espécie *Sitophilus oryzae*

##### 5.4.1. Óleo essencial de cascas de *Citrus sinensis*

Os óleos essenciais caracterizam-se pela vasta composição química em sua unidade, interações e composições moleculares diferentes, que podem variar devido ao clima, época do ano e região. A Tabela 4 apresenta os valores calculados para a o tempo de exposição de 48 h em diferentes dosagens do óleo essencial de *Citrus sinensis*.

Tabela 4. Valores estatísticos para aplicação de diferentes dosagens do OE de *Citrus sinensis*, Grau de Liberdade (GL) e Probabilidade de significância.

| Fator de variação | Grau de Liberdade | Soma dos quadrados | Quadrado Médio | Valor de F | Probabilidade de significância |
|-------------------|-------------------|--------------------|----------------|------------|--------------------------------|
| Dose              | 4                 | 0,03457            | 0,008642       | 8,2353     | 0,0004276                      |
| Resíduo           | 20                | 0,02099            | 0,001049       | --         | --                             |

Partindo das mortalidades corrigidas, observou-se que apenas as dosagens no tempo de 48h diferiram do controle, apresentaram mortalidade superior à do controle, grau de liberdade (GL) = 4; Valor de F (F) = 8,2353 e probabilidade de Significância ( $p$ ) < 0,0004276. Através do método ANOVA o valor de  $F_{\text{calc}} > F_{\text{tab}}$ , logo teve significância acima citado, aceitando a hipótese de que as dosagens influenciarem na mortalidade apenas para o grupo de 48h.

A mortalidade corrigida representa a mortalidade efetiva causada pelo material testado em questão, com eliminação da mortalidade natural a qualquer população (Abbott, 1925). A Tabela 5 apresenta a média da mortalidade para as diferentes dosagens do OE de *C. sinensis*.

Tabela 5. Mortalidade corrigida para o tempo de 48 h, teste com OE de *Citrus sinensis*, da espécie *Sitophilus oryzae* adultos.

| Dose       | Mortalidade corrigida<br>(Media ± EP)<br>48 h |
|------------|---|
| 0µl/L      | 0,0 ± 6,09 b                                  |
| 57,14µl/L  | 0,0 ± 7,03 b                                  |
| 228,56µl/L | -4,4 ± 4,44 b                                 |
| 457,12µl/L | 6,7 ± 5,67 a                                  |
| 914,20µl/L | -2,2 ± 5,44 b                                 |

É possível observar uma taxa de mortalidade corrigida de 6,7% na dosagem de 457,12µl/L, a qual apresenta uma mortalidade corrigida próxima ao padrão do limoneno ( $\geq 95\%$ ), que foi de 6,04% para a dosagem de 57,14µl/L (conforme Tabela 7). Isso significa que é necessário utilizar uma dose mais alta do óleo essencial de *Citrus sinensis* para causar a morte dos adultos de *Sitophilus oryzae*. A mortalidade corrigida para a dosagem de 57,14µl/L do OE de *C. sinensis* foi semelhante à do grupo controle, enquanto as dosagens de 228,56µl/L e 914,20µl/L apresentaram valores negativos, possivelmente devido ao efeito da hormoligose.

O termo hormoligose foi utilizado na literatura entomológica, antes de hormese, sendo palavra de origem grega (hormo = excita; estimula e oligo = pequena quantidade; insuficiente) e significa o fenômeno no qual quantidades subletais de agentes estressantes podem ser benéficas para organismos (Luckey, 1968; Morse, 1998). Hormese, também do grego “hormaein” que significa “excitar”, foi originalmente definido como um comportamento bifásico, no qual uma característica biológica é estimulada por baixas doses de um composto, mas inibida por altas doses do mesmo (Bukowski & Lewis, 2000; Calabrese & Baldwin, 2000; Calabrese & Baldwin, 2001; Turturro *et al.*, 2001; Calabrese & Baldwin, 2002, *apud*, Jusselino Filho, 2002). A Figura 8, ilustra o teste de fumigação com *S. oryzae* adultos, com diferentes concentrações de óleo essencial, o teste trata de uma pequena simulação de uma câmara de gás.

Figura 9. Teste de fumigação com *Sitophilus oryzae* adultos, com diferentes concentrações de óleo essencial de *Citrus sinensis*.



Fonte: A autora, 2023.

A composição química do óleo essencial pode ser um dos fatores que atribuiu para a letalidade reduzida no teste de bioatividade inseticida, o OE de *Citrus sinensis* da região do Rio Preto da Eva/AM difere em sua composição as porcentagem dos constituintes, sendo uma divisão mais homogênea entre seus constituintes majoritários, o Limoneno-10-ol (8,26%), monoterpene pertencente na composição do OE citado nesse trabalho, substância a qual se fez o comparativo como padrão de letalidade, apresenta-se em menor concentração a vista de outros OE de *Citrus sinensis* de outras regiões.

Estudos desenvolvidos para testes da ação biopesticidas com OE de *C. sinensis*, apresentou  $CL_{50\%}$  95,63% no tempo de 24h e tem D-limoneno como majoritário na proporção de 59,30%, da região de Quabain/USA (Oyedeji et., al, 2020). Avaliações para o efeito inseticida também com o OE e de *C. sinensis* para um óleo com a composição de D-limoneno (73.24%) e  $CL_{50\%}$  de 52,06% para 48h, da região de Nova Delhi/Índia (Kumar, et al, 2011).

A variabilidade da composição química dos constituintes majoritários do óleo da região de Rio Preto da Eva/Am, este com uma menor concentração de Limoneno-10-ol, apresentou taxa de mortalidade, entretanto não em taxa elevadas como o padrão limoneno testado, contudo

o OE em dosagens mais elevadas ocasionou o fenômeno da hormoligose. Essas características podem influenciar nas propriedades biopesticidas e inseticidas do óleo, tornando-o potencialmente mais ou menos eficaz dependendo do contexto e dos objetivos de uso.

#### 5.4.2. Limoneno padrão 95% de pureza

A Tabela 6 abaixo ilustra os valores encontrados para o bioensaio com o limoneno, utilizado como padrão, para o tempo de 48 h de exposição;

Tabela 6. Valores estatísticos para o teste com o padrão limoneno com pureza de  $\geq 95\%$ , Grau de Liberdade (GL) e Probabilidade de significância;

| <b>Fator de variação</b> | <b>Grau de Liberdade</b> | <b>Soma dos quadrados</b> | <b>Quadrado médio</b> | <b>Valor de F</b> | <b>Probabilidade de significância</b> |
|--------------------------|--------------------------|---------------------------|-----------------------|-------------------|---------------------------------------|
| <b>Dose</b>              | 4                        | 0,066093                  | 0,0165234             | 18,54             | $1,659 \times 10^{-6}$                |
| <b>Resíduo</b>           | 20                       | 0,017825                  | 0,0008912             | --                | --                                    |

A partir das mortalidades corrigidas, segundo método ANOVA o valor de  $F_{\text{calc}} > F_{\text{tab}}$ , logo para as 48 h de exposição, observou-se que apenas duas dosagens diferiram e apresentaram mortalidade superior ao controle, grau de liberdade (GL) = 4, valor de F (F) = 18,54 e probabilidade de significância ( $p$ )  $< 1,659 \times 10^{-6}$ , aceitando a hipótese de que as concentrações influenciarem na mortalidade apenas para o grupo de 48h, ou seja, entre si, não entre os grupos de 24 e 72h.

O D-limoneno é um inseticida de contato, evapora rapidamente a partir das superfícies tratadas e tem período residual muito curto. Apesar de seu modo de ação não ser muito bem entendido, uma das hipóteses é que o D-limoneno dissolve os lipídios da cutícula do exoesqueleto do inseto, causando sua desidratação e morte, conforme observado em pulgas (Schick e Schick, 1986).

A Tabela 7. Ilustra os valores para a mortalidade corrigida para o tempo de 48 h, observa-se o aumento da mortalidade em acordo com o aumento da dosagem variando entre 6,4 e 14,9%

Tabela 7. Mortalidade corrigida para o tempo de 48 h, teste com o limoneno padrão, na espécie *Sitophilus oryzae* adultos.

| <b>Dose</b> | <b>Mortalidade corrigida (Media <math>\pm</math> EP) 48 h</b> |
|-------------|---|
|-------------|---|

|            |               |
|------------|---------------|
| 0µl/L      | 0,0 ± 1,6 d   |
| 57,14µl/L  | 6,4 ± 1,55 c  |
| 228,56µl/L | 4,3 ± 0,00 c  |
| 457,12µl/L | 10,6 ± 1,36 b |
| 914,20µl/L | 14,9 ± 1,46 a |

É possível observar que, nas diferentes concentrações testadas, que variaram de 57,14µL/L a 228,56µL/L, não houve um aumento na mortalidade corrigida. No entanto, nas concentrações mais elevadas, houve um aumento significativo na taxa de mortalidade. O limoneno, por sua vez, apresentou uma CL<sub>25%</sub> (Concentração Letal de 25% da população) de 19,75%, com intervalos de confiança de 6,04 a 64,47 durante um período de 48 horas (ver Tabela 6), a CL<sub>50%</sub> não foi possível ser calculada, pois não houve significância na mortalidade corrigida para tal, bem como para os tempos de 24 e 72 h de exposição, tais resultados foram obtidos pelo teste de delineamento casualizados do limoneno isolado, o produto limoneno tem por sua capacidade o aumento da toxicidade quando presente em quantidades significativas na composição óleo;

Tabela 8. Concentração Letal - CL<sub>25%</sub> limoneno teste de delineamento casualizados;

| Produto  | <sup>a</sup> Gl | <sup>b</sup> n | <sup>c</sup> β | <sup>c</sup> z | <sup>d</sup> p | <sup>e</sup> CL <sub>25%</sub> | <sup>f</sup> IC <sub>95%</sub><br>Inf. | <sup>g</sup> IC <sub>95%</sub><br>Sup. |
|----------|-----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|--------------------------------|--|--|
| Limoneno | 4               | 25             | 0,56±0,27      | 2,09           | 0,0366         | 19,74                          | 6,04                                   | 64,47                                  |

<sup>a</sup>Grau de liberdade; <sup>b</sup>Número de repetições; <sup>c</sup>Valor calculado do teste t; <sup>d</sup>Probabilidade de significância do valor de t, <sup>e</sup>Concentração letal média, para as diferentes concentrações em um mesmo tempo de exposição, <sup>f</sup>Intervalo de confiança inferior a 95% para diferença entre duas médias; <sup>g</sup>Intervalo de confiança a 95% para diferença entre duas médias;

A Figura 9, apresenta o teste de fumigação com *Sitophilus oryzae* adultos, para diferentes concentrações do limoneno padrão, com a finalidade de aferir a ação e letalidade da substância testada.

Figura 10. Teste de fumigação com *Sitophilus oryzae* adultos, com diferentes concentrações de limoneno.



Fonte: A autora, 2023.

### 5.5. Avaliação do efeito alelopático

Óleos essenciais produzidos por plantas aromáticas podem desempenhar muitas funções relacionadas às interações vegetais, além de serem importantes fontes de aleloquímicos (Saharkhiz *et al.*, 2010), capazes de afetar a germinação de outras espécies (Thiesen *et al.*, 2019). Vale ressaltar que os aleloquímicos, a depender da concentração e da espécie testada, podem agir tanto como estimuladores quanto como inibidores do desenvolvimento das sementes, causando alterações em diferentes processos metabólicos relacionados à germinação (An; Johnson; Lovette, 1993; Rezende *et al.*, 2003).

A amostra OE de *Citrus sinensis*, foi testada sob o efeito alelopático realizando tratamentos com diferentes concentrações, analisando o desempenho do óleo sob as sementes. Na Tabela 9, observou-se que o índice de velocidade, o tempo médio entre as germinações e o coeficiente de velocidade mantiveram-se constante, não havendo influência do óleo sob elas. Contudo, houve uma expressiva mudança entre o crescimento radicular e da velocidade de germinação das sementes do feijão manteiguinha, para T4, o qual foi utilizado 500 $\mu$ L de OE de *Citrus sinensis*, houve um crescimento radicular frente ao óleo de soja, ou seja, no tratamento

feito no grão o OE de *Citrus sinensis* apresentou um efeito alelopático positivo, estimulando o crescimento.

Tabela 9. Resumo das médias de germinação de sementes de feijão-manteiguinha sob efeito do OE de *Citrus sinensis*, com as diferentes concentrações aplicadas.

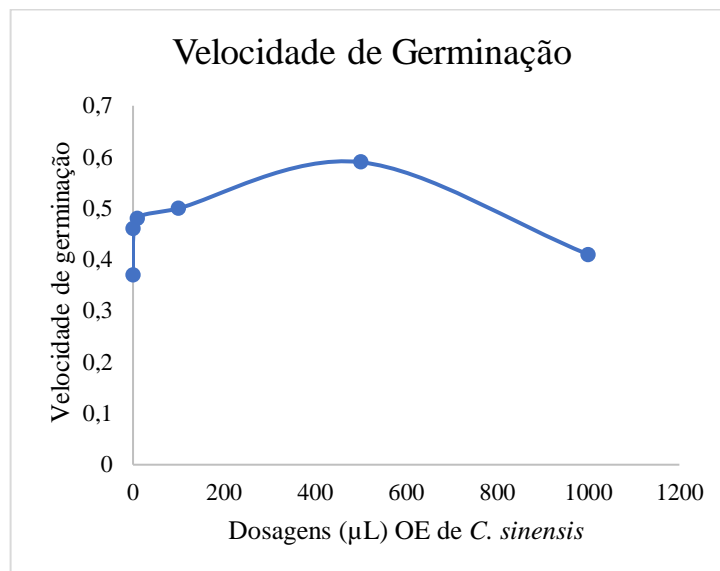
| <i>Tratamento</i> | <i>Germinação</i> | <i>TMG<sup>a</sup></i> | <i>VG<sup>b</sup></i> | <i>IVG<sup>c</sup></i> | <i>CR<sup>d</sup></i> |
|-------------------|-------------------|------------------------|-----------------------|------------------------|-----------------------|
| T0 <sup>h</sup>   | 56 A <sup>f</sup> | 2,15 A                 | 0,46 A B <sup>g</sup> | 16,74 A                | 22,96 A B             |
| T1 <sup>i</sup>   | 43 A              | 2,72 A                 | 0,37 A                | 10,77 A                | 15,46 A               |
| T2 <sup>j</sup>   | 59,5 A            | 2,12 A                 | 0,48 A B              | 19,32 A                | 23,22 A B             |
| T3 <sup>l</sup>   | 55,5 A            | 2,00 A                 | 0,50 A B              | 16,95 A                | 26,63 A B             |
| T4 <sup>m</sup>   | 55 A              | 1,75 A                 | 0,59 B                | 17,75 A                | 36,09 B               |
| T5 <sup>n</sup>   | 42 A              | 2,60 A                 | 0,41 A B              | 10,73 A                | 21,55 A B             |
| C.V <sup>e</sup>  | 32,04             | 22,23                  | 19,14                 | 40,17                  | 36,00                 |
| Média             | 51,83             | 2,22                   | 0,47                  | 15,38                  | 24,32                 |

<sup>a</sup>TMG- Tempo Médio de Germinação; <sup>b</sup>VG- Velocidade de germinação; <sup>c</sup>IVG- Índice de velocidade de germinação; <sup>d</sup>CR- Comprimento radicular; <sup>e</sup>CV- Coeficiente de velocidade; <sup>f</sup>A – Média maior (maior atividade); <sup>g</sup>B – Menor média (menor atividade), <sup>h</sup>T0 – Controle água; <sup>i</sup>T1 – Controle óleo de soja; <sup>j</sup>T2; <sup>l</sup>T3; <sup>m</sup>T4, <sup>n</sup>T5 - Tratamentos com óleo de soja e óleo essencial em diferentes dosagens.

No Gráfico 1. Para o tratamento T4, o crescimento significativo na velocidade de germinação, e para os demais tratamentos com óleo essencial de *Citrus Sinensis* não houve diferenciação em comparação com o controle, a vista que no ponto citado acima, houve um favorecimento na velocidade de germinação e não decréscimo da mesma, mesmo com o aumento da dosagem.

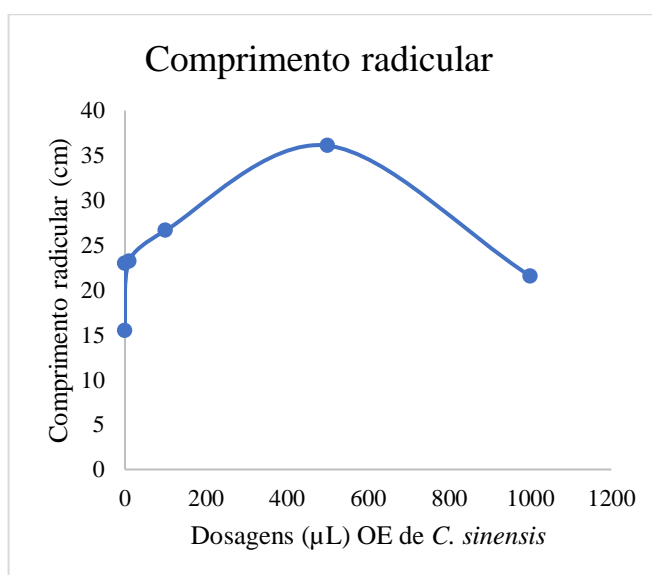


Gráfico 1. Velocidade de germinação do feijão frente aos tratamentos por contato com o óleo essencial de *Citrus sinensis* com óleo de soja, água e óleo de soja e como controle, T0, T1, T3, T4 e T5.



Na ação das concentrações de óleo essencial, a velocidade de germinação baseia-se na massa seca da raiz ou parte aérea, bem como o comprimento das plântulas ou radículas, são os parâmetros mais usados para avaliar o efeito alelopático sobre o crescimento (Jacobi e Ferreira, 1991; Inderjit e Dakshini; 1995; Pratley *et al.*, 1999, *apud*, Ferreira e Aquila, 1999).

Gráfico 2. Comprimento radicular feijão manteiguinha frente a tratamentos com OE de *C. Sinensis*



Esses resultados sugerem que o tratamento com uma dosagem específica (T4) desencadeou uma resposta altamente benéfica para o crescimento do sistema radicular, indicando a presença de substâncias alelopáticas que potencializaram o desenvolvimento das

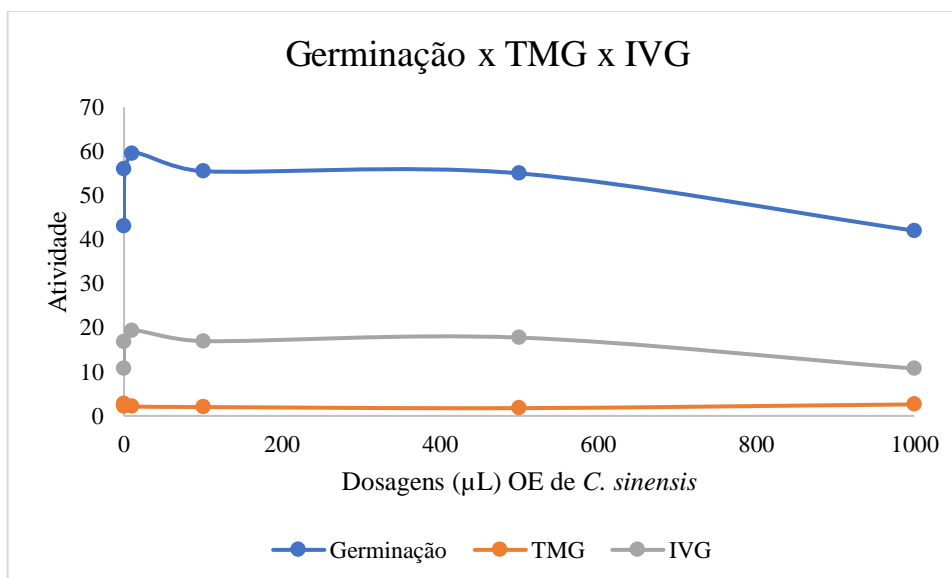
raízes da planta no solo. Por outro lado, as demais dosagens (T2, T3 e T5) também tiveram algum impacto, mas em menor escala, indicando que a concentração das substâncias alelopáticas pode influenciar a magnitude do efeito no crescimento radicular.

Estudo desenvolvido com picão-preto (*Bidens pilosa*) por Sartori (2022), o óleo essencial de laranja influenciou no comprimento das raízes de feijão preto e nabo, sendo o menor valor de crescimento radicular na maior dose aplicada.

Em análises conduzidas por El Sawi *et al.*, (2019) foi possível observar reduções significativas na porcentagem de germinação, comprimento da parte aérea da plântula, comprimento da raiz da plântula e massa fresca do total de plântulas de *H. annuus*, *P. oleracea*, *L. albusassim* e *M. parviflora*. Uma inativação completa do crescimento das mudas foi obtida especialmente nas maiores concentrações de todos os óleos essenciais (*C. sinensis*, *C. reticulata*, *C. aurantium*) testados.

No Gráfico 3, os resultados revelam que a germinação das sementes, o tamanho médio de germinação e o índice de velocidade de germinação mantiveram-se constantes e semelhantes ao grupo controle. Os dados evidenciam que o tratamento com o óleo essencial não teve um efeito estimulante nem inibitório na taxa de germinação das sementes, bem como na velocidade e uniformidade desse processo. As sementes submetidas ao tratamento com o óleo essencial apresentaram resultados comparáveis aos do grupo controle, sugerindo que a presença dessa substância não afetou negativamente o processo de germinação.

Gráfico 3. Germinação, Tamanho médio de germinação (TMG), Índice de velocidade de germinação (IVG) do feijão manteiguinha frente a tratamentos com OE de *C. Sinensis*.



Os coeficientes de velocidade apresentaram valores com margens de erro, isso implica que pode ter ocorrido falhas no processamento do teste. Um dos critérios de análise é a forma de armazenamento pois antes de armazenar as sementes elas podem ser tratadas com produtos de origem vegetal na forma de pós, extratos ou óleos, pois os mesmos podem causar mortalidade, repelência, inibição e também comprometimento do desenvolvimento dos insetos. Estes tratamentos são vantajosos, pois entram em contato com toda a superfície das sementes, sendo que tais procedimentos devem ser rápidos para evitar o excesso de embebição e não devem interferir na germinação das sementes (Almeida *et al.*, 2009).

Na Figura 10, pode-se observar o crescimento radicular das sementes, onde fatores genéticos podem ter influenciado na velocidade de germinação das sementes de feijão. Alguns autores têm associado o potencial alelopático dos óleos essenciais, entre outros fatores, ao seu conteúdo de terpenoides, uma vez que esses compostos podem alterar a permeabilidade da membrana celular, reduzir a atividade enzimática e interferir nos processos de transcrição de DNA e tradução de RNA, prejudicando a germinação de sementes e o crescimento de plântulas (El-Shora; Abd El-Gawad *et al.*, 2014)

Figura 11. Crescimento das radículas das sementes de feijão manteiguinha ao final do período de 7 dias.



A substituição de agroquímicos por substâncias extraídas de plantas com ação fungicida vem sendo pesquisada no meio agrícola. Os óleos essenciais e seus constituintes estão sendo explorados para o manejo de ervas daninhas e pragas (Atak, Mehmet *et al.*, 2016). Diversos trabalhos vêm demonstrando a eficiência de óleos essenciais e extratos vegetais na inibição de fungos fitopatogênicos (Amaral; Bara, 2005; Santos., 2010).

Neste estudo pode-se observar que a aplicação do óleo essencial de *C. sinensis* não teve efeito prejudicial a semente, e em um tratamento agiu como bioestimulante do crescimento radicular e na velocidade de germinação, indo a contra mão da literatura a qual a ação de óleo essencial de laranja inibe o crescimento das sementes.

## 5.6. Avaliação do teste antioxidante ABTS•+ e DPPH

Pela ação de um antioxidante, esses radicais são reduzidos, causando um decréscimo de absorvância. Sendo assim, a partir dos resultados obtidos, determina-se a porcentagem de atividade antioxidante, ou seja, a quantidade de ABTS que foram consumidas pelo antioxidante. (Oliveira *et al.*, 2009).

Tabela 10. Resultados de ensaio antioxidante no óleo essencial de *Citrus sinensis*

| Amostra                      | ABTS IC <sub>50</sub> <sup>a</sup> (µmol ET/mL) | Erro |
|------------------------------|---|------|
| OE de <i>Citrus sinensis</i> | 0,951 ± 0,045                                   | 5%   |

<sup>a</sup>IC<sub>50</sub>: concentração inibitória; Média ± DP, n = 3;

O óleo essencial de *C. sinensis* demonstrou um valor de IC<sub>50</sub> de 0,951 µmol ET/mL no ensaio de ABTS•+, indicando baixa atividade antioxidante, para o ensaio de DPPH, não apresentou atividade.

Pesquisas realizadas por Neuhaus e Cassanta (2018) apresentaram para o teste de ABTS•+, IC<sub>50</sub> de 1,1µmol ET/mL para óleo de *C. sinensis*. Os valores de µmol ET/mL são obtidos a partir da capacidade de um antioxidante individual ou uma mistura para inibir a ABTS•+ em um ponto de tempo definido, relativo ao Trolox (Re, Roberta *et al.*, 1999).

Os métodos DPPH e ABTS•+ são baseados na estabilização de radicais, e a ausência de atividade é justificada pela dificuldade dos compostos de terpeno presentes no óleo essencial para doar um hidrogênio para neutralizar o radical (Magalhães *et al.*, 2020). De acordo com Manzur *et al.* (2023) alguns autores atribuem a atividade antioxidante dos óleos essenciais cítricos (laranja, limão e toranja) às frações volatilizáveis, principalmente monoterpenos, enquanto outros pesquisadores atribuíram isso à presença de compostos fenólicos (Guneser; Zorba; Yilmaz, 2018).

Estudos conduzidos por (Lin *et al.*, 2021), quantificaram pelo método de ABTS•+ a atividade antioxidante para o OE de *C. sinensis* de IC<sub>50</sub> 4,17 mg/mL, (Dawidowicz *et al.*, 2014) descobriram que as propriedades antioxidantes de um OE nem sempre dependem da atividade

antioxidante de seu componente principal sinérgicos, antagônicos e efeitos aditivos são muito relevantes. Valores de IC<sub>50</sub> na faixa de 28,5 - 63,43 mg/mL foram relatados por De Montijo-Prieto *et al.* (2021), observando em seu estudo que a atividade antioxidante pode ser atribuída ao teor de limoneno, mas também ao teor de outros monoterpenoides.

Segundo estudos desenvolvidos por Yi *et al.* (2018), as atividades antioxidantes de muitos componentes individuais de OE em ensaios de ABTS•+ e segundo Lin *et al.*, (2021), embora o limoneno seja o componente predominante da maioria dos OEs cítricos, o timol e  $\gamma$ -terpineno são componentes importantes encontrados de eliminação de radicais ABTS•+. No OE cítrico analisado nesse contexto, o monoterpeno hidrogenado  $\gamma$ -terpineno (2,3%), sendo um quantitativo significativo em comparação com óleos essenciais cítricos de outras regiões.

É perceptível a evidência da atividade antioxidante relativamente reduzida presente no óleo essencial de *Citrus sinensis*, ao se comparar com a literatura disponível e com a metodologia adotada. Essa diferença pode ser explicada pela possível presença de concentrações insuficientes de um composto majoritário capaz de exercer tal ação antioxidante, no entanto, apesar da baixa ação antioxidante, ela se manifestou.

### **5.7. Avaliação da inibição da acetilcolinesterase *in vitro***

A amostra de OE de *C. sinensis* apresentou atividade no ensaio de inibição da enzima acetilcolinesterase com valor de IC<sub>50</sub> = 72,0  $\mu$ g/mL, esta ação pode estar relacionada a presença dos monoterpenos acíclicos como o linalol e monocíclicos como o  $\gamma$ -Terpineno respectivamente, presente no OE de *Citrus sinensis*. Algumas características, como a presença de um ligante hidrofóbico, podem estar associadas a uma maior efetividade na inibição, já que o sítio ativo da AChE é conhecido por ser susceptível a interações hidrofóbicas. Essas características dos monoterpenos (cíclicos e acíclicos), pode influenciar em sua atividade inibidora da AChE. Para os monoterpenoides bicíclicos com um esqueleto careno ou pinano, o potencial de inibição da AChE foi associado com a posição da dupla ligação (Conforti *et al.*, 2007). Estudos sobre a relação estrutura-atividade entre AChE e monoterpenoides mostraram que os hidrocarbonetos apresentam forte inibição comparados a álcoois e cetonas. A presença do grupo funcional oxigenado diminui a força de inibição de AChE (Miyazawa e Yamafuji, 2005). E mais recentemente, estudos de estrutura-atividade com sesquiterpenoides do tipo bisabolano, por Fujiwara e colaboradores (2010) constataram que estes inibem a AChE na seguinte ordem de potência: cetonas < álcoois < hidrocarbonetos. Outros compostos, como as

cumarinas, também mostraram exercer ação inibitória sobre a enzima AChE. Essa ação pode, por exemplo, ser atribuída ao composto citropteno (5,7-dimetoxicumarina), presente na casca da cidra, ou ao aurapteno (7-27 geraniloxicumarina), presente em *C. paradisi* Macfad., que demonstrou ser um possível inibidor da AChE eritrocitária (Conforti *et al.*, 2007).

### 5.8. Avaliação da inibição da acetilcolinesterase *in silico* por *docking* molecular

Os estudos de *docking* molecular entre a estrutura tridimensional da AChE (1QTI) e os principais componentes do óleo essencial de cascas de laranja, foram conduzidos na região do sítio ativo, anteriormente ocupado pela galantamina. Sabe-se que o sítio ativo dessa enzima está localizado no fundo da sua cavidade, três resíduos de aminoácidos Ser200, His440 e Glu327 formam a chamada tríade catalítica e estão diretamente envolvidos na hidrólise da acetilcolina (Sussman *et al.*, 1991). Além disso, os resíduos de aminoácidos dos subsítios aniônico (Trp86 e Phe330) e periférico (Trp279) também são importantes para o reconhecimento do ligante (Millard *et al.*, 1999; Dvir *et al.*, 2010).

Na Tabela 11 e Figuras 11-13, são apresentados os resultados do *docking* molecular entre os compostos majoritários do óleo essencial de cascas de laranja e a enzima AChE. Os valores de energia de ligação variaram entre -6,2 e -9,6 kcal/mol valores próximos ao inibidor galantamina (energia de ligação do *redocking* = -9,8 kcal/mol, RMSD 0,3678 Å).

Tabela 11. Resultados de *docking* para os principais constituintes do OE de *C. sinensis* ativos frente a AChE.

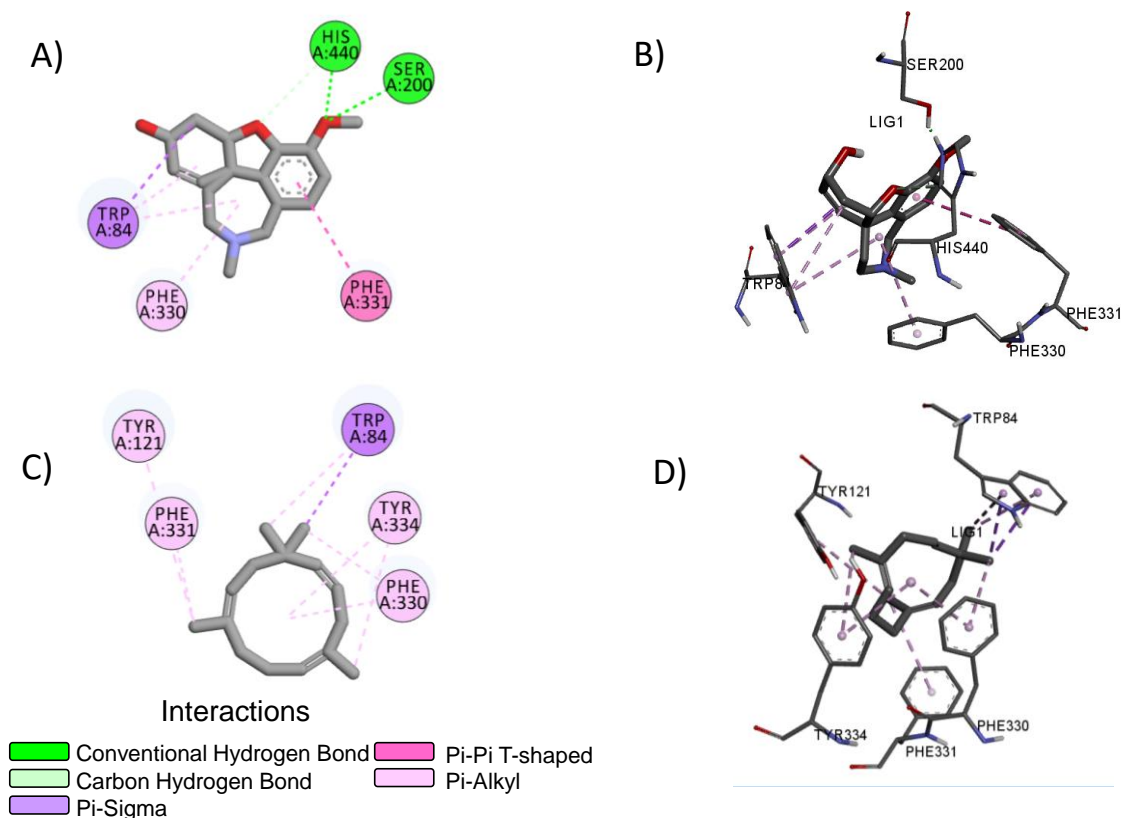
| <i>Compostos</i> | <i>Energia de ligação (Kcal/mol)</i> | <i>Principais interações</i>  |
|------------------|--------------------------------------|---|
| Galantamina      | -9,8                                 | <b>HB<sup>a</sup></b> (Ser200,Gly119,Gly118), <b>PAI<sup>b</sup></b> (Phe330, Trp84,) <b>CH<sup>c</sup></b> (Tyr121). |
| β-Citroneleno    | -6,2                                 | <b>PAI</b> (Phe334), <b>PSI<sup>d</sup></b> ( Trp84, Phe330 e Phe331)   |
| Limoneno         | -7,2                                 | <b>PAI</b> (Phe331, Tyr334 e His440), <b>PSI</b> ( Trp84, Phe330).  |

|                     |      |   |
|---------------------|------|---|
| $\beta$ -Acoradieno | -8,5 | <b>PAI</b> (Phe331, Tyr334 e His440), <b>PSI</b> ( Trp84, Phe330).        |
| $\alpha$ -Humuleno  | -9,6 | <b>PAI</b> (Tyr121, Phe330, Phe331 e Phe334), <b>PSI</b> ( Trp84, Phe84). |

<sup>a</sup>HB- ligação de hidrogênio: <sup>b</sup>PAI-  $\pi$ -alquilo: <sup>c</sup>CH- ligação de hidrogênio carbono: <sup>d</sup>PSI-  $\pi$ -sigma: AC- carga atrativa: PP-  $\pi$ - $\pi$

As interações observadas para a galantamina (Figura 11) estão de acordo com as descritas por Bartolucci e colaboradores (2001), podendo destacar a ligação de hidrogênio com resíduo de Ser200 com o átomo de oxigênio do grupo *O*-metil, enquanto as interações  $\pi$ -alquil foram observadas com os resíduos do subsítio aniônico (Trp84 e Phe330).

Figura 12. Principais interações observadas para o complexo galantamina-AChE em 2D (A) e 3D (B).



De acordo com Bartolucci e colaboradores (2001), a hidroxila presente na molécula da galantamina, interage com duas moléculas de água, que estão firmemente liga a bolsa catalítica pelo Ser200, enquanto, o anel ciclohexeno e dois grupos metileno do anel tetrahydroazepina da

galantamina acham-se voltados para o anel indol Trp84, a dupla ligação do anel ciclohexeno se concentram contra o sistema  $\pi$  do anel indol, originando uma interação  $\pi$ - $\pi$  favorável.

Dentre os compostos testados, o  $\alpha$ -Humuleno apresentou melhor valor energia de ligação (-9,6kcal/mol), as principais interações observadas foram com os resíduos aniônicos: 1) Try121, Try334 e Phe330 (interação  $\pi$ -alquil); 2) Trp84 (interação  $\pi$ -sigma (Figura 11 C e D). Tais resíduos se destacam, visto que são responsáveis pela suposta ligação “aniônica” com o a colina, na cavidade da AChE (Dvir et al., 2010). Os demais compostos também apresentaram interações  $\pi$ -sigma e  $\pi$ -alquil com esses resíduos (Figuras 12 e 13), sugerindo tratar-se de substâncias com interações favoráveis para inibir a AChE, o que foi corroborado pelos dados de inibição biológica.

Figura 13. Modos de ligação simulados dos compostos  $\beta$ -Citroneleno (A), Limoneno (B),  $\beta$ -Acoradieno (C) e  $\alpha$ -Humuleno (D) com TcAChE por diagrama.

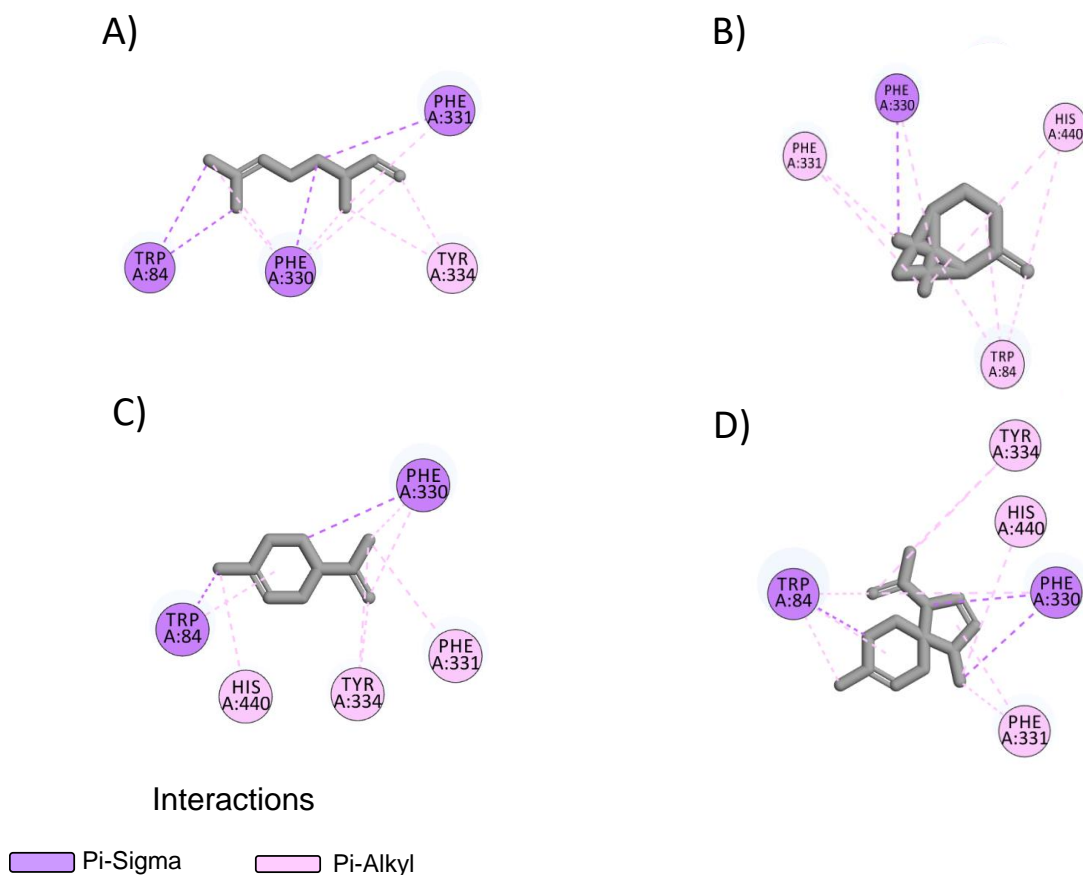
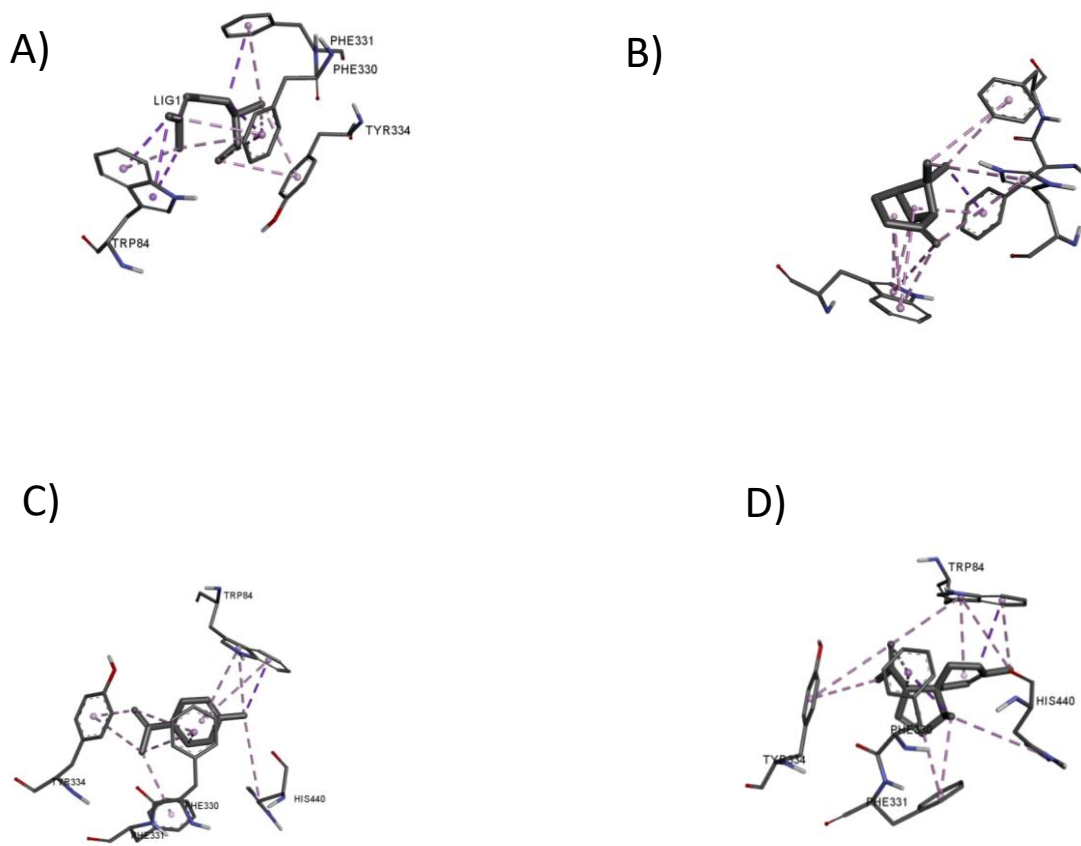




Figura 14. Modos de ligação simulados dos compostos  $\beta$ -Citroneleno (A), Limoneno (B),  $\beta$ -Acoradieno (C) e  $\alpha$ -Humuleno (D) com TcAChE por diagrama 3D.



## 6. CONCLUSÃO

O estudo em questão, objetivou na aplicabilidade da utilização dos resíduos provenientes da indústria de suco de laranja, com o intuito de explorar o potencial biológico do óleo essencial, emerge como um ângulo altamente promissor dentro do conceito de economia circular. Esse enfoque possibilitou a identificação da composição química do óleo essencial das cascas de *Citrus sinensis*, a presença de 33 substâncias majoritárias, destacando-se os monoterpenos e sesquiterpenos de hidrogênio e oxigenados, dos quais, 6 (seis) constituintes se fizeram majoritários, sesquiterpenos hidrogenados:  $\beta$ -Acoradieno (12,47%),  $\alpha$ -Humuleno (10,52%), e monoterpenos hidrogenados:  $\beta$ -pineno (9,63%), Car-3-en-2-one (8,43%), Limonen-10-ol (8,26%) e  $\beta$ -Citroneleno (7,33%).

O ensaio *in vitro* demonstrou atividade inibitória frente a enzima acetilcolinesterase, demonstrando um valor de  $IC_{50} = 72,0 \mu\text{g/mL}$ , sendo esta ação possivelmente referente a presença dos compostos majoritários. Estes resultados se demonstram relevantes, uma vez que os resultados obtidos a partir da avaliação *in silico*, do mesmo modo, demonstram ação inibitória devido aos mesmos componentes, com destaque ao  $\alpha$ -Humuleno, que apresentou valor de energia de ligação próximos ao inibidor Galantamina, sendo um óleo com possível atividade promissora a estudos futuros ao combate à Doença de Alzheimer, observando os terpenoides que se destacaram como:  $\beta$ -Acoradieno e o  $\alpha$ -Humuleno, expressados em sua singularidade da região originária.

O efeito alelopático tornou-se especialmente notório no tratamento T4, onde a aplicação de  $500\mu\text{L}$  de óleo essencial (OE) influenciou tanto o desenvolvimento das raízes quanto a taxa de germinação. Esse fenômeno foi originado pela interação com os compostos secundários típicos da espécie *Citrus sinensis*. Esse achado aponta para um potencial promissor em termos de aplicações e investigações futuras, especialmente no contexto da pesquisa de biofertilizantes.

Com relação à atividade antimicrobiana, é possível observar que o óleo essencial apresenta, de maneira abrangente, uma ação inibitória direcionada às três cepas bacterianas e ao fungo analisados, essa ação se manifestou por meio da formação de zonas de inibição que variaram entre categorias de baixa (+) e moderada (++) . Esse aspecto assume relevância significativa no estímulo à adoção de produtos naturais como agentes eficazes na contenção de bactérias e fungos.

Para os resultados do teste de fumigação para *Sitophilus oryzae* adultos, pode-se observar a aplicabilidade do óleo essencial a taxa de mortalidade corrigida de 6,7% na dosagem de 457,12µl/L e para nas maiores dosagens de óleo essencial ocasionou o fenômeno da hormoligose, para o padrão limoneno a taxa de mortalidade corrigida variou de acordo com o aumento da dosagem entre 6,4 e 14,9% e CL<sub>25%</sub> de 19,75%, ambos dos testes para no tempo de 48h, tal resultado ilustra a resistência da espécie *Sitophilus oryzae* e confirma a ação inferior das outras substâncias majoritárias presentes no óleo como possível biopesticidas.

O ensaio de atividade antioxidante apresentou atividade e IC<sub>50</sub> de 0,951 (µmol ET/mL) no ensaio de ABTS•+, entretanto, quando comparado com dados disponíveis na literatura, esse valor é considerado baixo em termos de inibição antioxidante, o teste de DPPH não apresentou atividade, essas informações são relevantes para melhor compreender as propriedades antioxidantes do óleo essencial de *C. sinensis* e sua utilização em diferentes aplicações.

Nesse contexto, o presente estudo desempenha um papel crucial ao enriquecer nossa compreensão sobre um subproduto derivado da espécie *Citrus sinensis*. Destaca-se a estratégia adotada para maximizar a utilização de recursos, ao transformar os resíduos resultantes da indústria do suco de laranja, alinhando-se assim com os princípios da economia circular. Esse enfoque confere valor tanto do ponto de vista econômico quanto científico ao produto final: o óleo essencial extraído do *Citrus sinensis*.

Essa valorização é manifesta em sua composição e características, as quais desempenham um papel central em diversas atividades biológicas analisadas, como propriedades antimicrobianas, antioxidantes, efeito alelopático e inibição da enzima acetilcolinesterase. Como resultado, o óleo essencial proveniente do *Citrus sinensis* emerge como uma alternativa natural e viável para uma variedade de aplicações, contribuindo significativamente para a promoção do uso de produtos de origem natural.

## 7. REFERÊNCIAS

ABBOTT, Walter S. et al. A method of computing the effectiveness of an insecticide. **J. econ. Entomol**, v. 18, n. 2, p. 265-267, 1925.

ATAK, Mehmet et al. Bio-herbicidal effects of oregano and rosemary essential oils on germination and seedling growth of bread wheat cultivars and weeds. **Romanian Biotechnological Letters**, v. 21, n. 1, p. 11149-11159, 2016.

ADAMS, Robert P. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. 5 online ed. Gruver, TX USA: **Texensis Publishing**, 804 p, 2017.

ABERS, Mareshah et al. Antimicrobial activity of the volatile substances from essential oils. **BMC complementary medicine and therapies**, v. 21, n. 1, p. 1-14, 2021.

ABDALLA, Fernando Antônio; SAMPAIO, Antônio Carlos Freire. Os novos princípios e conceitos inovadores da Economia Circular. **Entorno Geográfico**, n. 15, p. 82-102, 2018.

ADEMOSUN, Ayokunle O. et al. Comparison of the inhibition of monoamine oxidase and butyrylcholinesterase activities by infusions from green tea and some citrus peels. **International Journal of Alzheimer's Disease**, v. 2014.

ALMEIDA, Francisco de Assis Cardoso et al. Viabilidade de sementes de feijão macassar tratadas com extrato vegetal e acondicionadas em dois tipos de embalagens. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 31, p. 345-351, 2009.

AMARAL, Mônica Franco Zannini Junqueira. Avaliação da atividade antifúngica de extratos de plantas sobre o crescimento de fitopatógenos. **Revista eletrônica de farmácia**, 2005.

AMBROSIO, Carmen MS et al. Antimicrobial activity of several essential oils on pathogenic and beneficial bacteria. **Industrial Crops and Products**, v. 97, p. 128-136, 2017.

AN, M. I. R. J.; JOHNSON, I. R.; LOVETT, J. V. Mathematical modeling of allelopathy: biological response to allelochemicals and its interpretation. **Journal of Chemical Ecology**, v. 19, p. 2379-2388, 1993.

ANWAR, Farooq et al. Physico-chemical characteristics of citrus seeds and seed oils from Pakistan. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 85, n. 4, p. 321-330, 2008.

AZEVEDO, Damila Silva De. Use of the acetylcholinesterase enzyme inhibition test applied in the study of abiotic degradation of organophosphate pesticides. **Monography. State University of North Fluminense**, Campos dos Goytacazes/RJ, 2013.

ATOLANI, O. et al. Chemical characterization, antioxidant, cytotoxicity, Anti-Toxoplasma gondii and antimicrobial potentials of the Citrus sinensis seed oil for sustainable cosmeceutical production. **Heliyon**, v. 6, n. 2, 2020.

ARAÚJO, Cleônia Roberta Melo; SANTOS, VL dos A.; GONSALVES, A. A. Acetilcolinesterase-AChE: uma enzima de interesse farmacológico. **Revista Virtual de Química**, v. 8, n. 6, p. 1818-1834, 2016.

BAJPAI, Vivek K.; RAHMAN, Atiqur; KANG, Sun Chul. Chemical composition and inhibitory parameters of essential oil and extracts of Nandina domestica Thunb. to control food-borne pathogenic and spoilage bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v. 125, n. 2, p. 117-122, 2008.

BAKKALI, Fadil et al. Biological effects of essential oils—a review. **Food and chemical toxicology**, v. 46, n. 2, p. 446-475, 2008.

BARTOLUCCI, Cecilia et al. Three-dimensional structure of a complex of galanthamine (Nivalin®) with acetylcholinesterase from Torpedo californica: Implications for the design of new anti-Alzheimer drugs. **Proteins: structure, function, and bioinformatics**, v. 42, n. 2, p. 182-191, 2001.

BIZZO, Humberto R.; REZENDE, Claudia M. O mercado de óleos essenciais no Brasil e no mundo na última década. **Química Nova**, v. 45, p. 949-958, 2022.

BROOKS, Emma J.; WILSON, Debra Rose. Reducing Stress and Anxiety During Pregnancy. **International Journal of Childbirth Education**, v. 34, n. 1, 2019..

BOZKURT, Taner; GÜLNAZ, Osman; KAÇAR, Yıldız Aka. Chemical composition of the essential oils from some citrus species and evaluation of the antimicrobial activity. **Journal of Environmental Science, Toxicology and Food Technology**, v. 11, n. 10, p. 29-33, 2017.

BORGES, S. S. Economia Circular ajuda a pensar em novo processo produtivo. Aposta em novo ciclo traz inovação ao design, aumento da vida de produtos e menor geração de resíduos. In: Portal Fiesp, 2015.

CAI, Rui et al. Antifungal activity and mechanism of citral, limonene and eugenol against *Zygosaccharomyces rouxii*. **Lwt**, v. 106, p. 50-56, 2019.

CALO, Julianny Rivera et al. Essential oils as antimicrobials in food systems—A review. **Food control**, v. 54, p. 111-119, 2015.

CARVALHO-FREITAS, Maria Isabel Roth; COSTA, Mirtes. Anxiolytic and sedative effects of extracts and essential oil from *Citrus aurantium* L. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 25, n. 12, p. 1629-1633, 2002.

CHAIYANA, Wantida et al. Characterization of potent anticholinesterase plant oil based microemulsion. **International journal of pharmaceutics**, v. 401, n. 1-2, p. 32-40, 2010.

CHAIYANA, Wantida; OKONOJI, Siriporn. Inhibition of cholinesterase by essential oil from food plant. *Phytomedicine*, v. 19, n. 8-9, p. 836-839, 2012.

CHIKHOUNE, Amirouche et al. *Tetraclinis articulata* (Vahl) Masters essential oils: Chemical composition and biological activities. **Journal of essential oil research**, v. 25, n. 4, p. 300-307, 2013.

CONFORTI, Filomena et al. In vitro activities of *Citrus medica* L. cv. Diamante (Diamante citron) relevant to treatment of diabetes and Alzheimer's disease. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, v. 21, n. 5, p. 427-433, 2007.

COITINHO, Rodrigo Leandro Braga de Castro et al. Toxicidade por fumigação, contato e ingestão de óleos essenciais para *Sitophilus zeamais* Motschulsky, 1885 (Coleoptera: Curculionidae). **Ciência e agrotecnologia**, v. 35, p. 172-178, 2011.

COSTA, DAYANE ALVES et al. Avaliação da toxicidade aguda e do efeito ansiolítico de um derivado sintético da carvona. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, v. 16, n. 3, p. 303-310, 2012.

COSTA, B., Rio Preto da Eva o maior produtor do Amazonas, **Revista Agrofloresta Amazônica**, INNS: 2357-7754, 2023.

CHAUBEY, M. K. et al. Fumigant toxicity of essential oils against rice weevil *Sitophilus oryzae* L.(Coleoptera: Curculionidae). **Journal of Biological Sciences**, v. 11, n. 6, p. 411-416, 2011.

DA ROCHA, Ronys Reis Rodrigues; DE MORAIS FERREIRA, Wanderson; GONÇALVES, Karin Anne Margaridi. Benefícios proporcionados pelo uso de óleos essenciais sobre o sistema nervoso central e sua atividade antimicrobiana: uma revisão literária. **Brazilian Journal of Development**, v. 8, n. 1, p. 229-236, 2022.

DA SILVA BARBOSA, Deyzi Caroline; DA SILVA, Welson Vicente; DOS SANTOS CORREIA, Maria Tereza. Atividade Antioxidante De Óleos Essencias Da Família Myrtaceae Pelo Método De Dpph: Uma Revisão De Literatura. **Revista Interfaces: Saúde, Humanas e Tecnologia**, v. 7, n. 2, p. 325-338, 2019.

DE LIMA, Bruna R. et al. Synthesis and inhibition evaluation of new benzyltetrahydroprotoberberine alkaloids designed as acetylcholinesterase inhibitors. **Frontiers in Chemistry**, v. 7, p. 629, 2019.

DE LIMA, Fúlvia Bezerra; PLACEDES, Janaina; CARDOSO, Cássia Regina. Avaliação do rendimento de hidrodestilação para a produção de óleo essencial das cascas de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck. **Revista Brasileira de Ciência, Tecnologia e Inovação**, v. 4, n. 3, p. 257-266, 2019.

DISCOVERY STUDIO VISUALIZER, V 16.1.0, **AccelrysInc**. San Diego, 2016.

DVIR, Hay et al. Acetylcholinesterase: from 3D structure to function. *Chemico-biological interactions*, v. 187, n. 1-3, p. 10-22, 2010.

DIAS, A. L. B. et al. Chemical composition and in vitro inhibitory effects of essential oils from fruit peel of three *Citrus* species and limonene on mycelial growth of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Brazilian Journal of Biology**, v. 80, p. 460-464, 2019.

DA SILVA, Laís Alves Santana; DE OLIVEIRA, Vinicius Cunha; MENDES, Fabrício Bruno. Principais aplicações dos resíduos da laranja e sua importância industrial. *Revista Artigos. Com*, v. 22, p. e5139-e5139, 2020

DA SILVA, João Henrique Barbosa et al. Uso de bioestimulantes na cultura do milho (*Zea mays* L.): uma revisão. **Scientific Electronic Archives**, v. 16, n. 5, 2023.

DE ASSUNÇÃO, Gardênia Mendes. A gestão ambiental rumo à economia circular: como o Brasil se apresenta nessa discussão. **Sistemas & Gestão**, v. 14, n. 2, p. 223-231, 2019.

DE SOUZA, R. C. S. et al. **Caracterização de espécies afins e relativas do gênero Citrus. 2017.**

DE MELLO SANTOS, Victor. Simulação e análise econômica do processo de desterpenação do óleo de laranja citrus sinensis. Dissertação, - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto Alberto Luiz Coimbra de Pós-Graduação e Pesquisa de Engenharia, Programa de **Pós-Graduação em Engenharia Química**, 2019.

DE LACERDA LEITE, Giovana Mendes et al. Pharmacological and toxicological activities of  $\alpha$ -humulene and its isomers: A systematic review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 115, p. 255-274, 2021.

DEVI, Mayanglambam Alina et al. Chemical compositions and insecticidal efficacies of four aromatic essential oils on rice weevil *Sitophilus oryzae* L. **International Journal of Tropical Insect Science**, v. 40, p. 549-559, 2020.

DE-MONTIJO-PRIETO, Soumi et al. Essential oils from fruit and vegetables, aromatic herbs, and spices: composition, antioxidant, and antimicrobial activities. **Biology**, v. 10, n. 11, p. 1091, 2021.

ELLMAN, George L. et al. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical pharmacology**, v. 7, n. 2, p. 88-95, 1961.

EL SAWI, Salma A. et al. Allelopathic potential of essential oils isolated from peels of three citrus species. **Annals of Agricultural Sciences**, v. 64, n. 1, p. 89-94, 2019.

EL-SHORA, Hamed M.; EL-GAWAD, Abd; AHMED, M. Evaluation of allelopathic potential of *Rumex dentatus* root extract and allelochemicals on *Cicer arietinum*. **Journal of Stress Physiology & Biochemistry**, v. 10, n. 1, p. 167-180, 2014.

ESTRELA, Joelma Lima Vidal et al. Toxicidade de óleos essenciais de *Piper aduncum* e *Piper hispidinervum* em *Sitophilus zeamais*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, p. 217-222, 2006.

FERREIRA, Daniel Furtado. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e agrotecnologia**, v. 35, p. 1039-1042, 2011.



FERNANDES, R., E., CARDOSO, M., G., HOFFMANN, R., S. Aproveitamento da casca da laranja através da extração de óleos essenciais. **11º Congresso de Iniciação Científica e Tecnológica em Engenharia**. Ijuí, 2006.

FERREIRA, A.G., BORGHETTI, F., Germinação: do básico ao aplicado. São Paulo: **Artmed**. 323p., 2004.

FERREIRA, Alfredo Gui; AQUILA, Maria Estefânia Alaves. Alelopatia: uma área emergente da ecofisiologia. **Revista brasileira de fisiologia vegetal**, v. 12, n. 1, p. 175-204, 2000.

FUJIWARA, Mai; YAGI, Nobuo; MIYAZAWA, Mitsuo. Acetylcholinesterase inhibitory activity of volatile oil from *Peltophorum dasyrachis* Kurz ex Bakar (yellow batai) and bisabolane-type sesquiterpenoids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 5, p. 2824-2829, 2010.

FAVELA-HERNÁNDEZ, Juan Manuel J. et al. **Chemistry and Pharmacology of Citrus sinensis**. **Molecules**, v. 21, n. 2, p. 247, 2016.

FREITAS, Rivelilson Mendes de. Potential involvement of oxidative stress in induction of neurodegenerative diseases: **Actions, mechanisms and neurotherapeutic potential of natural antioxidants**. 2014.

FERREIRA, Alfredo Gui; AQUILA, Maria Estefânia Alaves. Alelopatia: uma área emergente da ecofisiologia. **Revista brasileira de fisiologia vegetal**, v. 12, n. 1, p. 175-204, 2000.

FINNEY, D. J. Probit analysis. Cambridge: **Cambridge University Press**, 31p, 1971.

GOMES, Marcos de Souza. Caracterização química e atividade antifúngica dos óleos essenciais de cinco espécies do gênero citrus. 2011. Dissertação de Mestrado, **Universidade Federal de Lavras, Lavras**, 2011.

GONCALVES, Daniel et al. Effect of citrus sinensis essential oil deterpenation on the aroma profile of the phases obtained by solvent extraction. **The Journal of Chemical Thermodynamics**, v. 116, p. 166-175, 2018.

GUPTA, Akshi; JEYAKUMAR, Ebenezer; LAWRENCE, Rubina. Journey of limonene as an antimicrobial agent. **Journal of Pure & Applied Microbiology**, v. 15, n. 3, 2021.

GÜNEŞER, B. Aydeniz; ZORBA, NN Demirel; YILMAZ, E. Antimicrobial activity of cold pressed citrus seeds oils, some citrus flavonoids and phenolic acids. *Rivista Italiana Delle Sostanze Grasse*, v. 95, p. 119-131, 2018.

GUO, Qi et al. Harnessing *Yarrowia lipolytica* peroxisomes as a subcellular factory for  $\alpha$ -humulene overproduction. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 69, n. 46, p. 13831-13837, 2021.

GUPTA, S., NATH, A., GUPTA, M. K. E SUNDARAM, S., Phytochemical analysis and antibacterial activity of different citrus fruit peels. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**. *Vol. 12(11): 5820-5826*, 2021.

GUTIERREZ, J.; BARRY-RYAN, C.; BOURKE, P., The antimicrobial efficacy of plant essential oil combinations and interactions with food ingredients. *International Journal of Food Microbiology*, v. 124, n. 1, p. 91-97, 2008.

HERRERA, C. Roberto Valdés et al. *Sitophilus oryzae* l.(coleoptera: curculionidae) características, daños, reproducción y alternativas para su control. **Revista Científica Agroecosistemas**, v. 6, n. 3, p. 129-135, 2018.

HAN, Yingjie; CHEN, Wenxue; SUN, Zhichang. Antimicrobial activity and mechanism of limonene against *Staphylococcus aureus*. **Journal of Food Safety**, v. 41, n. 5, p. e12918, 2021.

HASAN, Md M.; REICHMUTH, Ch. Relative toxicity of phosphine against the bean bruchid *Acanthoscelides obtectus* (Say)(Col., Bruchidae). **Journal of Applied Entomology**, v. 128, n. 5, p. 332-336, 2004.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. ISO 9235:2021. Aromatic natural raw materials - Vocabulary. **International Organization for Standardization: Genebra**, 2021.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, PIA-Produto - Pesquisa Industrial Anual – Produto. <https://www.ibge.gov.br/estatisticas/economicas/industria/9044-pesquisa-industrial-anual-produto.html?=&t=downloads> , acesso em 04/07/2023.

JUSSELINO FILHO, Pedro. Hormese: um pouco de algo perigoso pode ser bom. 2002.

KAEWSUKSAENG, Samak et al. Effect of UV-B irradiation on chlorophyll-degrading enzyme activities and postharvest quality in stored lime (*Citrus latifolia* Tan.) fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v. 61, n. 2-3, p. 124-130, 2011.

KIM, Dong-Hyun et al. Inhibitory effect of herbal medicines on rotavirus infectivity. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 23, n. 3, p. 356-358, 2000.

KOLLER, Otto Carlos. **Citricultura: laranja, limão e tangerina**. Porto Alegre: Rigel, 1994.

KUMAR, Peeyush et al. Insecticidal evaluation of essential oils of *Citrus sinensis* L.(Myrtales: Myrtaceae) against housefly, *Musca domestica* L.(Diptera: Muscidae). **Parasitology research**, v. 110, p. 1929-1936, 2012.

LEÃO, Marina. Análise do óleo essencial da laranja doce *Citrus sinensis* (L.) Osbeck obtido das cascas secas e frescas através do método de extração por hidrodestilação. 2015.

LEITÃO, Alexandra. Economia circular: uma nova filosofia de gestão para o séc. XXI. **Portuguese Journal of Finance, Management and Accounting**, v. 1, n. 2, p. 149-171, 2015.

LIN, Xiaocai et al. The chemical compositions, and antibacterial and antioxidant activities of four types of citrus essential oils. **Molecules**, v. 26, n. 11, p. 3412, 2021.

LI, Chunlian et al. Variation in compositions and biological activities of essential oils from four citrus species: *Citrus limon*, *Citrus sinensis*, *Citrus paradisi*, and *Citrus reticulata*. **Chemistry & Biodiversity**, v. 19, n. 4, p. e202100910, 2022.

LAMBERT, R. J. W. et al. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. **Journal of applied microbiology**, v. 91, n. 3, p. 453-462, 2001.

MARTINS, Gisele dos Santos Oliveira et al. Chemical composition and toxicity of Citrus essential oils on *Dysmicoccus brevipes* (Hemiptera: Pseudococcidae). **Revista Caatinga**, v. 30, p. 811-817, 2017.

MILLARD, Charles B. et al. Crystal structures of aged phosphonylated acetylcholinesterase: nerve agent reaction products at the atomic level. **Biochemistry**, v. 38, n. 22, p. 7032-7039, 1999.

MIYAZAWA, Mitsuo; YAMAFUJI, Chikako. Inhibition of acetylcholinesterase activity by bicyclic monoterpenoids. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 53, n. 5, p. 1765-1768, 2005.

MONAJEMI, Ramesh et al. Cytotoxic effects of essential oils of some Iranian Citrus peels. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, v. 4, n. 3, p. 183-187, 2005.

MORRIS, Garrett M. et al. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. **Journal of computational chemistry**, v. 30, n. 16, p. 2785-2791, 2009.

MAGALHÃES, Maisa Lamounier et al. Biological activities of the essential oil from the Moro orange peel (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck). **Flavour and fragrance journal**, v. 35, n. 3, p. 294-301, 2020.

MANZUR, Marilina et al. Citrus sinensis essential oils an innovative antioxidant and antipathogenic dual strategy in food preservation against spoilage bacteria. **Antioxidants**, v. 12, n. 2, p. 246, 2023.

MAHATO, Neelima et al. Modern extraction and purification techniques for obtaining high purity food-grade bioactive compounds and value-added co-products from citrus wastes. **Foods**, v. 8, n. 11, p. 523, 2019.

NJOROGE, Simon Muhoho et al. Essential oil constituents of three varieties of Kenyan sweet oranges (*Citrus sinensis*). **Flavour and fragrance journal**, v. 20, n. 1, p. 80-85, 2005.

NEUHAUS FERRONATTO, Andressa; CASSANTA ROSSI, Rochele. Extração e aplicação do óleo essencial da casca da laranja como um ingrediente natural. **Estudos Tecnológicos em Engenharia**, v. 12, n. 2, 2018.

OLIVEIRA, Alane Cabral de et al. Fontes vegetais naturais de antioxidantes. **Química Nova**, v. 32, p. 689-702, 2009.

OYEDEJI, A. O. et al. Insecticidal and biochemical activity of essential oil from Citrus sinensis peel and constituents on *Callosobrunchus maculatus* and *Sitophilus zeamais*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 168, p. 104643, 2020.

OZTURK, Baranse; WINTERBURN, James; GONZALEZ-MIQUEL, Maria. Orange peel waste valorisation through limonene extraction using bio-based solvents. **Biochemical Engineering Journal**, v. 151, p. 107298, 2019.

OMAR, Y. M. M. Morphological studies on some external and internal structures of rice weevil, *Sitophilus oryzae* (L.)(Coleoptera: Curculionidae), a major pest of the stored cereals in Egypt. **Journal of Plant Protection and Pathology**, v. 3, n. 8, p. 843-863, 2012.

OLIVEIRA, APB de. Projeto de gerenciamento de resíduos sólidos na comunidade Jocum. Porto velho. Monografia (Curso de Tecnologia em Gerenciamento Ambiental) **Faculdade UNIRON-Porto Velho, Rondônia, 2006.**

OLIVEIRA EVERTON, Gustavo et al. Caracterização química, atividade antimicrobiana e toxicidade dos óleos essenciais da *Pimenta dioica* L.(pimenta da Jamaica) e *Citrus sinensis* L. Osbeck (laranja doce). **Revista Colombiana de Ciências Químico-Farmacéuticas**, v. 49, n. 3, p. 641-655, 2020.

PARA ANÁLISE DE SEMENTES, RAS-Regras. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária do Brasil. Brasília: **Coordenação de Laboratório Vegetal–Clav**, 1992.

PEREIRA, Fernanda Aparecida Castro et al. Cinnamomum cassia essential oil and (E)-cinnamaldehyde as control agents of anthracnose on common bean seeds. **Journal of Phytopathology**, v. 170, n. 6, p. 414-421, 2022.

PACHECO BORGES, Larissa; ALVES AMORIM, Víctor. Metabólitos secundários de plantas. *Revista Agrotecnologia*, v. 11, n. 1, 2020.

PATIL, NAVEENKUMAR B. et al. Ecofriendly approach for rice weevil (*Sitophilus oryzae*)(Coleoptera: Curculionidae) management using fumigant oils. In: **Proceedings of the 10th International Conference on Controlled Atmosphere and Fumigation in Stored Products (CAF2016)**. CAF Permanent Committee Secretariat, Winnipeg, Canada. p. 16-21, 2016.

PEREIRA, Paulo Roberto Valle da Silva; ALMEIDA, Lúcia Massutti de. Chaves para a identificação dos principais Coleoptera (Insecta) associados com produtos armazenados. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 18, p. 271-283, 2001.

POMBO, Joseane Cristina Pinheiro et al. Efeito antimicrobiano e sinérgico de óleos essenciais sobre bactérias contaminantes de alimentos. **Segurança Alimentar e Nutricional**, v. 25, n. 2, p. 108-117, 2018.

RANDRIANARIVELO, Roger et al. Composition and antimicrobial activity of essential oils of *Cinnamosma fragrans*. **Food Chemistry**, v. 114, n. 2, p. 680-684, 2009.

RACCHI, Marco et al. Acetylcholinesterase inhibitors: novel activities of old molecules. **Pharmacological research**, v. 50, n. 4, p. 441-451, 2004.

RISSATO, Ana Beatriz et al. Exportação de suco de laranja concentrado brasileiro. **Anais do Simpósio Sul-Mato-Grossense de Administração**, v. 4, n. 4, p. 715-724, 2021.

RE, Roberta et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free radical biology and medicine**, v. 26, n. 9-10, p. 1231-1237, 1999.

REZZADORI, KATIA; BENEDETTI, SILVIA. Proposições para valorização de resíduos do processamento do suco de laranja. In: **International Workshop Advances in Cleaner Production**. São Paulo: UNIP, 2009. p. 1-11.

REZENDE, C. de P. et al. Alelopatia e suas interações na formação e manejo de pastagens. **Boletim agropecuário**, v. 1, n. 54, p. 1-55, 2003.

ROLLINGER, Judith M. et al. Acetylcholinesterase inhibitory activity of scopolin and scopoletin discovered by virtual screening of natural products. **Journal of medicinal chemistry**, v. 47, n. 25, p. 6248-6254, 2004.

SARTORI, Leandro. Toxicidade de óleo essencial de laranja em sementes e plântulas de nabo e picão-preto. 2022.

SAHARKHIZ, Mohammad Jamal; SMAEILI, Somaie; MERIKHI, Mohammad. Essential oil analysis and phytotoxic activity of two ecotypes of *Zataria multiflora* Boiss. growing in Iran. **Natural Product Research**, v. 24, n. 17, p. 1598-1609, 2010.

SAINI, Esteban Daniel; RODRÍGUEZ, Silvia Marta. **Insectos perjudiciales a los productos almacenados**. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (Argentina)., 2008.

SANTOS, A. C. A.; SERAFINI, L. A.; CASSEL, E. Estudos de processos de extração de óleos essenciais e bioflavonóides de frutas cítricas. **Caxias do Sul: EDUCS**, p. 19-29, 2003.

SANTOS, Inaura Patrícia da Silva et al. **Controle alternativo da podridão radicular (*Sclerotium rolfsii* Sacc.) em feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.](Fabaceae)**. 2010.

SANTOS, Fernanda Rodrigues dos et al. Yield of essential oil from varieties of *Citrus sinensis* (L.) Osbeck. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 45, p. e-496, 2023.

SERENIKI, Adriana; VITAL, Maria Aparecida Barbato Frazão. A doença de Alzheimer: aspectos fisiopatológicos e farmacológicos. **Revista de psiquiatria do Rio Grande do Sul**, v. 30, 2008.

SHARMA, Kavita et al. Converting citrus wastes into value-added products: Economic and environmently friendly approaches. **Nutrition**, v. 34, p. 29-46, 2017.

SIKKEMA, J. A. N.; DE BONT, Jan A.; POOLMAN, Bert. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. **Microbiological reviews**, v. 59, n. 2, p. 201-222, 1995.

SILVA-SANTOS, A.; ANTUNES, A. M. S.; BIZZO, H. R.; D'AVILA, L. A, Análise Técnica, Econômica e de Tendências da Indústria Brasileira de Óleos Essenciais, Rev. **Bras. Pl. Med. Papel Virtual**. 8:14, 2006.

SIMÕES, C., M., O., (ORG.) Farmacognosia: da planta ao medicamento. 4. ed. **Porto Alegre: Ed. da UFSC**, 2002.

SCHICK, M. P.; SCHICK, R. O. Understanding and implementing safe and effective flea control. **Journal of the american animal hospital association**, v. 22, n. 4, p. 421-434, 1986.

SILVA, T. C. DA. Análise do processo de desterpenação do óleo de laranja por extração líquido-líquido utilizando solventes hidroalcoólicos através de simulação computacional. 2016. 113 f. **Universidade Estadual de Campinas**. 2016.

SILVA, D.; BRAIBANTE, M. E. F.; BRAIBANTE, H. T. S.; PAZINATO, M. S.; TREVISAN, M. C. Óleos Essenciais: a Química dos cheiros. 33a **Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, 2009.

SOUZA, Stefânia Priscilla de et al. **Óleos essenciais como inibidores da acetilcolinesterase**. 2012.

SHARMA, Kavita et al. Converting citrus wastes into value-added products: Economic and environmently friendly approaches. **Nutrition**, v. 34, p. 29-46, 2017.

STEWART, J. J., & MOPAC2016, S. Computational Chemistry, **Colorado Springs, CO, USA**, 2016.

STEWART, James JP. Optimization of parameters for semiempirical methods VI: more modifications to the NDDO approximations and re-optimization of parameters. **Journal of molecular modeling**, v. 19, p. 1-32, 2013.

SCHNEIDER, Anselm. Reflexivity in Sustainability Accounting and Management: Transcending the Economic Focus of Corporate Sustainability. *Journal of Business Ethics*, [s.l.], v. 127, n. 3, p.525-536, 24 jan. 2014. Springer Nature.

STAHEL, Walter R. The circular economy. *Nature*, [s.l.], v. 531, n. 7595, p.435-438, 23 mar. 2016. Springer Nature.

SUSSMAN, Joel L. et al. Atomic structure of acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: a prototypic acetylcholine-binding protein. **Science**, v. 253, n. 5022, p. 872-879, 1991.

SUZUKI, Lorraine Lins. **Análise técnico-econômica e ambiental de processos de valorização do resíduo da indústria de suco de laranja**. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, 2019.

SILVA, Thainy Genny Esteves et al. Economia circular: um panorama do estado da arte das políticas públicas no Brasil. **Revista Produção Online**, v. 21, n. 3, p. 951-972, 2021.

TAIZ, Lincoln et al. *Fisiologia e desenvolvimento vegetal*. 6. ed. Porto Alegre, RS: Artmed, 2017. 858 p

THIESEN, Leonardo Antonio et al. Essential oil of *Lippia alba* (Mill.) NE Br. influences the germination, vigor and emergence of lettuce seeds. **Revista Colombiana de Ciências Hortícolas**, v. 13, n. 3, p. 416-425, 2019.

TEIGISEROVA, Dominika Alexa et al. A step closer to circular bioeconomy for citrus peel waste: A review of yields and technologies for sustainable management of essential oils. **Journal of Environmental Management**, v. 280, p. 111832, 2021.

TROTT, Oleg; OLSON, Arthur J. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. **Journal of computational chemistry**, v. 31, n. 2, p. 455-461, 2010.

TORRES ÁLVAREZ, Cynthia et al. Desarrollo de emulsiones con aceite esencial de naranja formuladas con diferentes biopolímeros. **Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de alimentos**, v. 1, n. 2, p. 850-856, 2016.



TOKURA, Luciene Kazue; NÓBREGA, Lúcia Helena Pereira. Alelopatia de cultivos de cobertura vegetal sobre plantas infestantes. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 28, n. 3, p. 379-384, 2006.

USDA, 2020. Citrus: World Markets and Trade [WWW Document]. URL. <https://www.fas.usda.gov/data/citrus-world-markets-and-trade>. (Accessed 14 November 2020)

USDA, 2018. United States Department of Agriculture. Produção de Safra. <https://www.usda.gov/topics/farming/crop-production>.

VELIOGLU, YS0 et al. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 46, n. 10, p. 4113-4117, 1998.

WELCH, Bernard L. The significance of the difference between two means when the population variances are unequal. **Biometrika**, v. 29, n. 3/4, p. 350-362, 1938.

YAZDGERDIAN, Aurash R.; AKHTAR, Yasmin; ISMAN, Murray B. Insecticidal effects of essential oils against woolly beech aphid, *Phyllaphis fagi* (Hemiptera: Aphididae) and rice weevil, *Sitophilus oryzae* (Coleoptera: Curculionidae). **J. Entomol. Zool. Stud**, v. 3, n. 3, p. 265-271, 2015.

YI, Fengping et al. Evaluation of mechanical-pressed essential oil from Nanfeng mandarin (*Citrus reticulata* Blanco cv. Kinokuni) as a food preservative based on antimicrobial and antioxidant activities. **Lwt**, v. 95, p. 346-353, 2018.

YU, Hao et al. Antifungal activity and mechanism of D-limonene against foodborne opportunistic pathogen *Candida tropicalis*. **Lwt**, v. 159, p. 113144, 2022.

ZIMMERMANN, Francisco José Pfeilsticker. **Estatística aplicada à pesquisa agrícola**. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2004.

ZUBAIR, Mohammad. Antimicrobial and anti-Biofilm activities of *Citrus sinensis* and *Moringa oleifera* against the pathogenic *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. **Cureus**, v. 12, n. 12, 2020.