

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS – UFAM
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA – ICET
CURSO DE BACHAREL EM FARMÁCIA

VITOR HUGO NEVES DA SILVA

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADES
BIOLÓGICAS DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Citrus*
sinensis L. Osbeck.**

ITACOATIARA- AM

2024

VITOR HUGO NEVES DA SILVA

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADES
BIOLÓGICAS DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Citrus*
Sinensis L. Osbeck.**

Trabalho de conclusão de Curso apresentado ao curso de farmácia da Universidade Federal do Amazonas (UFAM), como requisito para obtenção do título de Bacharel em Farmácia.

Orientadora: Prof.^a Ma. Ívina Thayná Miranda Trindade

Coorientador: Dra: Dominique Fernandes de Moura do Carmo

ITACOATIARA- AM

2024

Ficha Catalográfica

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

S586c Silva, Vitor Hugo Neves da
Caracterização química e atividades biológicas do óleo essencial
de citrus sinensis l. Osbeck. / Vitor Hugo Neves da Silva . 2024
51 f.: il. color; 31 cm.

Orientadora: Ívina Thayná Miranda Trindade
Coorientadora: Dominique Fernandes de Moura do Carmo
TCC de Graduação (Farmácia) - Universidade Federal do
Amazonas.

1. óleo essencial,. 2. Sustentabilidade. 3. antimicrobiano. 4.
Atividades Biológicas. 5. Economia Circular. I. Trindade, Ívina
Thayná Miranda. II. Universidade Federal do Amazonas III.
Título

VITOR HUGO NEVES DA SILVA


**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DO ÓLEO
ESSENCIAL DE *Citrus sinensis* L. Osbeck.**


Trabalho de conclusão de Curso apresentado ao curso de farmácia da Universidade Federal do Amazonas (UFAM), como requisito para obtenção do título de Bacharel em Farmácia.

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Ma. Ívina Thayná Miranda Trindade- UFAM


Orientadora

Documento assinado digitalmente
 **IVINA THAYNA MIRANDA TRINDADE**
Data: 18/12/2024 11:02:56-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Documento assinado digitalmente
 **BEATRIZ REBELO RODRIGUES**
Data: 17/12/2024 14:13:54-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof.^a. Beatriz Rebelo Rodrigues -UFAM

Avaliador

Documento assinado digitalmente
 **RAFAELA ROLIM DA SILVA**
Data: 17/12/2024 14:27:36-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof.^a Ms.Rafaela Rolim da Silva - UNIPLAN

Avaliador

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus, pela força e sabedoria concedidas ao longo deste ciclo. Sou grato por Seu fortalecimento constante, que me permitiu seguir em frente e acreditar sempre no bem. Também agradeço pelas oportunidades de vivenciar experiências acadêmicas tão significativas durante minha graduação.

A minha avó mãe, Maria da Conceição de Souza Neves, muito obrigado por me amar e apoiar em todos os meus sonhos. Obrigado pelo apoio e compreensão durante estes anos que me dediquei ao meu estudo.

A meu avô materno, Maciano Botelho Neves, e a minha querida bisavó, Nair Pantoja de Souza (*in memoriam*), por toda contribuição na minha educação, saudades eternas.

À minha orientadora, prof.^a Dr^a Dominique Fernandes de Moura do Carmo por ter recebido no laboratório 215, minha eterna gratidão, seu apoio foi crucial. Obrigado por não ter desistido de me orientar.

Gostaria de expressar minha mais profunda gratidão aos amigos de estágio, em especial: Emilio Borges, Gicele Dorval, Amanda Farias e Fabiana Sousa, pela parceria e apoio em todas as etapas desse processo.

À Millena Regina Bahia, uma amiga por quem tenho enorme admiração e carinho, agradeço por sempre me incentivar a ser uma pessoa melhor. Seu apoio foi fundamental e inesquecível.

Também estendo meus sinceros agradecimentos a Ingrid Lopes e Aniele Lopes, que estiveram ao meu lado em momentos difíceis, especialmente quando pensei em desistir. Obrigado por sua amizade e por me ajudarem a seguir em frente.

Aos meus queridos amigos de laboratório: Douglas Feitosa, Valéria Batista, Celine Menezes e Kácia Helem que, me ajudaram de todas as formas possíveis dando com certeza o apoio que todo o grupo de pesquisa deveria ter. Grato pelo carinho e dedicação de todos vocês.

Minha gratidão a minha Orientadora Ívina Miranda, seu apoio crucial nesta etapa importantíssima em minha vida profissional.

Expresso minha gratidão a Ms. Rafaela Rolim e a professora Beatriz Rebelo por fazer parte deste momento especial.

Ao Dr. Felipe Moura que ajudou nas técnicas de Cromatografia Gasosa Acoplada e espectrometria de nós dando apoio necessário com os equipamentos da Central Analítica da Universidade Federal do Amazonas- UFAM.

E a Dr^a. Ingrid Reis, por todas as contribuições com os experimentos antimicrobianos no Centro de Biotecnologia Avançada- CBA.

RESUMO

O consumo da laranja e o crescente descarte das cascas utilizada no processo traz consigo a geração de grandes montantes de resíduo vegetal pós extração. Considerando este cenário, é importante que estratégias de utilização e agregação de valor ao resíduo sejam consideradas nos processos de extração. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a composição química, atividade inseticida, antimicrobiana e inibitória frente a enzima acetilcolinesterase, do óleo essencial das cascas de *Citrus sinensis* (L.). O óleo essencial das cascas de *C. sinensis* (OE-LJ) foi extraído por meio de hidrodestilação, em aparelho clewenger, durante 4 horas e analisados por Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massa (CG-EM). A bioatividade inseticida por fumigação foi avaliada em adultos de *Sitophilus oryzae*, utilizando o limoneno (pureza $\geq 95\%$) como padrão. As leituras de mortalidade foram feitas após 24, 48 e 72 horas de exposição. A atividade antimicrobiana foi avaliada utilizando a técnica de difusão em ágar frente as cepas *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Mycobacterium smegmatis* e *Candida albicans*. O potencial inibitório frente a enzima acetilcolinesterase (AChE) foi realizada *in vitro* e *in silico*. O perfil químico da amostra, revelou a presença de 33 substâncias. Pelo cromatograma foi possível identificar seis compostos majoritários, a saber: o β -Citroneleno (7,33%), *trans* Pineno (9,63%), Car-3-em-2-one (8,43%), Limonen-10-ol (8,26%), o α -Humuleno (10,52 β - e Acoradieno (12,47%). Das avaliações biológicas realizadas, foi identificada uma atividade antimicrobiana do OE-LJ e do limoneno frente a *E. faecalis*, *E. coli*, *M. smegmatis* e *C. albicans*. O bioensaio inseticida avaliou a interferência do OE-LJ e do limoneno na fisiologia nutricional do gorgulho. Foi verificado que o monoterpene causou uma mortalidade significativa, promovendo danos fisiológicos ao *S. oryzae*. O OE-LJ apresentou atividade anticolinesterásica *in vitro*, $CI_{50} = 72 \mu\text{g/mL}$. No teste *in silico*, os compostos β -citronelaleno, limoneno, β -acoradieno e α -humuleno inibiram a enzima acetilcolinesterase, com energias de ligação variando entre -6,2 e -9,6 kcal/mol. Esses valores foram próximos aos da galantamina, com energia de ligação de -9,8 kcal/mol e RMSD de 0,3678 Å. Os resultados indicam que o OE das cascas de *C. sinensis* apresenta-se como uma fonte de compostos com propriedades antimicrobianas, anticolinesterásica e inseticidas, sendo o limoneno um constituinte promissor para o desenvolvimento de novas tecnologias a serem aplicadas no manejo sustentável, por sua ação inseticida.

Palavras-chaves: Óleo essencial, Atividades biológicas, Economia Circular, Sustentabilidade.

ABSTRACT

The consumption of oranges and the growing disposal of Citrus peels used in the process result in the generation of large amounts of post-extraction vegetable waste. Considering this scenario, it is important that strategies for using and adding value to the residue are considered in the extraction processes. In this context, the aim of this study was to evaluate the chemical composition, insecticidal and antimicrobial activity of the essential oil from the peels of *Citrus sinensis* (L.) (OE-LJ). The essential oil from the peels of *Citrus sinensis* was extracted by hydrodistillation in a clevenger for 4 hours and analyzed by Gas Chromatography Coupled with Mass Spectrometry (GC-MS). For biological activity, the agar diffusion technique was used against the following strains: *Escherichia coli* (ATC25922), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Candida albicans* (ATCC 10231), *Mycobacterium smegmatis* (ATCC 14468). Insecticidal bioactivity by fumigation was assessed on adults of *Sitophilus oryzae*, using limonene (purity $\geq 95\%$) as a standard. Mortality readings were taken after 24, 48 and 72 hours of exposure. At a concentration of 914.20 $\mu\text{L/L}$, limonene showed the highest mortality rate, with an average of 14.9% and a standard error of ± 1.46 , indicating its potential as a bioinsecticide agent. The inhibitory potential against the enzyme acetylcholinesterase (AChE) was carried out in vitro and in silico. The chemical profile of the sample revealed the presence of 33 substances. The mass spectrum identified six major compounds: β -Citronellene (7.33%), trans-Pinene (9.63%), Car-3-in-2-one (8.43%), Limonen-10-ol (8.26%), α -Humulene (10.52 β - and Acoradiene (12.47%). The biological evaluations carried out identified the antimicrobial activity of OE-LJ and limonene against *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Mycobacterium smegmatis* and *Candida albicans*. The insecticide bioassay evaluated the interference of OE-LJ and limonene on the nutritional physiology of the weevil. It was found that the monoterpene caused significant mortality and physiological damage to *S. oryzae*. OE-LJ showed anticholinesterase activity in vitro, $\text{CI}_{50} = 72 \mu\text{g/mL}$. In the in silico test, the compounds β -citronellalene, limonene, β -acoradiene and α -humulene inhibited the enzyme acetylcholinesterase, with binding energies ranging from -6.2 to -9.6 kcal/mol. These values were close to those of galantamine, with a binding energy of -9.8 kcal/mol and RMSD of 0.3678 Å. The results indicate that the EO of *C. sinensis* peels is a source of compounds with antimicrobial, anticholinesterase and insecticidal properties, with limonene being a promising constituent for the development of new technologies to be applied in sustainable management, due to its insecticidal action.

Keywords: Essential oil, Biological activities, Circular Economy, Sustainability.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Relatos de atividades biológicas do óleo essencial <i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck.....	15
Tabela 2- Rendimento do óleo essencial da casca da espécie <i>Citrus sinensis</i> (L.)	24
Tabela 3- Substâncias presentes no óleo essencial de OE-LJ.....	25
Tabela 4- Resultado das atividades antimicrobianas do óleo essencial extraído das cascas 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.	27
Tabela 5- Valores estatísticos para o teste com o padrão limoneno com pureza de $\geq 95\%$, Grau de Liberdade (GL) e Probabilidade de significância;	30
Tabela 6- Mortalidade corrigida para o tempo de 48 h, teste com o limoneno padrão, na espécie <i>Sitophilus oryzae</i> adultos.....	31
Tabela 7- . CL _{25%} limoneno teste de delineamento casualizado.....	31
Tabela 8- Valores estatísticos para aplicação de diferentes dosagens do óleo de <i>Citrus sinensis</i> , Grau de Liberdade (GL) e Probabilidade de significância.	32
Tabela 9- segue a tabela com os dados de mortalidade corrigida para 48 horas de exposição ao óleo essencial (OE) de <i>Citrus sinensis</i> em adultos de <i>Sitophilus oryzae</i> :.....	32
Tabela 10- resultados de <i>docking</i> para os principais constituintes do OE-LJ de <i>C. sinensis</i> (L.) ativos frente a AChE.....	34

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ilustração das cascas de <i>Citrus sp.</i>	13
Figura 2- Estrutura química da limoneno (monoterpeno).....	14
Figura 3. Esquema metodológico da coleta das cascas de <i>Citrus sinensis</i> (L.) OE-LJ.....	18
Figura 4 - Método de antibiose por difusão em ágar.....	20
Figura- 5 -Esquema Metodológico do ensaio de fumigação	22
Figura 6- Ensaio antimicrobiano da amostra pelo método de difusão em Ágar. Ação do óleo essencial de <i>Citrus sinensis</i> e Limoneno padrão sobre (A) <i>E. faecalis</i> ; (B) <i>E. coli</i> ; (C) <i>C. albicans</i> ; (D) <i>M. smegmatis</i> ;.....	28
Figura 7- Interações do complexo galantamina-AChE.....	35
Figura 8 - Representação dos modos de interação simulados dos compostos β -Citroneleno (A), Limoneno (B), β -Acoradieno (C) e α -Humuleno (D) com a enzima TcAChE, por meio de diagramas ilustrativos.....	36
Figura 9 - Representação tridimensional dos modos de interação simulados entre os compostos β -Citroneleno (A), Limoneno (B), β -Acoradieno (C) e α -Humuleno (D) e a enzima TcAChE, ilustrados em diagramas 3D.....	37

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	8
2	REVISÃO DE LITERATURA	10
2.1	Produtos Naturais	10
2.2	Família Rutaceae	12
2.3	<i>Citrus sinensis</i> e suas atividades biológicas	14
2.4	Inseticidas	15
2.5	Docking molecular	16
3	OBJETIVOS	17
3.1	Objetivo Geral	17
3.2	Objetivos específicos	17
4	METODOLOGIA.....	18
4.1	Coleta do material botânico.	18
4.2	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas- (CG/EM).....	19
4.3	Avaliação da atividade antimicrobiana.....	19
4.4	Bioatividade inseticida por fumigação de óleo essencial sobre <i>Sitophilus oryzae</i> (L., 1763) (Coleoptera: Curculionidae).....	20
4.4.1	Avaliação do efeito fumigante do óleo essencial sobre <i>S. oryzae</i>	21
4.4.2	Obtenção, preparação e análise dos dados.....	22
4.7	Avaliação da inibição da acetilcolinesterase.....	23
	Ensaio <i>in vitro</i>	23
	Ensaio <i>in silico</i> – Docking molecular	23
5	RESULTADOS/DISCUSSÃO	24
5.1	Rendimento das propriedades físicas dos óleos essenciais das cascas de <i>C. sinensis</i> (L.).....	24
5.2	Composição química do óleo essencial	24
5.3	Atividade antimicrobiana de OE-LJ	27
	Avaliação do efeito fumigante do óleo essencial sobre <i>S. oryzae</i>	29
5.4	Avaliação da inibição da acetilcolinesterase <i>in silico</i>	33
6	CONCLUSÃO	38
7	REFERÊNCIAS	38

1 INTRODUÇÃO

As plantas são amplamente utilizadas na prevenção, tratamento e cura de diversas doenças (Oliveira., *et al* 2020). Diferentes espécies de plantas estão sendo estudadas, bem como o isolamento de seus princípios ativos, servindo como modelagem de novos fármacos. Os produtos naturais estão cada vez mais em evidência, e os óleos essenciais ganham destaque por sua mistura de substâncias complexas e voláteis, que atuam como sistemas de defesa no reino vegetal, visto que são fontes de agentes biocidas e apresentam atividades bactericidas, inseticidas e fungicidas. (Gomes., *et al* 2015).

A ascensão de um processo de crise ambiental ao longo das últimas décadas, o qual muito se deve à ação antrópica, caracteriza um cenário carente de medidas sustentáveis efetivas (Pires., *et al* 2017). A implementação de processos menos agressivos ao meio ambiente, a qual passa essencialmente pela engenharia química, corrobora ao desenvolvimento de bioindústrias, atuando fundamentalmente sobre o reaproveitamento de resíduos, como abordado no Programa de Química Verde da Pfizer (Colberg *et al.*, 2021). Dentre os produtos que podem ser extraídos da biomassa destacam-se os óleos essenciais, amplamente aplicados na atividade industrial no âmbito farmacêutico, na produção de alimentos e cosméticos em geral.

A Economia Circular é vista como uma abordagem inovadora que busca reduzir o uso de recursos naturais por meio da diminuição de desperdícios e do reaproveitamento de resíduos (Leitão, 2015). Ao eliminar os desperdícios na cadeia industrial, é possível diminuir os custos de produção e reduzir a dependência de recursos naturais (Ellen., *et al* 2012). Sua implementação envolve três aspectos fundamentais: a redução do impacto ambiental, os benefícios econômicos e a mitigação da escassez de recursos naturais (Mostaghel; Oghazi, *et al.*, 2018).

O conceito de Economia Circular se inspira no funcionamento da natureza, onde não há geração de resíduos. Esse modelo utiliza os recursos repetidamente, minimizando a extração de matérias-primas e a produção de resíduos (Leitão *et al.*, 2015; House Of Commons., *et al* 2014). Ele está alinhado com os princípios do desenvolvimento sustentável e, por meio da inovação e do design, visa "fechar o ciclo de vida" dos produtos, aumentando a eficiência no uso dos recursos naturais e promovendo ganhos econômicos, sociais e ambientais (Leitão *et al.*, 2015; Ghisellini *et al.*, 2016; Korhonen *et al.*, 2017).

De acordo com Reis, Fadigas e Carvalho (2012), a ideia de que o desenvolvimento depende de um crescimento econômico descontrolado leva à exploração excessiva dos recursos naturais e ao consumo exacerbado, gerando grandes quantidades de resíduos sólidos urbanos.

Esses resíduos, frequentemente descartados em aterros ou diretamente no meio ambiente, causam sérios impactos ambientais, pois essa problemática decorre do modelo econômico linear, baseado em "extrair, transformar, produzir, consumir e descartar", que agrava a escassez de recursos e a produção de resíduos. Como alternativa, a Economia Circular propõe reaproveitar, reutilizar e reciclar materiais, fechando o ciclo de vida dos produtos e promovendo benefícios econômicos, sociais e ambientais.

A preocupação crescente com as questões ambientais tem mobilizado diversos setores da indústria. Tanto órgãos governamentais quanto empresas estão se esforçando para implementar políticas ambientais que reduzam os impactos negativos ao meio ambiente. Como parte desse esforço, resoluções relacionadas à gestão de resíduos têm sido constantemente revisadas, estabelecendo diretrizes para a classificação, tratamento, manuseio e descarte adequado desses materiais (Pelizer *et al.*, 2007).

No contexto agrícola e econômico, a laranja possui grande relevância para o Brasil. O país é responsável por cerca de 90% da produção de laranjas na América do Sul, representando 34% da produção mundial dessa fruta (Tribess *et al.*, 2001).

Os resíduos industriais, após sua geração, necessitam de um destino apropriado, pois sua acumulação no local de produção pode causar sérios problemas ambientais. Além disso, os resíduos representam desperdício de matéria-prima e energia, exigindo investimentos consideráveis em tecnologias e processos para controlar a poluição (Pelizer *et al.*, 2007).

Neste contexto, o presente estudo teve como objetivo investigar os bioativos do óleo essencial obtido das cascas de *Citrus sinensis*. A pesquisa incluiu os efeitos antimicrobianos e a bioatividade inseticida, avaliada por meio do método de fumigação, além da análise da capacidade inibitória do óleo sobre a enzima acetilcolinesterase (AChE), tanto por métodos *in vitro* quanto *in silico*. Foram explorados o potencial bioativo do óleo essencial extraído das cascas, um subproduto frequentemente descartado, o que visa contribuir para a valorização de resíduos agroindustriais, fomentando a economia circular.

Além disso, o desenvolvimento de produtos naturais com atividade antimicrobiana e inseticida pode reduzir a dependência de compostos sintéticos, que frequentemente possuem alto custo e impactos ambientais adversos pois o uso racional dos recursos da espécie, aliado ao incentivo para práticas de manejo sustentável, reforça a preservação ambiental e a redução do desperdício, estabelecendo um equilíbrio entre a exploração econômica e a conservação dos ecossistemas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Economia circular

O desenvolvimento sustentável é um conceito que busca equilibrar progresso econômico, preservação ambiental e justiça social. Garcia e Naime (2004) enfatizam que esse equilíbrio exige a participação de diversos grupos sociais para alcançar qualidade de vida e equidade. Da mesma forma, Reis, Fadigas e Carvalho (2012) destacam que o desenvolvimento sustentável é uma forma de enfrentar problemas como desastres ecológicos, pobreza e má distribuição de recursos, mas ressaltam que isso demanda mudanças na organização social, no uso de recursos naturais e nos sistemas produtivos.

A Economia Circular é uma fonte de inovação que, por meio de estratégias como o design sustentável, busca "fechar o ciclo de vida" dos produtos, aumentando a eficiência no uso de recursos naturais e gerando benefícios ambientais, econômicos e sociais (Leitão *et al.*, 2015; Ghisellini *et al.*, 2016). A redução de desperdícios minimiza custos de produção e a dependência de recursos não renováveis (Ellen MacArthur Foundation, 2012). Além disso, aborda aspectos cruciais, como mitigação do impacto ambiental, geração de benefícios econômicos e enfrentamento da escassez de recursos naturais (Mostaghel *et al.*, 2018).

Como alternativa ao modelo linear de produção, a Economia Circular estabelece um novo paradigma de sustentabilidade. Inspirada nos ciclos naturais, em que não há geração de resíduos, promove o reaproveitamento de materiais e a redução do consumo de matérias-primas (Leitão *et al.*, 2015; House of Commons *et al.*, 2014). Estudos de Korhonen *et al.*, (2017) e Feldmann *et al.* (2018) destacam seus impactos positivos no meio ambiente e na economia, evidenciando sua capacidade de alinhar crescimento econômico e sustentabilidade ambiental.

2.2 Produtos Naturais

As plantas medicinais desempenham um papel significativo nos sistemas de medicina tradicional, sendo a base desses tratamentos. Apesar de alguns benefícios terapêuticos dessas plantas ainda carecerem de comprovação científica, seus extratos são amplamente buscados devido à presença de substâncias bioativas. No entanto, a utilização contínua dessas plantas como recurso terapêutico para diversas enfermidades exige uma abordagem científica (Nkantchoua *et al.*, 2018).

Planta medicinal pode ser definida como qualquer espécie vegetal, cultivada ou não, que seja utilizada com fins terapêuticos. Já o fitoterápico é o medicamento obtido e elaborado tecnicamente, utilizando matérias-primas vegetais, com objetivos profiláticos, curativos ou diagnósticos, proporcionando benefícios ao usuário. Ele é caracterizado pelo conhecimento de

sua eficácia e riscos, bem como pela reprodutibilidade e consistência de sua qualidade (Brasil, 2010). De acordo com Lorenzi e Matos (2012), as plantas medicinais têm sido utilizadas desde os primórdios da humanidade até os dias atuais para a prevenção e recuperação da saúde, com o conhecimento sendo transmitido de geração em geração. Diversas doenças têm sido tratadas com chás, tinturas, cataplasmas e unguentos feitos a partir dessas plantas.

A capacidade das plantas de biossintetizar compostos está diretamente relacionada ao tipo de atividade biológica que elas são capazes de promover, uma vez que essa produção está vinculada ao metabolismo secundário das espécies vegetais. Os compostos gerados pelas plantas desempenham funções essenciais como proteção contra herbívoros e microrganismos, defesa contra radiação ultravioleta, atração de polinizadores e produção de substâncias alelopáticas, sendo armazenados em diferentes partes da planta, frequentemente nas áreas mais vulneráveis (Simões *et al.*, 2010). A concentração desses compostos pode ser influenciada por fatores externos, como o índice pluviométrico, a composição do solo, a intensidade da luz solar e a estação do ano (Barcelos *et al.*, 2017).

2.3 Óleos essenciais

O termo óleo essencial (OEs) origina-se do conceito de *quinta essentia*, proposto no século XVI pelo reformador da medicina Paracelsus Von Hohenheim (Burt *et al.*, 2004). Esses óleos são misturas complexas de diversos compostos, podendo conter entre 20 e 60 componentes em concentrações variadas. Geralmente, são caracterizados por dois ou três compostos predominantes, conhecidos como compostos majoritários, que podem representar de 20 a 70% de sua composição, enquanto os demais componentes estão presentes em concentrações muito menores (Bakkali *et al.*, 2008).

Os OEs, também são chamados de compostos voláteis, devido à sua capacidade de conferir aromas agradáveis e sabores característicos. À temperatura ambiente, eles se apresentam como líquidos oleosos de alta volatilidade, o que os distingue dos óleos fixos. Esses compostos são lipofílicos, ou seja, insolúveis em água, mas solúveis em solventes orgânicos. De maneira geral, os óleos essenciais são instáveis, especialmente quando expostos à luz, calor, umidade, ar e metais (Simões *et al.*, 2007).

Sua composição inclui uma variedade de classes de compostos, como hidrocarbonetos terpênicos, álcoois simples e terpênicos, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, éteres, óxidos, peróxidos, furanos, ácidos orgânicos, lactonas e cumarinas (Simões *et al.*, 2007). De modo geral, possuem diversas propriedades biológicas, incluindo atividade antioxidante (Wannes *et al.*, 2010), ação analgésica e anti-inflamatória (Mendes *et al.*, 2010), propriedades fungicidas

(Carmo et al., 2008), atividade antitumoral (Silva *et al.*, 2008) e ação larvicida (Rajkumar *et al.*, 2010).

Ponce e colaboradores descrevem que os óleos essenciais (OEs) têm sido considerados alternativas promissoras aos conservantes sintéticos devido às suas propriedades antimicrobianas e antioxidantes, com um amplo espectro de atividades biológicas pois esses compostos naturais oferecem benefícios adicionais, como a não toxicidade, o que tem gerado crescente interesse em sua exploração para diversas aplicações, especialmente no setor alimentício e cosmético. A pesquisa sobre o potencial antioxidante e antimicrobiano dos óleos essenciais tem aumentado à medida que se reconhece sua eficácia e segurança em comparação com substâncias sintéticas.

2.4 Família Rutaceae

A família Rutaceae é conhecida por apresentar gêneros aromáticos, entre eles um bastante conhecido o gênero *Citrus* que possui destaque na economia mundial devido à presença de óleos essenciais utilizados em diversas áreas industriais e contribuem beneficentemente a saúde populacional (Perveen; Qaiser, 2005; Djabou *et al.*, 2013). Pode ser extraído de diferentes espécies do gênero, como, *C. sinensis*, *C. reticulata*, *C. limon*, *C. grandis* e *C. paradisi* (Xu *et al.*, 2013).

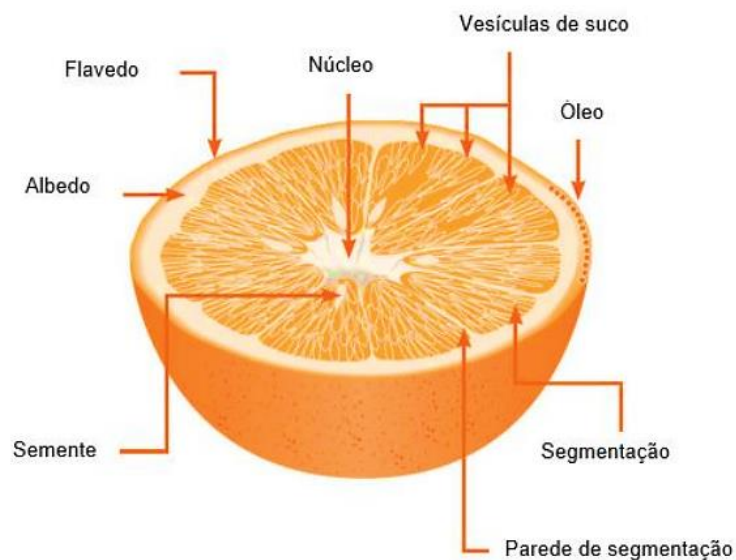
Os componentes da família Rutaceae são fortemente aromáticos devido ser presente os óleos essenciais que possuem importância considerável como fonte de frutas cítricas. (Lopes *et al.*, 2013).

O Brasil é o maior produtor de cítricos do mundo, com destaque para o estado de São Paulo, responsável pela maior parte da exportação de suco concentrado de laranja. A produção industrial de suco gera uma grande quantidade de resíduos, como cascas, sementes e polpas, que têm sido amplamente reaproveitados como subprodutos em diversos setores. Esses resíduos são utilizados para a obtenção de óleo essencial, produção de rações, fabricação de essências aromáticas e até na produção de álcool, demonstrando o potencial econômico e ambiental desse aproveitamento (Fernandes *et al.*, 2010).

A busca pelo conhecimento sobre as plantas aromáticas é bastante milenar, sendo que antigas civilizações utilizavam partes das plantas para fins religiosos, cosméticos e medicinais, baseadas no conhecimento popular para tratar muitas doenças. As indústrias de produtos cosméticos, farmacológicos, alimentícios, biotecnológicos e orgânicos nos últimos anos tem demonstrado bastante interesse no desenvolvimento deste setor, criando linha de produtos que contenham compostos ativos naturais baseados em estudos científicos (Serafini *et al.*, 2002).

A extração de óleos essenciais dos frutos cítricos exige o conhecimento da anatomia da casca, dividida em flavedo e albedo. Assim, é de suma importância entender a localização dos óleos essenciais no vegetal. Dessa forma, temos que os frutos cítricos podem ser segmentados em duas partes principais, a casca e polpa (Figura 1). O flavedo, camada externa e colorida, é rico em glândulas que armazenam os óleos essenciais, enquanto o albedo, camada interna e branca, é rico em pectina e não contém óleos. Para liberar os óleos essenciais, é necessário romper essas glândulas por meio de métodos como prensagem a frio ou destilação, otimizando o processo e preservando as propriedades do óleo.

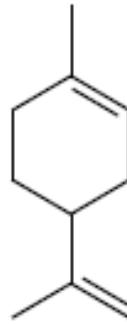
Figura 1. Ilustração das cascas de *Citrus sp.*



Fonte: Azevedo, 2018.

Nos óleos essenciais de cítricos, o limoneno é o principal componente majoritário, representando entre 90% e 96% da composição total (Figura 2). Essa alta concentração torna o limoneno um marcador químico importante desses óleos e contribui diretamente para suas propriedades biológicas e aplicações industriais. O limoneno, pertencente à classe dos monoterpenos, é responsável pelo aroma característico dos cítricos e possui diversas atividades biológicas, como ação antimicrobiana, inseticida e antioxidante, além de ser amplamente utilizado nas indústrias alimentícia, farmacêutica e de cosméticos. Os dois enantiômeros do limoneno são os mais abundantes monoterpenos na natureza. S-(-)-limoneno é principalmente encontrado numa variedade de plantas e ervas como *Mentha spp*, enquanto R-(+)-limoneno é o componente majoritário dos óleos das cascas de limão e laranja, sendo a prevenção da desidratação e inibição de crescimento microbiano suas funções naturais nos vegetais (Demyttenaere; Vanoverschelde; De Kimpe *et al.*, 2004).

Figura 2- Estrutura química da limoneno (monoterpeno)



Fonte: O autor, 2024

2.5 *Citrus sinensis* e suas atividades biológicas

A espécie *Citrus sinensis* L. Osbeck, conhecida como laranja doce, é caracterizada por árvores de porte médio a grande, que produz frutos esféricos de coloração laranja vibrante. Cada árvore pode produzir até 200 kg de frutos por safra. Acredita-se que essa variedade tenha origem espanhola, embora tenha se adaptado perfeitamente às condições climáticas e de solo brasileiras (Queiroz *et al.*, 2016).

Esta é a espécie cítrica mais amplamente cultivada e comercializada no mundo. O fruto de *C. sinensis* é reconhecido principalmente por seu conteúdo de vitamina C e também, por ser uma importante fonte de outros fitoquímicos, como fenólicos e carotenóides (Oikeh El *et al* Martinez, 2016).

Dentre os componentes mais abundantes encontrados no óleo essencial de *C. sinensis*, destaca-se o limoneno, com sua composição variando de 32 a 98%. Outros compostos de menor teor, consiste principalmente em α -pineno, Sabineno, β -pineno, óxido de linalol, limoneno, óxido de limoneno, beta-terpineol, carveol (Verma *et al.*, 2015). Galvão e colaboradores (2015), analisaram o OE *C. sinensis* (L.) e observaram a presença de mistura de terpenos, hidrocarbonetos e compostos oxigenados.

O óleo essencial extraído da casca da laranja é amplamente valorizado por suas aplicações na indústria cosmética, farmacêutica e alimentícia, além de ser reconhecido por suas propriedades terapêuticas. A utilização de subprodutos da produção de laranja não só agrega valor à cadeia produtiva como também contribui para práticas mais sustentáveis, alinhadas aos princípios da economia circular. (Lima *et al.*, 2018).

A Tabela 1 apresenta os relatos de atividades biológicas do óleo essencial de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck. A tabela descreve diversas atividades, incluindo antimicrobiana,

inseticida, anticolinesterásica e antioxidante, com destaque para as concentrações que demonstraram eficácia, como o IC₅₀ (concentração inibitória que provoca 50% de efeito)

Tabela 1: Relatos de atividades biológicas do óleo essencial *Citrus sinensis* (L.) Osbeck

<i>Citrus sinensis</i> (L.)				
Material Vegetal	Parte usada do fruto	Atividade	IC ₅₀ ou CL ₅₀ *	Referência
Cascas	Flavedo	Atividade antimicrobiana frente a <i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922) e <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923).	511,6 mg. L ⁻¹	Oliveira <i>et al.</i> , 2020
Cascas	Flavedo	Atividade larvicida	*199,01 µg. mL ⁻¹	Barros, <i>et al.</i> , 2021
Cascas	Flavedo	Atividade antimicrobiana Moluscida	100,08 mg. L ⁻¹	Barros, <i>et al.</i> 2020

CL₅₀*: Concentração Letal de 50%; IC₅₀: Concentração Inibitória (CI). Fonte: Autor, 2024.

A sensibilidade de um microrganismo a um determinado agente pode ser avaliada pela determinação da concentração inibitória mínima (CIM), que representa a menor quantidade do agente capaz de inibir o crescimento microbiano, via técnicas como a diluição em placas ou microdiluição em tubos (Oliveira *et al.*, 2009; CLSI, 2012). Segundo Menezes *et al.* (2009), os óleos essenciais apresentam boa atividade antimicrobiana quando sua concentração mínima inibitória (CIM) é inferior a 100 mg/mL. Ressalta-se a importância de se entender sobre o mecanismo de ação dos óleos essenciais (Oliveira *et al.*, 2012), dado que este é exercido pelas mutações morfológicas e funcionais da estrutura celular (Burt *et al.*, 2004; Rasooli & Abyaneh *et al.*, 2004). Sobre as bactérias, ocorre a degradação da parede celular, que com o rompimento desta barreira permeável, são comprometidas suas funções celulares, incluindo regulação metabólica e manutenção do estado energético (Nazzaro *et al.*, 2013). Para os fungos, os óleos essenciais podem afetar a barreira de proteção dos esporos ou agir antes da sua formação, promovendo o desenvolvimento anormal e/ou rompimento dos tubos germinativos (Dantigny & Nanguy, *et al.*, 2009).

2.6 Inseticidas

Inseticidas são substâncias químicas, sintéticas ou naturais, utilizadas no controle de insetos, promovendo sua morte ou inibindo comportamentos destrutivos (Ware; Whitacre *et al.*, 2012). Na agricultura, seu uso tem sido essencial para a manutenção e o aumento da produtividade, especialmente em monoculturas, devido às perdas significativas causadas por pragas (Santos *et al.*, 2007). Apesar de desafios relacionados ao impacto ambiental e à

resistência de pragas, os inseticidas sintéticos permanecem indispensáveis e continuarão desempenhando um papel crucial em programas de manejo integrado de pragas (Hassan; Priyono *et al.*, 2011).

Na natureza, substâncias químicas originadas do metabolismo secundário de plantas desempenham funções defensivas importantes contra insetos herbívoros. Essas substâncias podem inibir a alimentação, reduzir a oviposição, prejudicar o desenvolvimento larval (Isman *et al.*, 2006) ou, de forma indireta, atrair polinizadores e inimigos naturais, contribuindo para a proteção da planta.

2.7 Docking molecular

A doença de Alzheimer, principal causa de demência entre idosos, afeta cerca de 10% da população com mais de 65 anos (Racchi *et al.*, 2004). Uma das estratégias para tratar a DA é a inibição da enzima acetilcolinesterase (IACHÉ), que aumenta a concentração e a duração da ação da acetilcolina sináptica, contribuindo para minimizar as alterações cognitivas. A busca por inibidores naturais dessa enzima tem se intensificado, representando uma alternativa promissora no tratamento dessa condição (Rolling *et al.*, 2004).

Essas evidências reforçam o potencial dos óleos essenciais cítricos não apenas como agentes terapêuticos para distúrbios neurológicos e infecciosos, mas também como uma fonte natural viável de compostos bioativos para o desenvolvimento de novos tratamentos.

Estudos prévios sobre o óleo volátil das cascas de frutas cítricas, como *Citrus sinensis* (laranja doce) e *Citrus aurantium* (laranja-azedo), revelam uma ampla gama de propriedades farmacológicas e terapêuticas. O óleo essencial extraído dessas cascas demonstrou atividades ansiolíticas e hipnóticas, como relatado por Carvalho (2002). Além disso, a *C. sinensis* apresentou potente efeito *in vitro* contra o rotavírus e atividade antimicrobiana, ampliando seu potencial como agente terapêutico (KIM *et al.*, 2000).

Chaiyana e colaboradores, (2012) destacaram o interesse crescente no uso de óleos essenciais para inibir enzimas relacionadas à doença de Alzheimer (DA), dada a sua disponibilidade e potencial terapêutico. Estudos de Ademosun e Oboh (2014) mostraram que os óleos essenciais extraídos das cascas e sementes da laranja doce inibem enzimas colinérgicas e monoaminérgicas, além de exibirem propriedades antioxidantes. Foi constatado que o óleo essencial das cascas tem maior capacidade de inibição das enzimas colinérgicas em comparação com os óleos extraídos das sementes, embora tenha menor efeito sobre a peroxidação lipídica induzida por monoamina oxidase (MAO) e ferro (Fe^{2+}).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a composição química e propriedades biológicas do óleo essencial das cascas de *C. sinensis*, com potencial impacto na economia.

3.2 Objetivos específicos

- Identificar a composição química da mostra de óleo essencial por CG-EM;
- Avaliar o potencial antimicrobiano do óleo essencial frente *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* (ATC25922), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Candida albicans* (ATCC 10231), *Mycobacterium smegmatis* (ATCC 14468), e correlacionar a composição química com as atividades biológicas encontradas;
- Avaliar o potencial inseticida do óleo essencial frente a *Sitophilus oryzae*;
- Determinar potencial inibitório *in vitro* frente à enzima acetilcolinesterase (AChE) e *in silico* através de simulações de *docking* molecular pelos programas AutoDock Viana;
- Contribuir com a valorização da biomassa de *C. sinensis*.

4 METODOLOGIA

4.1 Coleta do material botânico.

Os frutos de *Citrus sinensis* (L.) foram obtidas em comercio às 08h00min no município de Itacoatiara- Amazonas (3.144073' S -58.44539 'W), no dia 09 de setembro de 2022. O material foi submetido a extração do óleo essencial de acordo com a descrição a seguir:

4.2 Extração do óleo essencial dos frutos de *C. sinensis* (L.)

O óleo essencial das cascas frescas da laranja doce foi obtido pelo método de hidrodestilação. Nesta técnica utilizou-se um aparelho do tipo Clevenger, onde primeiramente pesou-se as cascas em balança analítica (1,073 kg) e em seguida, foram colocadas em balão de fundo redondo (com capacidade de 5000 mL) juntamente com 3000 mL de água destilada, que ficaram em ebulição durante 4h a partir da fervura estabelecida. Em seguida, coletou-se a amostra de óleo essencial e para separar a água, utilizou-se a centrífuga por 10 minutos a 3500 rpm. Com auxílio de uma micropipeta graduada, foi possível retirar o óleo essencial, o qual foi armazenado em tubo de Eppendorf, vedado e conservado à -4°C. O rendimento obtido do óleo essencial foi calculado baseado no peso das cascas (g/mL) de acordo com a equação 1. A Figura 3 apresenta a ilustração metodológica da coleta das cascas de *Citrus sinensis* (L.)

$$R (\%) = \frac{\text{Volume (mL)}}{\text{Massa (g)}} * 100 \quad (\text{Equação 1})$$

Figura 3. Esquema metodológico da coleta das cascas de *Citrus sinensis* (L.) OE-LJ



4.3 Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas- (CG/EM)

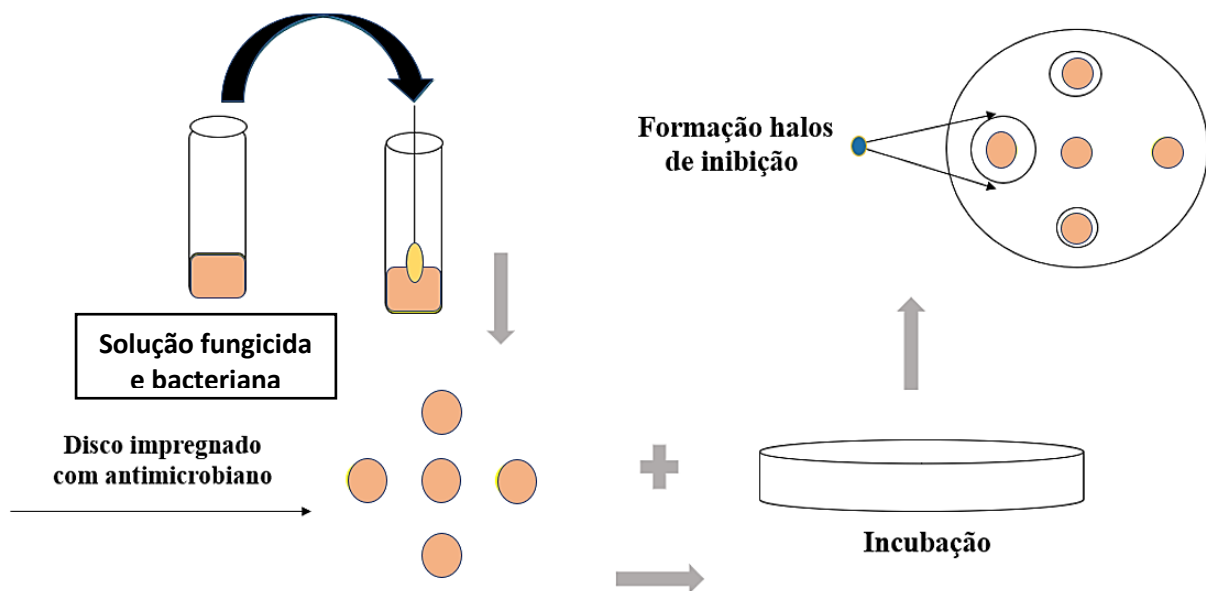
A análise do óleo essencial foi realizada por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/EM), utilizando o cromatógrafo (trace GC Ultra Thermo Scientific) com detector de espectrometria de massas ISQ Single Quadrupole. Foi empregada uma coluna capilar DB-5MS, com 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e espessura de filme de 0,25 μm . Para o preparo da solução de injeção, dissolveu-se aproximadamente 1 mg do óleo essencial em 1 mL de metanol. Um volume de 1 μL dessa solução foi injetado na proporção de divisão de 1:50. As condições de temperatura da coluna foram programadas para iniciar em 40°C, subindo a uma taxa constante de 4°C/min até atingir 240°C, que foi mantida por 4 minutos. Em seguida, a temperatura foi novamente elevada a uma taxa de 10°C/min até 280°C, sendo está mantida por 2 minutos. A temperatura do injetor foi ajustada para 220°C, e a temperatura da fonte foi configurada em 250°C. A faixa de massa analisada foi de m/z 40 a 600. A identificação dos componentes foi realizada com base nos espectros de massas obtidos e nos Índices de Retenção Linear (Índice de Kovats), calculados de acordo com a equação de Van der Dool e Kratz (1963). Para este cálculo, foi utilizada uma série homóloga de hidrocarbonetos (C12-C40). Os índices obtidos foram comparados com os dados tabelados por Adams (2007). Essa abordagem combina a precisão do cálculo do Índice de Kovats com a interpretação dos espectros de massas, proporcionando alta confiabilidade na identificação dos constituintes do óleo essencial.

4.4 Avaliação da atividade antimicrobiana

A análise antimicrobiana do óleo essencial de *Citrus sinensis* e do limoneno padrão (Sigma-Aldrich, lote: SHBL1002970331) foi conduzida utilizando a técnica de difusão em ágar, conforme descrito por Kirby e Bauer (1966). O estudo foi realizado no Centro de Biotecnologia da Amazônia (CBA/AM), onde também foram obtidas as cepas microbianas utilizadas. Foram testadas quatro espécies microbianas: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Mycobacterium smegmatis* ATCC 14468, *Candida albicans* ATCC 10231. As cepas microbianas padronizadas foram cultivadas em placas de Petri contendo meio Ágar Mueller-Hinton. O cultivo foi realizado com auxílio de swabs estéreis, garantindo uma distribuição uniforme dos microrganismos. Discos de papel com 6 mm de diâmetro foram embebidos com 30 μL do óleo essencial dissolvido em metanol na concentração de 2 mg/mL, e com 10 μL do limoneno padrão. Após a aplicação das soluções, os discos foram deixados em repouso por 24 horas para evaporação do solvente. Posteriormente, os discos foram colocados nas placas previamente

inoculadas com os microrganismos padronizados. As placas foram armazenadas em geladeira overnight para uniformizar a difusão dos compostos no meio de cultura e, em seguida, incubadas a 35°C–37°C por 24 horas (bactérias) e 48 horas (leveduras). Após o período de incubação, avaliou-se a presença e o tamanho do halo de inibição em torno dos discos, indicando a atividade antimicrobiana dos compostos testados. Como controle positivo foi utilizada amoxicilina na concentração de 10 mg/mL. A Figura 4 ilustra o método de difusão em ágar utilizado para a avaliação da antibiose.

Figura 4 - Método de antibiose por difusão em ágar.



Fonte: Autor, 2024.

4.5 Atividade inseticida por fumigação de óleo essencial sobre *Sitophilus oryzae* (L., 1763) (Coleoptera: Curculionidae)

A criação de *Sitophilus oryzae*, foram realizadas através de indivíduos coletados de arroz adquirido em comércio local. O arroz infestado será 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 serão 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.

4.6 Análise do efeito fumigante do óleo essencial sobre *S. oryzae*

Foram avaliados os efeitos do óleo essencial de *Citrus sinensis* e do limoneno padrão em *Sitophilus oryzae*, com base em metodologias descritas por Estrela *et al.* (2006) e Coitinho *et al.* (2011), com adaptações (Figura 5). O experimento utilizou câmaras de fumigação confeccionadas com recipientes de vidro herméticos de volume conhecido. Em cada câmara, foram colocados 10 indivíduos adultos de *S. oryzae* e 5 g de arroz, que serviram como fonte alimentar.

As diferentes concentrações do óleo essencial foram aplicadas em tiras de papel filtro fixadas na parte interna das tampas, utilizando micropipetas para precisão. As dosagens testadas foram 2, 4, 8 e 16 μL , correspondendo às concentrações de 57,14 $\mu\text{L/L}$, 228,56 $\mu\text{L/L}$, 457,12 $\mu\text{L/L}$ e 914,20 $\mu\text{L/L}$ de ar dentro da câmara. Como controle, foram utilizadas câmaras sem aplicação de substâncias.

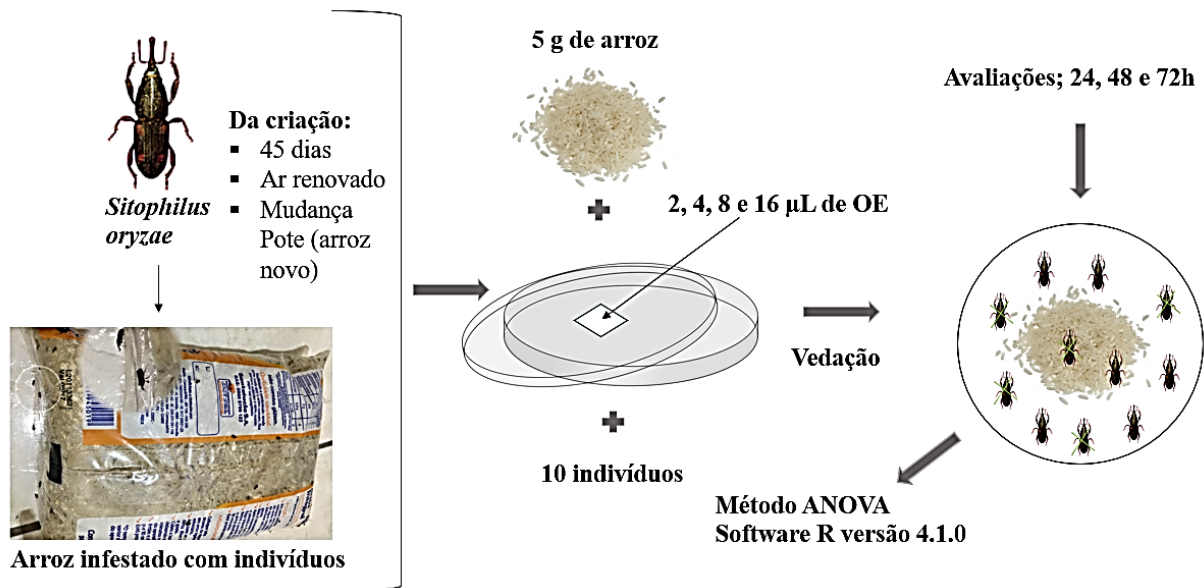
As avaliações de mortalidade foram realizadas após 24, 48 e 72 horas de exposição. A observação foi realizada através das paredes transparentes das câmaras, considerando-se como mortos os insetos que permanecessem imóveis por mais de um minuto após uma leve agitação. O experimento foi conduzido entre janeiro e fevereiro de 2023, no Laboratório de Acarologia e Entomologia Agrícola do Instituto de Ciências Exatas e Tecnologia de Itacoatiara (ICET/UFAM), em um delineamento inteiramente casualizado.

A mortalidade corrigida foi calculada com base na fórmula de Abbott (1925), levando em consideração a mortalidade natural registrada no grupo controle. Os efeitos das diferentes concentrações e tempos de exposição foram analisados por meio de análise de variância (ANOVA), e as médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knott, quando indicado.

Além disso, foram determinadas as Concentrações Letais (CL) do óleo essencial para 25% (CL25) e 50% (CL50) da população, utilizando o método Probit (Finney, 1971). Os intervalos de confiança de 95% (IC95%) foram calculados para assegurar a precisão das estimativas (Welch, 1938).

Todas as análises estatísticas foram realizadas no software R (versão 4.1.0, R Core Team, 2021), com suporte dos pacotes “asbio”, “BioStatR”, “bootstrap”, “comperes”, “easylanova”, “ecotoxicology” e “MASS”. Adotou-se um nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$) para todas as comparações.

Figura- 5 -Esquema Metodológico do ensaio de fumigação



*O Teste foi realizado em quimplicata. Fonte: Autor, 2024.

4.7 Obtenção, preparação e análise dos dados

Para cada concentração do óleo essencial foram calculadas, 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 diferentes tempos de exposição foi estimado por meio da determinação das médias da mortalidade corrigida. Para isso, os dados foram analisados utilizando os testes de normalidade (teste de Shapiro-Wilk) e de homocedasticidade (teste de Bartlett). Posteriormente, os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), e, quando o valor de F obtido na ANOVA foi significativo, as médias foram comparadas utilizando o teste de Scott-Knott.

Para cada tempo de exposição foi 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 foram adotado um nível de significância de 5% de probabilidade ($p \leq 0,05$).

4.8 Atividade da inibição da acetilcolinesterase

Ensaio *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'-ditiobis (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⁻¹ (concentração final no ensaio de 0,1 mg mL⁻¹). 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⁻¹. 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.

4.9 Ensaio *in silico* – Docking molecular

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/DISCUSSÃO

5.1 Rendimento das propriedades físicas dos óleos essenciais das cascas de *C. sinensis* (L.).

A hidrodestilação das cascas de *C. sinensis* (L.) (OE-LJ) apresentou um óleo, com uma coloração branco cristalino com aroma agradável e denso, com rendimento de 2,05% (v/p) conforme apresentado na (Tabela 2).

Tabela 2- Rendimento do óleo essencial da casca da espécie *Citrus sinensis* (L.)

Amostra	Mês/ano	Temperatura ambiente	Massa do vegetal (g)	Rendimento (%)
OE-LJ*	Setembro/2022	27°C	1,073	2,05

*Óleo Essencial de Laranja. Fonte: Autor, 2024.

Lima *et al.*, (2019), em seus estudos sobre a extração do óleo essencial da casca da laranja da espécie *Citrus sinensis* (L.), obtiveram um rendimento de 2,36% (v/p). Oliveira Everton *et al.*, (2020) reportaram um rendimento de 2,47% (v/p), enquanto Leão (2015) obteve um rendimento de 2,00% para as destilações das cascas realizadas por três horas. Observa-se, portanto, uma variação nos rendimentos, que ficam dentro da faixa de 2,00% a 2,47%. O rendimento obtido neste estudo foi de 2,05%, o que se encaixa dentro dessa faixa, sendo considerado satisfatório. Os métodos de extração dos óleos voláteis variam de acordo com a localização na planta e a finalidade de uso (Simões *et al.*, 2002), e dependendo do método adotado, o rendimento do óleo pode variar significativamente.

5.2 Composição química do óleo essencial

Na referida análise, foi possível identificar 100% da composição química do óleo essencial de OE-LJ. Na tabela 3 é mostrado a composição química do óleo essencial juntamente com a área, tempo de retenção de cada composto e os Índices de Kovats.

Um total 33 compostos que foram detectadas por CG-EM e observadas no cromatograma, abrangendo os constituintes monoterpenos e sesquiterpenos tanto de hidrocarbonetos como oxigenados, sendo os compostos β -Citroneleno (7,33%), *trans* Pineno (9,63%), Car-3-em-2-one (8,43%), Limonen-10-ol (8,26%), o α -Humuleno (10,52 β -Acoradieno (12,47%) os constituintes majoritários de OE-LJ.

Tabela 3- Substâncias presentes no óleo essencial de OE-LJ

TR	<i>I.kcal</i>	<i>I.Ktab</i>	<i>Substância</i>	<i>CLASSE</i>	<i>AREA %</i>
9,18	934	942	β -Citroneleno	MH	7,33
10,8	885	884	Santeno	MH	4,09
11,54	945	945	α -Fencheno	MH	0,32
12,16	953	969	trans Pineno	MH	9,63
12,72	961	961	Verbeneno	MH	0,26
12,92	963	969	Sabineno	MH	1,87
13,37	969	974	β - Pineno	MH	1,0
13,75	974	980	trans Isolimoneno	MH	2,56
14,07	978	982	cis-Pineno	MH	0,35
15,19	1044	1044	<(E)- β ->Ocimeno	MH	0,15
15,69	1050	1054	γ -Terpineno	MH	2,3
18,45	1087	1089	ρ Cimeneno	MH	0,29
18,95	1094	1095	Linalol	MO	0,16
22,37	1244	1244	Car-3-en-2-one	MO	8,43
24,05	1269	1271	neo -Metil acetato	SO	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	0,61
28,55	1389	1389	Elemeno< β ->	SH	2,8
29,04	1448	1452	Umuleno< α ->	SH	10,52
29,45	1455	1452	Cloveno< α -neo->	SH	4,83
30,07	1466	1470	Acoradieno< β ->	SH	12,47
30,83	1478	1478	Muroleno< γ ->	SH	3,74
31,04	1482	1489	Selineno< β ->	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	Eudesmolβ->	SO	3,07

Fonte: Adams, 2017. TR: Tempo de Retenção; I. Kcal: Índice Aritmético calculado; I.Ktab: Índice de Retenção de acordo com Adams (2017); SH: Sesquiterpeno de hidrocarboneto; SO: Sesquiterpeno oxigenado; MO: Monoterpeno oxigenado; MH: Monoterpeno de hidrocarboneto;

Fonte: Autor, 2024.

Estudos conduzidos por Marriott, Shellie e Cornwell (2001) revelaram que o óleo essencial de laranja (*Citrus sinensis*) pode conter até 300 compostos químicos diferentes. Dentre esses, destacam-se como principais constituintes os monoterpenos limoneno (94%), α -pineno (0,54%), sabineno (0,74%) e mirceno (1,18%). Lopes e colaboradores (2013), identificaram a presença de sabineno, β -pineno, (E)- β -Ocimeno, Linalol como constituintes majoritários no OE da espécie *C. sinensis* (L.), corroborando com este estudo.

A hidrofobicidade dos óleos essenciais é um dos principais fatores responsáveis pelo seu potencial antibacteriano, como destacado por Solórzano-Santos e Miranda Novales (2012) e Lambert *et al.* (2001). Essa característica permite que os compostos bioativos presentes nos óleos essenciais, como monoterpenos, sesquiterpenos e compostos fenólicos, interajam diretamente com os lipídios da membrana celular bacteriana.

Essas interações provocam alterações significativas na estrutura das células bacterianas, como a perturbação da bicamada lipídica da membrana, afetando sua organização e fluidez. A desestabilização da membrana causa um aumento na sua permeabilidade, levando ao vazamento de íons, ATP e outras moléculas essenciais à manutenção da homeostase intracelular. Como resultado, a perda do potencial de membrana e a desregulação osmótica comprometem as funções metabólicas da bactéria, o que leva à sua morte.

Kalemba e colaboradores, (2003), destacam que os óleos essenciais podem apresentar ação antimicrobiana por três formas: 1. interferência na dupla camada fosfolipídica da parede celular da bactéria; 2. aumento da permeabilidade e perda dos constituintes celulares, e; 3. alteração de uma variedade de sistemas enzimáticos como os envolvidos na produção de energia celular e síntese de componentes estruturais ou destruição do material genético. Ainda, os estudos mencionam que a ação antibacteriana se relaciona à hidrofobicidade do óleo essencial e à natureza lipofílica do mesmo, atuando de forma a penetrar nos lipídios da membrana celular

bacteriana, ocasionando a destruição da mesma e tornando-a mais permeável (İşcan, 2017; Swamy *et al.*, 2016).

Esses mecanismos tornam os óleos essenciais potentes agentes antibacterianos naturais, representando uma alternativa ou complemento aos antibióticos convencionais, especialmente no contexto do crescente problema da resistência bacteriana.

5.3 Atividade antimicrobiana de OE-LJ

Em estudos conduzidos por Da Silva *et al.*, (2016), foi utilizado o método de difusão em ágar para avaliar a atividade antibacteriana de extratos. Esse método envolve a aplicação de substâncias testadas sobre a superfície de uma placa de ágar contendo bactérias, criando um ambiente onde o agente antimicrobiano pode inibir o crescimento bacteriano. Ao redor do ponto de aplicação da substância, forma-se uma área de inibição, conhecida como "halo", onde as bactérias não conseguem crescer, foram adotados os seguintes parâmetros: baixa 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 (Da Silva *et al.*, 2016).

A Tabela 4 apresenta os resultados obtidos para o óleo essencial de *Citrus sinensis* e o padrão limoneno, indicando a eficácia antimicrobiana de cada substância testada com base nos diâmetros dos halos de inibição.

Tabela 4- Resultado das atividades antimicrobianas do óleo essencial extraído das cascas de *C. sinensis* frente aos microrganismos *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Candida albicans* e *Mycobacterium smegmatis*, *S. aureus* bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e fungo.

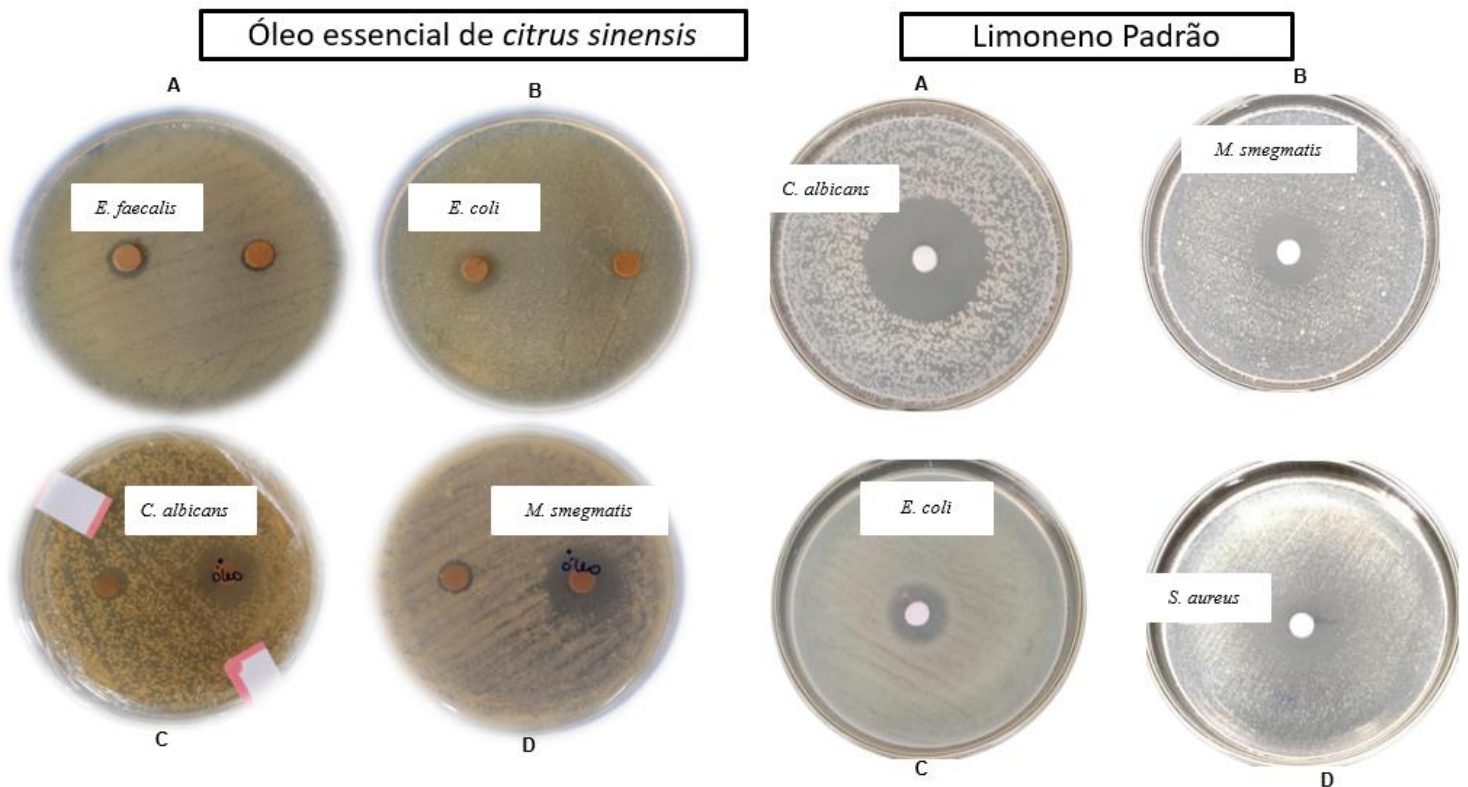
Amostra	Cepas			Fungos
	<i>E. faecalis</i>	<i>E. coli.</i>	<i>M. smegmatis</i>	<i>C. albicans</i>
OE-LJ	++	+	++	++
LP*		++	+++	+++

*LP = Padrão de limoneno. 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;

Fonte: Autor, 2022.

A Figura 6 apresenta os resultados do ensaio antimicrobiano realizado com o óleo essencial de *Citrus sinensis*, evidenciando sua ação contra diferentes micro-organismos: *E. faecalis*, *E. coli*, *M. smegmatis* e *C. albicans*.

Figura 6- Ensaio antimicrobiano da amostra pelo método de difusão em Ágar. Ação do óleo essencial de *Citrus sinensis* sobre (A) *E. faecalis*; (B) *E. coli*; (C) *C. albicans*; (D) *M. smegmatis*;



Fonte: Autor, 2024

Em estudos realizados por Barros e colaboradores, (2008), o óleo essencial de *Citrus sinensis* causou inibição completa do crescimento de *Aspergillus niger* a 3,0 µg/ml em placas de ágar. Esta concentração foi considerada letal nas condições de ensaio. O óleo apresentou atividade fungistática a 1,5 µg/ml com cerca de 79% de inibição do crescimento após 7 dias de incubação e atraso da conidiação em relação ao controle. O óleo essencial reduziu significativamente o crescimento de *A. niger* de uma forma de resposta à dosagem.

De acordo com Bajpai, (2012), a ação antimicrobiana de óleos essenciais pode ser atribuída à sua capacidade em penetrar através das membranas bacterianas para o interior da célula e exibem atividade inibitória sobre as propriedades funcionais da célula, pois a membrana bacteriana, a presença de proteínas porinas em bactérias gram negativas e a distribuição intracelular dos constituintes dos óleos essenciais são elementos chaves que influenciam a difusão e a ação dos óleos essenciais dentro das células, representando, então, a variação na atividade dos óleos essenciais esperada contra diferentes grupos de bactérias (Lambert et al., 2001; Randrianarivelo *et al.*, 2009).

Valeriano e colaboradores, (2012), descreve que um dos efeitos comuns dos terpenos sobre a cepa Gram-positiva, o d-limoneno também teve atividade antibacteriana para Gram-negativa, provavelmente devida sua característica lipofílica que funciona com um efeito tóxico na estrutura e função da membrana bacteriana, resultando no aumento de fluidez e permeabilidade da membrana, desordenando as proteínas e ocasionando a perda de função.

De acordo com Thakre e colaboradores, (2018), a aplicação do Limoneno em isolados de *C. albicans* sugeriram que o mesmo induziu danos na parede celular e na membrana levando ao estresse oxidativo, causando danos ao DNA e induzindo a apoptose por meio da via dependente da caspase (CaMca 1) e independente (estresse nucleolar).

5.4 Avaliação do efeito fumigante do óleo essencial sobre *S. oryzae*

A crescente necessidade de encontrar moléculas menos tóxicas e com menor impacto ambiental para proteger produtos armazenados tem impulsionado a pesquisa sobre o uso de plantas com propriedades inseticidas (Pungitore *et al.*, 2005). As substâncias de origem vegetal demonstram diversas atividades biológicas contra diferentes espécies de insetos e, por serem mais seletivas e menos persistentes no ambiente e nos grãos, têm atraído o interesse de estudos sobre alternativas sustentáveis (Novo *et al.*, 2002).

A interação entre plantas e insetos é mediada, quimicamente, por metabólitos secundários, entre os quais se destacam os flavonoides, terpenoides (como os óleos essenciais), alcaloides, cumarinas e taninos. Esses compostos desempenham papéis importantes na defesa das plantas contra herbívoros e podem ser explorados como alternativas eficazes e ecológicas ao uso de pesticidas sintéticos. O estudo dessas substâncias oferece uma abordagem promissora para o desenvolvimento de novos produtos naturais e menos agressivos ao meio ambiente.

Estudos conduzidos por Novo e colaboradores, (2010) os compostos secundários das plantas podem afetar o desenvolvimento dos insetos, retardando, acelerando ou interferindo no ciclo de vida por interromper estádios metabólicos essenciais, causando morte rápida. Além disso, esses compostos podem agir como atraentes, deterrentes, fagostimulantes, antifedantes ou até inviabilizar a postura, dificultando a alimentação e a reprodução dos insetos. Essas propriedades biológicas são fundamentais no controle natural de pragas, oferecendo alternativas mais sustentáveis ao uso de pesticidas sintéticos.

De acordo com Viegas Junior (2003), monoterpênicos de estrutura simples, como limoneno, β -pineno e α -pineno, desempenham funções de proteção nas plantas que os produzem. A ação inseticida desses compostos seria resultante da inibição da acetilcolinesterase nos insetos. Dessa

forma, pode-se concluir que o óleo essencial de casca de laranja apresenta efeito inseticida e fumegante.

A Tabela 5 a seguir apresenta os resultados obtidos no bioensaio com limoneno, que foi utilizado como padrão, para um período de exposição de 48 horas.

Tabela 5-. Valores estatísticos para o teste utilizando o padrão de limoneno com pureza igual ou superior a 95%, incluindo o Grau de Liberdade (GL) e o valor de significância (p-valor).

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

Fonte: Autor, 2022.

A análise para 48 horas de exposição mostrou que apenas duas dosagens apresentaram mortalidade significativamente maior que o controle ($F_{calc} = 18,54$; $p < 1,659 \times 10^{-6}$). Não houve diferenças significativas entre os tempos de exposição (24 h e 72 h), indicando que o efeito máximo ocorre em 48 horas e é influenciado apenas pela concentração, não pelo tempo.

A acetilcolinesterase é uma enzima crucial nas sinapses colinérgicas de insetos e animais superiores, responsável por degradar a acetilcolina e regular a transmissão dos impulsos nervosos. Sua inibição provoca o acúmulo de acetilcolina nas sinapses, resultando em estímulo constante da membrana pós-sináptica, o que leva à ataxia (ausência de coordenação neuromuscular) e morte eventual (Rattan, 2010).

Entretanto, a resistência à inibição por carbamatos e organofosforados é um dos principais mecanismos de defesa dos insetos, devido a alterações estruturais na acetilcolinesterase (Wang *et al.*, 2004). Produtos naturais têm se destacado como inibidores alternativos da enzima, apresentando atividade contra diversas espécies de insetos (Kostyukovsky *et al.*, 2002). O óleo essencial de gengibre (*Zingiber officinale*), por exemplo, mostrou influenciar o sistema colinérgico, afetando comportamento e memória (Felipe *et al.*, 2008), enquanto o linalol é reconhecido como um inibidor da acetilcolinesterase (Ryan *et al.*, 1988).

A Tabela 6 apresenta os valores de mortalidade corrigida para o período de 48 horas, evidenciando um aumento progressivo na letalidade conforme o incremento das dosagens, com variações entre 6,4% e 14,9%.

Tabela 6- Mortalidade corrigida para o tempo de 48 h, teste com o limoneno padrão, na espécie *Sitophilus oryzae* adultos.

Dose	Mortalidade corrigida (Media \pm EP)
0 μ l/L	0,0 \pm 1,6 d
57,14 μ l/L	6,4 \pm 1,55 c
228,56 μ l/L	4,3 \pm 0,00 c
457,12 μ l/L	10,6 \pm 1,36 b
914,20 μ l/L	14,9 \pm 1,46 a

Fonte: Autor, 2022.

A mortalidade corrigida reflete a mortalidade efetivamente causada pelo material testado, desconsiderando a mortalidade natural da população (Abbott, 1925). Nas concentrações entre 57,14 μ L/L e 228,56 μ L/L, não foi observado aumento significativo na mortalidade corrigida. No entanto, concentrações mais elevadas resultaram em um aumento expressivo da taxa de mortalidade. O limoneno apresentou uma CL25% (Concentração Letal para 25% da população) de 19,75%, com intervalos de confiança de 6,04 a 64,47 em 48 horas (Tabela 7). Não foi possível calcular a CL50%, pois a mortalidade corrigida não foi significativa para tal, assim como para os tempos de 24 e 72 horas de exposição. Esses resultados, obtidos por delineamento casualizado com o limoneno isolado, indicam que sua toxicidade aumenta significativamente quando presente em altas concentrações no óleo essencial.

Tabela 7- CL_{25%} limoneno teste de delineamento casualizado.

Produto	G_l^a	n^b	B	c_z	d_p	$^eCL\ 25\%$	$^fIC\ 95\%\ Inf.$	$^gIC\ 95\%\ sup.$
Limoneno	4	25	0,56 \pm 0,27	2,09	0,0366	19,74	6,04	64,47

^aGrau de liberdade; ^bNúmero de repetições; ^cValor calculado do teste t; ^dProbabilidade de significância do valor de t, ^eConcentração letal média, para as diferentes concentrações em um mesmo tempo de exposição, ^fIntervalo de confiança inferior a 95% para diferença entre duas médias; ^gIntervalo de confiança a 95% para diferença entre duas médias.

Fonte: Autor, 2022.

Gnankiné e colaboradores 2017, compilaram que os monoterpenos, constituintes encontrados nos OEs, são tóxicos para os insetos e podem penetrar no corpo por meio do sistema respiratório, pela cutícula ou por ingestão. Vários deles, como o eugenol, α -terpenol e L-carvol, possuem efeitos neurotóxicos, provocando hiperatividade nos insetos, com alongamento de pernas seguido de paralisia e morte.

Os valores estatísticos relacionados à aplicação de diferentes dosagens do óleo essencial de *Citrus sinensis*, incluindo o Grau de Liberdade (GL) e a Probabilidade de Significância, estão detalhados na Tabela 8.

Tabela 8- Valores estatísticos para aplicação de diferentes dosagens do óleo 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	0,034568	0,0086420	8,2353	0,0004276
Resíduo	20	0,020988	0,0010494	--	--

Fonte: Autor, 2022.

Com base nas mortalidades corrigidas, observou-se que apenas as dosagens no período de 48 horas diferiram significativamente do controle, apresentando mortalidade superior. O teste ANOVA revelou um valor de F calculado ($F_{calc} = 8,2353$) maior que o F tabelado (F_{tab}), com grau de liberdade (GL) = 4 e probabilidade de significância ($p < 0,0004276$). Esses resultados confirmam a influência das dosagens na mortalidade apenas para o grupo de 48 horas, sem diferenças significativas entre os grupos de 24 e 72 horas. A Tabela 9 apresenta as médias de mortalidade para as diferentes dosagens do óleo essencial de *Citrus sinensis*.

Tabela 9- segue a tabela com os dados de mortalidade corrigida para 48 horas de exposição ao óleo essencial (OE) de *Citrus sinensis* em adultos de *Sitophilus oryzae*:

Dose	Mortalidade corrigida (Media \pm EP)
0 μ L/L	0,0 \pm 6,09 b
57,14 μ L/L	0,0 \pm 7,03 b
228,56 μ L/L	-4,4 \pm 4,44 b
457,12 μ L/L	6,7 \pm 5,67 a
914,20 μ L/L	-2,2 \pm 5,44 b

Fonte: Autor, 2022.

Os resultados mostram que, na dosagem de 457,12 μ L/L, o óleo essencial (OE) de *Citrus sinensis* indicou uma mortalidade corrigida de 6,7%, valor próximo do padrão limoneno ($\geq 95\%$), que foi de 6,04% na dosagem de 57,14 μ L/L (Tabela 6). Isso indica que, para atingir taxas de mortalidade significativas em adultos de *Sitophilus oryzae*, é necessário utilizar concentrações mais elevadas do OE de *C. sinensis* em comparação ao limoneno isolado.

De acordo com Turek *et al.*, (2013), as moléculas que compõem os óleos essenciais são altamente suscetíveis a transformações quando expostas a fatores ambientais, como luz solar, umidade, temperatura e oxigênio. Essas condições podem alterar sua composição química e, conseqüentemente, sua eficácia biológica, reduzindo sua estabilidade e tempo de ação no ambiente.

Em estudos realizados, realizados por Pavela *et al.*, (2016) os terpenos, como o D-limoneno, são conhecidos por serem termolábeis e voláteis, o que os torna suscetíveis à degradação quando expostos a condições ambientais adversas. No caso do óleo essencial de laranja, essa degradação pode impactar significativamente sua eficácia metabólica e capacidade inseticida. A produção industrial de inseticidas à base desse óleo exige grandes volumes, mas a sensibilidade de seus componentes representa uma limitação importante, já que fatores como calor, luz, oxigênio e umidade, inevitáveis na cadeia produtiva, podem alterar sua composição química. Assim, a eficácia do produto botânico dependerá diretamente das condições de manipulação, processamento e armazenamento, sendo necessário o uso de tecnologias e recursos que preservem a estabilidade do óleo essencial ao longo do processo.

5.5 Avaliação da inibição da acetilcolinesterase *in silico*

Os estudos de docking molecular entre a acetilcolinesterase (AChE), representada pela estrutura tridimensional, e os principais componentes de *Citrus sinensis* foram realizados na região do sítio ativo da enzima, previamente ocupado pela galantamina. Esse sítio ativo está localizado na parte inferior da cavidade enzimática e é composto por três resíduos de aminoácidos que formam a tríade catalítica: Ser200, His440 e Glu327, os quais desempenham papel essencial na hidrólise da acetilcolina (Sussman *et al.*, 1991). Além disso, os resíduos nos subsítios aniônico (Trp84 e Phe330) e periférico (Trp279) são fundamentais para o reconhecimento do ligante e interação molecular (Millard *et al.*, 1999; Dvir *et al.*, 2010). Esses detalhes estruturais ajudam a compreender os mecanismos de ação e o potencial inibitório dos compostos de *C. sinensis*.

Na tabela 10 são apresentados os resultados do docking molecular entre os compostos majoritários das espécies de citrus sinensis e a enzima ache. Os valores de energia de ligação variaram 94 entre -6,2 e -9,6 kcal/mol, mostrando-se próximos ou superiores à energia de ligação do inibidor galantamina durante o redocking (-9,8 kcal/mol, RMSD 0,367Å).

Tabela 10- resultados de *docking* para os principais constituintes do OE-LJ de *C. sinensis* (L.) ativos frente a AChE.

Compostos	Energia de ligação (Kcal/mol)	Principais interações
Galantamina	-9,8	HB (Ser200, Gly119, Gly118), PAI (Phe330, Trp84,) CH (Tyr121).
β -Citroneleno	-6,2	PAI (Phe334), PSI (Trp84, Phe330 e Phe331)
Limoneno	-7,2	PAI (Phe331, Tyr334 e His440), PSI (Trp84, Phe330).
β -Acoradieno	-8,5	PAI (Phe331, Tyr334 e His440), PSI (Trp84, Phe330).
α -Humuleno	-9,6	PAI (Tyr121, Phe330, Phe331 e Phe334), PSI (Trp84, Phe84).

HB- ligação de hidrogênio; PAI- π -alquil PSI- π -sigma; CH- ligação de hidrogênio carbono; AC- carga atrativa; PP- π - π

As interações observadas entre a galantamina e a enzima acetilcolinesterase (AChE) são fundamentais para entender o mecanismo de inibição dessa enzima. Entre as interações mais importantes, destaca-se a ligação de hidrogênio formada entre o resíduo Ser200 da AChE e o átomo de oxigênio presente no grupo *O*-metil da galantamina. A ligação de hidrogênio é uma interação não covalente que ocorre entre um átomo de hidrogênio ligado a um átomo eletronegativo (como oxigênio ou nitrogênio) e outro átomo eletronegativo próximo. Nesse caso, o resíduo Ser200 desempenha um papel importante no reconhecimento da galantamina, pois essa interação ajuda a estabilizar a ligação do inibidor ao sítio ativo da enzima.

Além disso, foram identificadas interações do tipo π -alquil, que ocorrem entre os anéis aromáticos da galantamina e os resíduos Trp84 (triptofano) e Phe330 (fenilalanina), localizados no subsítio aniônico da enzima. As interações π -alquil são fracas, mas contribuem significativamente para a estabilização do complexo. Isso ocorre porque os sistemas π (presentes nos anéis aromáticos) podem interagir com cadeias alquílicas ou outras regiões eletronicamente compatíveis.

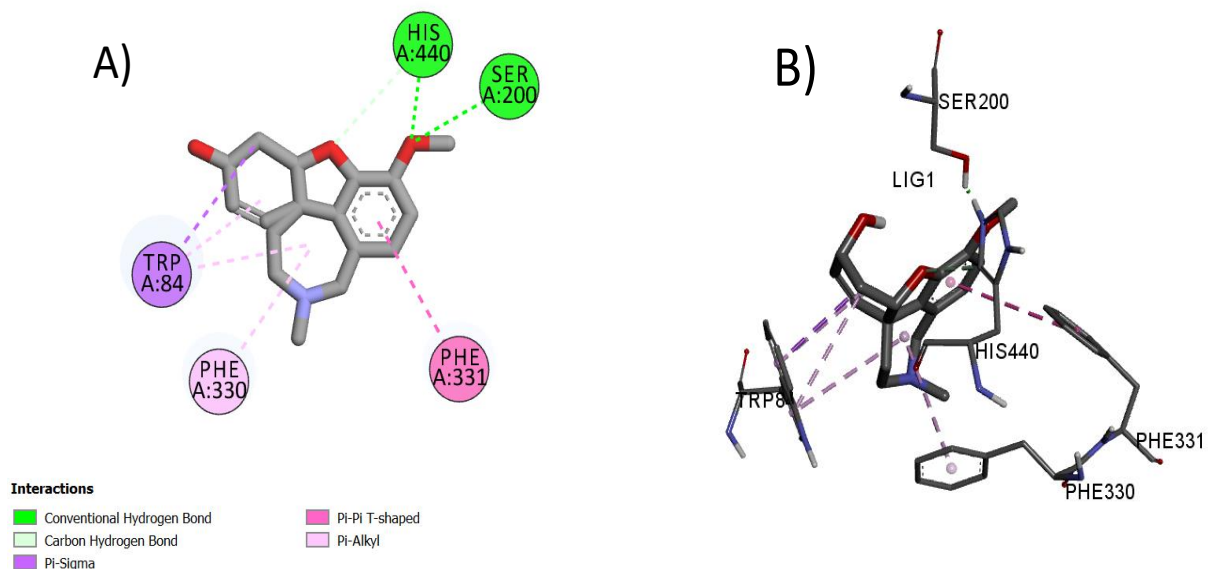
O resíduo Trp84 possui um anel indol aromático, enquanto o Phe330 possui um anel benzênico aromático. Essas regiões ajudam a atrair e estabilizar a galantamina no sítio ativo, reforçando a afinidade do ligante pela enzima. O subsítio aniônico desempenha um papel essencial no reconhecimento molecular, facilitando o encaixe da galantamina e garantindo a estabilização do complexo.

Portanto, a combinação entre a ligação de hidrogênio com Ser200 e as interações π -alquil com Trp84 e Phe330 é crucial para o reconhecimento da galantamina e a estabilização

do complexo galantamina-AChE. Essas interações permitem que a galantamina iniba a enzima de forma eficiente, bloqueando a degradação da acetilcolina e, assim, contribuindo para o aumento da disponibilidade desse neurotransmissor no sistema nervoso. Além de explicar o mecanismo de ação da galantamina, esses achados destacam a importância dos resíduos do sítio ativo da AChE e fornecem informações valiosas para o design de novos inibidores que possam ser utilizados no tratamento de doenças neurodegenerativas, como o Alzheimer.

A Figura 7 demonstra as interações moleculares entre a galantamina e os resíduos do sítio ativo da acetilcolinesterase (AChE). Destacam-se a ligação de hidrogênio com o resíduo Ser200 e as interações π -alquil com os resíduos Trp84 e Phe330, que contribuem para a estabilidade do complexo galantamina-AChE.

Figura 7- Principais interações observadas para o complexo galantamina-AChE em 2D (A) e 3D (B).



Estudos conduzidos por Bomfim *et al.*, (2023) O α -pineno tem sido amplamente investigado em estudos de modelagem molecular devido à sua versatilidade e capacidade de interagir eficientemente com diferentes alvos terapêuticos. Sua estrutura molecular apresenta uma tensão estável, permitindo um acoplamento eficaz com sítios específicos de várias enzimas que destacam o potencial biológico do α -pineno e elucidaram seu mecanismo de ação contra *Candida albicans* por meio de estudos de docking molecular. Além disso, relataram a alta toxicidade do composto, o que pode sugerir que, em testes *in vitro*, ampliando suas possibilidades de aplicação biotecnológica.

As orientações axiais da galantamina, especialmente a estrutura ax24, portam-se ser mais eficientes e energeticamente mais estáveis para a interação com o sítio ativo da AChE, o que

pode indicar uma maior eficácia dessa configuração na inibição enzimática. A configuração *equatorial*, embora também eficaz, parece ter uma interação menos estável em comparação. Isso ressalta a importância da orientação espacial do ligante nas interações moleculares, o que é essencial para otimizar a atividade de compostos inibidores como a galantamina.

Bartolucci e colaboradores (2001) compararam os modelos de docking com a estrutura cristalográfica por raios X do complexo TcAChE-galantamina, destacando que o procedimento de encaixe automatizado identificou os modelos de galantamina "eq26" e "ax24" como os mais suscetíveis à ligação no sítio ativo de TcAChE. Essa orientação preferencial reflete a afinidade estrutural e química desses modelos com os resíduos catalíticos e de reconhecimento do sítio ativo.

As Figuras 8 e 9 demonstra os Modelos de docking da galantamina ('eq26' e 'ax24') comparados à estrutura cristalográfica do complexo TcAChE-galantamina, destacando interações no sítio ativo com resíduos catalíticos e de reconhecimento, como as interações tridimensionais dos componentes majoritários.

Figura 8. Modos de ligação simulados dos compostos β -Citroneleno (A), Limoneno (B), β -Acoradieno (C) e α Humuleno (D) com TcAChE por diagrama.

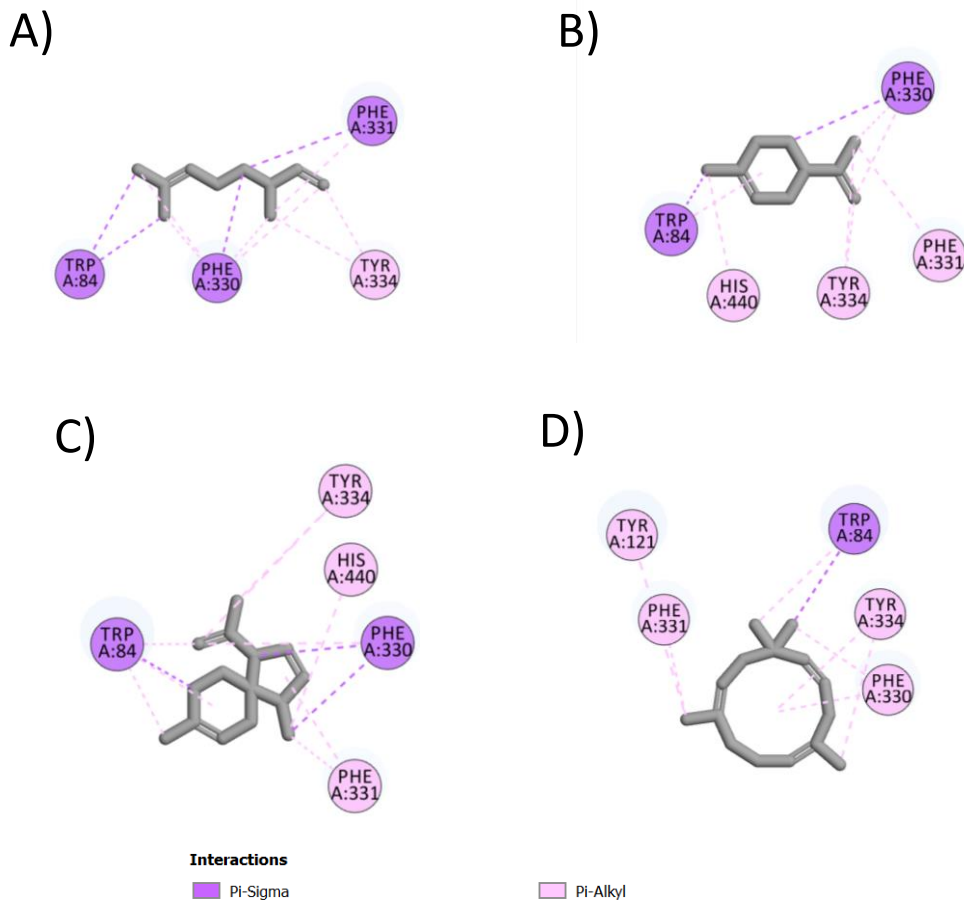
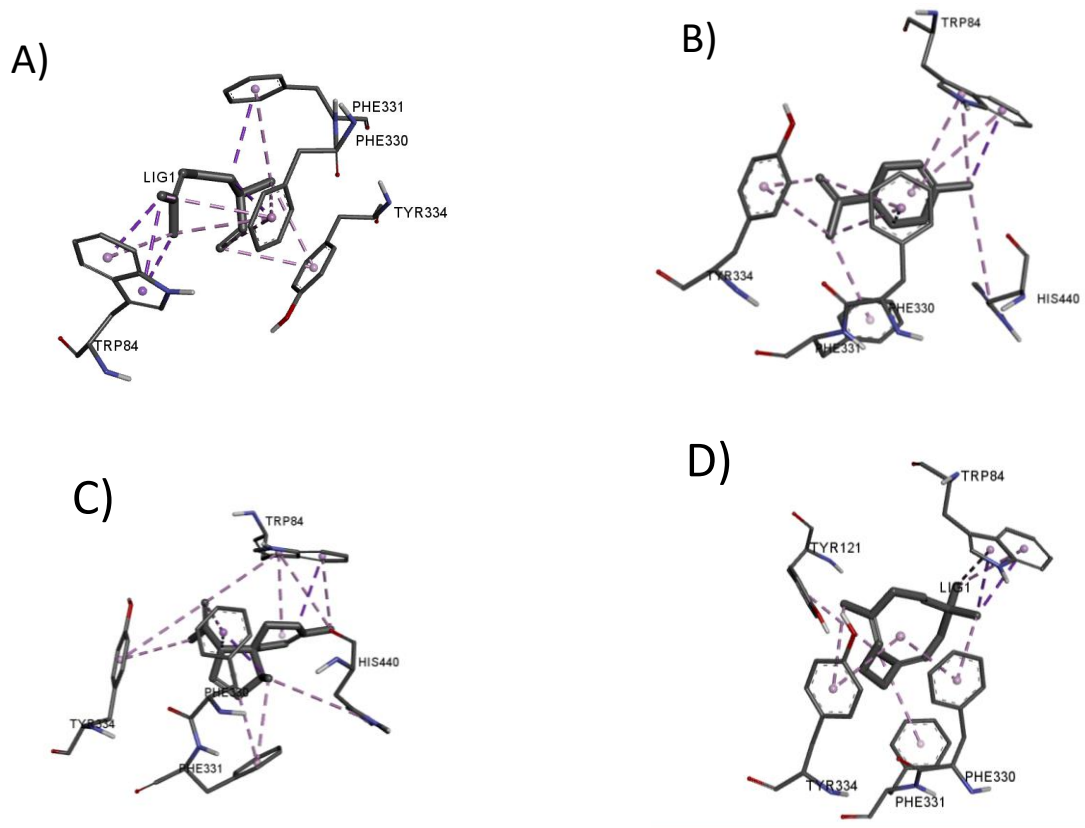


Figura 9 - Representação tridimensional dos modos de interação simulados entre os compostos β -Citroneleno (A), Limoneno (B), β -Acoradieno (C) e α -Humuleno (D) e a enzima TcAChE, ilustrados em diagramas 3D.



6 CONCLUSÃO

O presente estudo, focado na composição química do óleo essencial das cascas de *Citrus sinensis* (L.) e seu potencial antimicrobiano e inseticida, permitiu a identificação de 33 substâncias no óleo essencial (OE-LJ). Dentre elas, seis compostos se destacaram como majoritários: os monoterpenos hidrogenados β -citronelaleno (7,33%), trans-pineno (9,63%), car-3-em-2-one (8,43%), limoneno-10-ol, e os sesquiterpenos hidrogenados α -humuleno (10,52%) e β -acoradieno (12,47%). Esses compostos majoritários foram associados à atividade antimicrobiana e inseticida do óleo, que foi analisada tanto *in vitro* quanto *in silico*.

A atividade inseticida o limoneno teve ação tóxica no sistema respiratório, seguido de paralisia e morte. O OE de *C. sinensis* possui potencial para o desenvolvimento de novas tecnologias que possam ser aplicadas no manejo sustentável possuindo ação inseticida. Desse modo, é possível afirmar que o OE de *C. sinensis* e o componente majoritário limoneno, apresentaram boa ação inseticida sobre *S. oryzae* após 48h em contato com OE. A maior taxa de mortalidade observadas no constituinte limoneno foram na concentração 914,20 μ l/L, apresentando uma média e erro padrão 14,9 \pm 1,46, sendo considerado um erro aceitável entre as médias apresentando uma CL 25 19,73 μ l/L, sendo assim OE de *citrus* apresentou o efeito de omoligose no teste.

Os resultados deste estudo destacam a expressiva atividade antimicrobiana e inseticida do óleo essencial (OE) das cascas de *Citrus sinensis*. O ensaio *in vitro* revelou atividade inibitória frente à acetilcolinesterase ($CI_{50} = 72,0 \mu\text{g/mL}$), atribuída aos compostos majoritários, com destaque para o α -Humuleno, cuja avaliação *in silico* indicou energia de ligação comparável à do inibidor Galantamina.

A identificação de compostos bioativos com expressiva atividade antimicrobiana, inseticida e inibitória frente à acetilcolinesterase evidencia o valor agregado que pode ser extraído de resíduos agroindustriais, como as cascas de laranja, promovendo a valorização de subprodutos normalmente descartados. Ao propor a exploração sustentável de recursos naturais e integrar estudos químicos, biológicos e computacionais, este estudo reforça a conexão entre ciência, inovação e sustentabilidade.

Este óleo essencial apresenta potencial promissor no combate à Doença de Alzheimer e em aplicações farmacêuticas, agrícolas e biotecnológicas, evidenciando sua relevância como recurso renovável e alinhado aos princípios da bioeconomia. Estudos futuros buscarão isolar e caracterizar os constituintes ativos responsáveis pelas atividades

observadas. A identificação de compostos bioativos com atividades antimicrobiana, inseticida e inibitória frente à acetilcolinesterase ressalta o potencial das cascas de laranja como fonte de valor agregado, promovendo a valorização de resíduos agroindustriais. Este estudo integra abordagens químicas, biológicas e computacionais para explorar recursos naturais de forma sustentável, alinhando-se aos princípios da economia circular. Os resultados obtidos destacam o desenvolvimento de produtos de base natural que contribuem para a geração de renda, redução de impactos ambientais e avanço da bioeconomia global.

7 REFERÊNCIAS

ABBOTT, Walter S. et al. Um método de calcular a eficácia de um inseticida. **J. econ. Entomol**, v. 18, n. 2, p. 265-267, 1925.

ABECITRUS. **Associação Brasileira dos Exportadores de Cítricos**. Disponível em: Acesso. 09 de setembro 2024.

ADAMS, R. P. **Identification of Essential oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry**. – 4. ed. - Carol Stream, Illinois: Allured Publishing Corporation, 804 p., 2007.

ARAÚJO, M. J. C. **Óleos essenciais para o controle de plutellaxylostella (linnaeus) (lepidoptera: plutellidae) e tetranychusurticaekoch (acari: tetranychidae)**. Doutorado, tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Entomologia Agrícola, da Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2015.

ASAFOLI, V. et al. Estudo do efeito repelente e inseticida do óleo essencial das cascas de citrus sinensis L. Osbeck no controle de sitophilus zeamais mots em grãos de milho (zea mays l.) **Sociedade de ecologia do brasil**, 2007.

ASLAM, B.; WANG, W.; ARSHAD, M. I.; KHURSHID, M.; MUZAMMIL, S.; RASOOL, M. H.; et al. **Resistência antibiótica: um resumo de uma crise global. Resistência às drogas infectadas**, v. 10, n. 11, p. 1645–1658, 2018.

ASSUNÇÃO, G, V. **Caracterização química e avaliação da atividade larvicida ao Aedes aegypti do óleo essencial da espécie citrus sinensis L. Osbeck (Laranja Doce)**. 2013. 67 f. Dissertação (Mestrado em Química)- Universidade Federal do Maranhão, São Luis, 2013.

AYUKEKBONG, J. A.; NTEMGWA, M.; ATABE, A. N. A ameaça da resistência antimicrobiana nos países em desenvolvimento: causas e estratégias de controle. **Controle de Infecções por Resistência a Antimicrobianos**, v. 6, p. 47, 2017.

AZAR, P. A. et al. Chemical composition of the essential oils of Citrus sinensis cv. Valencia and a quantitative structure-retention relationship study for the prediction of retention indices by multiple linear regreson. **Journal of the Serbian Chemical Society**, v. 76, n. 12, p. 1627-1637, 2011.

BACHWANI Mukesh *et al*, IJRAP2011,2 (6) 1746-1751.

BAJPAI, V. K.; BAEK, K. H.; KANG, S. C. Control of Salmonella in foods by using essential oils: a review. **Food Research International**, v. 45, n. 2, p. 22-734, 2012.

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

BASER, K.H.C e BUCHBAUER, G..Handbook of essential oils: **science, technology and applications**. Flórida, CRC Press, 1112p., 2015.

BAUER, A.W.; KIRBY, W.M.M.; SHERRIS, J.C.; TURK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk metodo. **American Journal of Clinical Pathology**, v.45, n.4, p.493-496, 1966

BERNARDI, J. et al. Use of a custom array to study differentially expressed genes during blood Orange (Citrus sinensis L. Osbeck) ripening. **Journal of Plant Physiology**, v. 167, n. 4, p. 301-310, 2010.

BIZZO, H. R.; HOVELL, A. M. C.; REZENDE, C. M. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. **Quim. Nova, Rio de Janeiro**, v. 32, n. 3, p. 588-594, 2009.

BOMFIM De B, D *et al*, A-Pinene: Docking Study, Cytotoxicity, Mechanism Of Action, And Anti-Biofilm Effect Against Candida Albicans. **Antibiotics** V.12, P.480 2023.

BORSATO, A. V. *et al*. Yield and chemical composition of essential oil of the chamomile [*Chamomilla recutita* (L.) Raeuchert] extracted for steam distillation. **Semina. Ciências agrárias**, v. 29, n. 1, p. 129-136, 2008.

CAMPÊLO L.M.L.; Almeida, A.A.C.; Freitas, R.L.M.; Cerqueira, G.S.; Sousa, G.F.; Saldanha, G.B.; Feitosa, C.M.; Freitas, R.M. Antioxidant and Antinociceptive Effects of Citrus limon Essential Oil in Mice. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2011, 2011.

CARMO ES, Lima EO, Souza EL The potential of *origanum vulgare* l. (lamiaceae) essential oil in inhibiting the growth of some food-related aspergillus species. **Brazilian Journal of Microbiology**; 39(2): 362-367.2008.

CHENG S, Chang H, Chang S, Tsai K-H, Chen W-J. **Bioactivity of selected plant essential oils against the yellow fever mosquito *Aedes aegypti* larvae. *Bioresour Technol.* 2003; 89:99–102.**

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.

COX, S. D., Mann, C. M., Markham, J. L., Bell, H. C., Gustafson, J. E., Warmington, J. R. & Wyllie, S. G. (2000). The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). **Journal of Applied Microbiology**, 88(1), 170-175. 10.1046/j.1365-2672.2000.00943. x.

DE, E. D. C., & DE, E. G. **Estudo Do Efeito Repelente E Inseticida Do Óleo Essencial Das Cascas De Citrus Sinensis. Osbeck No Controle De *Sitophilus Zeamais* Em Grãos De Milho (*Zea Mays* L.), 2022.**

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

ELLEN MACARTHUR FOUNDATION. (2012). **Towards a Circular Economy: Economic and business rationale for an accelerated transition.** January 2012.

ELLEN MACARTHUR FOUNDATION. (2012). **Towards a Circular Economy: Economic and business rationale for an accelerated transition.** January 2012.

ESTRELA, José M.; ORTEGA, Angel; OBRADOR, Elena. Glutathione in cancer biology and therapy. **Critical reviews in clinical laboratory sciences**, v. 43, n. 2, p. 143-181, 2006.

FELIPE, C. F. B.; FONSECA, K. S.; BARBOSA, A. L. dos R.; BEZERRA, J. N. S., ANDRADE NETO, M.; FONTELES, M. M. de F.; VIANA, G. S. de B. Alterations in behavior and memory induced by essential oil of *Zingiber officinale* Roscoe (ginger) in mice are cholinergic-dependent. **Journal of Medicinal Plants Research**, Ebene, v. 2, n. 7, p. 163-170, 2008.

FERNANDES B. C. **Desenvolvimento histórico da citricultura.** 2010.

FERRONATTO, A. N. & Rossi, R. C. **Extração e aplicação do óleo essencial da casca da laranja como um ingrediente natural**. Estudos Tecnológicos em Engenharia, 12(2), 78-93. 10.4013/ete.2018.122.05. 2018.

FINNEY, D. J. A statistical treatment of the sigmoid response curve. **Probit analysis**. Cambridge University Press, London, v. 633, 1971.

FREIRE, A. dos S.; SARDEIRO, L. dos S.; OLIVEIRA, J. E. de M. **Ação acaricida do óleo essencial de laranja sobre *Oligonychus mangiferus* (Acari: Tetranychidae) associado à videira**. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 26., 2019, Juazeiro, BA/Petrolina, PE. Fruticultura de precisão: desafios e oportunidades - anais. Petrolina: Embrapa Semiárido: UNIVASF: SBF, 2019. p. 1737-1740.

GALVÃO *et al*, b-complexos de inclusão de ciclodextrina contendo *Citrus sinensis* (L.) Óleo essencial de Osbeck: uma alternativa para o controle *Aedes aegypti* larvas, **Termoquímica Acta**, 2015.

GHISELLINI, Patrizia; CIALANI, Catia; ULGIATI, Sergio. A review on circular economy: the expected transition to a balanced interplay of environmental and economic systems. **Journal of Cleaner Production**. Elsevier Ltd; V 114, p. 11-32. February, 2016.

GNANKINÉ O, Bassolé IHN. **Essential Oils as an Alternative to Pyrethroids ' Resistance against Anopheles Species Complex Giles**. **Molecules**. 2017;22(1321).

GOMES *et al*, Composição química e atividade larvicida do óleo essencial da casca de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck. **Rev. Colomb. Cienc. Quím.** Fazenda., Vol. 50(1), 48-60, 2021.

GOMES, M. S.; CARDOSO, M. G.; MACHADO, S. M. F.; MALLETT, A. C. T.; MIRANDA, C. A. S. F.; ANDRADE, J.; SILVA, L. F.; TEIXEIRA, M. L. **Caracterização Química do Óleo Essencial Extraído das Cascas de Laranja e Atividade Antioxidante Utilizando Dois Métodos de Análise**. 50º Congresso Brasileiro de Química. Cuiabá, MT. 2010.

GOMES, M.S. **Caracterização química e atividade antifúngica dos óleos essenciais de cinco espécies do gênero *Citrus***. Lavras, MG. Tese de doutorado. Universidade Federal de Lavras, 99p.2015.

GORNIAK I, Bartoszewski R, Kroliczewski J. Revisão abrangente das atividades antimicrobianas dos flavonoides vegetais. **Phytochem Rev**. 2019; 18:241-72.

GOUDEAU, D. *et al*. Tuning the orchestra: Selective gene regulation and orange fruit quality. **Plant Science**, v. 174, n. 3, p. 310-320, 2008

HASSAN, E.; PRIJONO, D. **Plants as a source of biopesticides for pest control: a new perspective**. In: GÖKCEKUS, H.; TÜRKER, U.; LaMOREAUX, J. W. (Ed.). Survival and sustainability: environmental concerns in the 21st century. Dordrecht: Springer, 2011. p. 1491-1508.

HOLTZ, A. M.; RONDELLI, V. M.; PAULO, H. H. DE.; FRANZIN, M. L.; BOTTI, J. M.; SANTOS, V. V. DOS.; PRATISSOLI, D. **Toxicidade de extratos de pinhão manso ao ácaro rajato, *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae)**. Magistra, Cruz das Almas – BA, V. 28, N.1, p.74-80, jan./mar. 2016.

IBRAHIM, M. A.; KAINULAINEN, P.; AFLATUNI, A.; IKKALA, K. T.; HOLOPAINEN, J.K. Insecticidal, repellent, antimicrobial activity and phytotoxicity of essential oils: with special reference to limonene and its suitability for control of insect pests. **Agric Food Scienc Finland**, v. 10: p. 243-259, 2001.

İŞCAN, G. Antibacterial and Anticandidal Activities of Common Essential Oil Constituents. **Records of Natural Products**, 11(4), 374-388, 2017.

ISMAN, M. B. Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 51, p. 45–66, 2006

JACOBSON, M. Botanical pesticides: past, present and future. In: ARNASON, J.T.; PHILOGÈNE, B.J.R.; MORAND, P. Insecticide of plant origin. Wa EZEONU, F C.; CHIDUME, G.I.; UDEDI, S.C. **Insecticidal properties of volatile**. 2001.

JANKOWSKA M, ROGALSKA J, WYSZKOWSKA J, STANKIEWICZ M. Molecular Targets for Components of Essential Oils in the Insect Nervous System — A Review. **Molecules**. 2018;23(34):1–20.

JUDD WS, Campbell CS, Kellog EA, Stevens PF, Donoghe MJ Plant systematics: a phylogenetic approach. 3 ed. Sunderland, Massachusetts: **Sinauer Associates, Inc. Publishers**. 2007.

KALEMBA, D. A. A. K., & Kunicka, A. (2003). Antibacterial and antifungal properties of essential oils. **Current medicinal chemistry**, 10(10), 813-829.

KARR, L. L.; COATS, J. R. Insecticidal Properties of *d*-limonene. **J Pest Science**, v. 13: p.287-290, 1988.

KERROLA, K.; GALAMBOSI, B.; KALLIO, H. Volatile components and odor intensity of four phenotypes of hyssop (*Hyssopus officinales* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 42, n. 3, p. 776-781, 1994.

KOLLER, Otto Carlos. CITRICULTURA: 1. Laranja: **Tecnologia de Produção, PósColheita, Industrialização e Comercialização**. Porto Alegre: Cinco Continentes, 2006.

KOSTYUKOVSKY, M.; RAFAELI, A.; GILEADI, C.; DEMCHENKO, N.; SHAYYA, E. Activation of octopaminergic receptors by essential oil constituents isolated from aromatic plants: possible mode of action against insect pests. **Pest Management Science**, West Sussex, v. 58, n. 11, p. 1101 – 1106, 2002.

KUMAR, P., Mishra, S., Malik, A., & Satya, S. (2012). Insecticidal evaluation of essential oils of *Citrus sinensis* L.(Myrtales: Myrtaceae) against housefly, *Musca domestica* L.(Diptera: Muscidae). **Parasitology research**, 110, 1929-1936.

LEÃO, M. **análise do óleo essencial da laranja doce citrus sinensis (l.) osbeck obtido das cascas secas e frescas através do método de extração por hidrodestilação**. SANTA CRUZ DO SUL. 2015.

LEITÃO, Alexandra. Economia Circular: uma nova filosofia de gestão para o séc. XXI. Portuguese **Journal of Finance**, Management and Accounting. V. 1, nº 2, p. 149-171. ISSN: 2183-3826. Setembro, 2015

LI, Z.-H., Cai, M., Liu, Y.-S., Sun, P.-L. & Luo, S.-L. (2019). **Antibacterial Activity and Mechanisms of Essential Oil from *Citrus medica* L. var. *sarcodactylis***. **Molecules**, 24(8), 1577. 10.3390/molecules24081577.

LIMA, A. F.C. **Atividade anestésica de óleo essencial de Citrus sp. e parâmetros de qualidade de água em juvenis de Tambatinga**. 2018.

- LOPES, L. T. A. et al Composição química e atividade antimicrobiana do óleo essencial e anatomia foliar e caulinar de *Citrus limettioides* Tanaka (Rutaceae). **Rev Ciênc Farm Básica Apl.**, 2013.
- MADHURI S, Ashwini U. Hegde, Srilakshmi N.S, Prashith Kekuda T.R*. Atividade antimicrobiana de extratos de casca de *Citrus sinensis* e *Citrus aurantium*. **Journal of Pharmaceutical and Scientific Innovation**, 2014.
- MANDALARI, G.; BENNETT, R. N.; BISIGNANO, G.; SAIJA, A.; DUGO, G.; *et al.* Caracterização dos flavonóides e pectina da casca da bergamota (*Citrus bergamia* Risso), um subproduto importante da extração de óleo essencial. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 54, p. 197–203, 2006.
- MAROYI, A. *Euclea undulata* Thunb.: Review of its botany, ethnomedicinal uses, phytochemistry and biological activities. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**; 10(11): 1030–1036, 2017.
- MARRIOTT, F. J.; SHELLIE, R.; CORNWELL, C. Gas chromatographic technologies for the analysis of essential oils. **Journal of chromatography A**, v. 936, n. 1, p. 1-22, 2001.
- MARTÍNEZ-CUENCA, M. R.; PRIMO-CAPELLA, A.; FORNER-GINER, M. A. Influência do porta-enxerto no crescimento dos *Citrus*: efeitos na fotossíntese e distribuição de carboidratos, tamanho da planta, rendimento, qualidade dos frutos e genótipos anões. **InTech**, 2016.
- MENDES SS et al. Evaluation of the analgesic and anti-inflammatory effects of the essential oil of *Lippia gracilis* leaves. **Journal of Ethnopharmacology**; 129(3): 391-397, 2010.
- MONDELLO, L. et al. Comprehensive two-dimensional GC for the analysis of Citrus essential oils. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 20, n. 2, p. 136-140, 2005
- MOSTAGHEL, Rana; OGHAZI, Pejval. Circular Business Model Challenges and Lessons Learned – An Industrial Perspective. **Journal Sustainability**. MDPI AG, DOI: 10.3390/su10030739, V. 10, nº 3, March 2018
- MOSTAGHEL, Rana; OGHAZI, Pejval. Circular Business Model Challenges and Lessons Learned – An Industrial Perspective. **Journal Sustainability**. MDPI AG, DOI: 10.3390/su10030739, V. 10, nº 3, March 2018
- NADENDLA Rama Rao, Molecular Modeling: A Powerful Tool for Drug Design and Molecular Docking, **Resonance**. 2004; 51-60.
- NAIME, Roberto. **Gestão de Resíduos Sólidos: Uma abordagem prática**. Novo Hamburgo, RS: Feevale, 2005, 134p.
- NAZZARO, F., Fratianni, F., De Martino, L., Coppola, R. & De Feo, V. Effect of Essential Oils on Pathogenic Bacteria. **Pharmaceuticals**, 6(12), 1451- 1474. 10.3390/ph6121451, 2013.
- NISHIMURA H. **Aroma constituents in plants and their repellent activities against mosquitoes**. *Aroma Res.* 2001;2.
- Novo, J. P. S., Fontes, F. V. H. M., Stein, C. P., do Lago, A. A., Bottignon, M. R., & de Salvo Soares, M. D. C. (2010). Pellets produzidos com estruturas de plantas e óleo essencial de folhas de *Ageratum conyzoides* L. afetando o desenvolvimento de *Sitophilus oryzae*. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, 221-229.

OIKEH, E. I.; ORIAKHI, K.; OMOREGIE, E. S. Análise proximal e triagem fitoquímica de resíduos de frutas *Citrus sinensis*. **O Biocientista**, v. 1, n. 2, p. 164–170, 2013.

OIKEH, E. I.; ORIAKHI, K.; OMOREGIE, E. S. **Conteúdo fenólico e atividades antioxidantes in vitro de resíduos de frutas de laranja doce (*Citrus sinensis* L.)**. *Arquivos de Medicina Básica e Aplicada*, v. 2, n. 2, p. 119–126, 2014.

OIKEN EL, Oriakhi, Omoregie ES. Analise proximal e triagem fitoquimica de resíduos de frutas *citrus sinensis*. **O Biocientista**; 1(2):164-70.2013.

OLIVEIRA E, G, 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.

ORSO, Vinícius Tres et al. Obtenção e Caracterização do Óleo Essencial de Laranja Obtido a Partir de Resíduos de *Citrus sinensis* ‘Valencia’. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 9, p. e34211931876-e34211931876, 2022.

ORTUÑO A, B et al. *Paradisi cítrico e cítricos sinensis* flavonoides: Sua influência no mecanismo de defesa contra *Penicillium digitatum*. **Química alimentar**, RJ, 2006.

OYEDEJI, A. O., Okunowo, W. O., Osuntoki, A. A., Olabode, T. B., & Ayo-Folorunso, F. (2020). Insecticidal and biochemical activity of essential oil from *Citrus sinensis* peel and constituents on *Callosobruchus maculatus* and *Sitophilus zeamais*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, 168, 104643.

Pavela R, Benelli G. **Essential Oils as Ecofriendly Biopesticides?** Challenges and Constraints. *Trends Pl Sci*; 21(12): 1000- 1007. ISSN 1360-1385, 2016.

PELIZER, Lúcia Helena; PONTIERI, Márcia Helena; DE OLIVEIRA MORAES, Iracema. Utilização de resíduos agro-industriais em processos biotecnológicos como perspectiva de redução do impacto ambiental. **Journal of Technology management & innovation**, v. 2, n. 1, p. 118-127, 2007.

PEREIRA, JOSÉ ALMEIDA; RANGEL, PAULO HIDEO NAKANO. **Produtividade e qualidade de grãos de arroz irrigado no Piauí**. 2001

PRAJAPATI V, Tripathi AK, Aggarwal KK, Khanuja SPS. Insecticidal , repellent and oviposition-deterrent activity of selected essential oils against *Anopheles stephensi* , *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus*. **Bioresour Technol**. 2005; **96**:1749–57.

PRIYANKA Singh, R. Shukla, B. Prakash, A. Kumar, S. Singh, P.K. Mishra, N.K. Dubey, Perfil químico, atividade antifúngica, antiaflatoxigênica e antioxidante de *Citrus maxima* Burm. e *Citrus sinensis* (L.) Óleos essenciais de Osbeck e seu monoterpene cíclico, DL-limoneno, **Food Chem. Toxicol** ., 48, 1734-1740, 2010.

QUEIROZ, R. A. *et al.* **Modelagem e simulação do resfriamento do leite de frutas não climatéricas com ar forçado**. Estudo de caso: laranja valência. 2016.

RAHMAN, S.; PARVEZ, A. K.; ISLAM, R.; KHAN, M. H. Atividade antibacteriana de especiarias naturais em múltiplas *Escherichia coli* resistentes a drogas isoladas da água potável. **Bangladesh Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 10, p. 10, 2011.

RAJKUMAR S, Jebanesan A. Chemical composition and larvicidal activity of leaf essential oil from *Clausena dentata* (Willd) M. Roam. (Rutaceae) against the chikungunya vector, *Aedes aegypti* Linn. (Diptera: Culicidae). **Journal of Asia-Pacific Entomology**; 13: 107-109, 2010.

RATTAN, R. S. **Mechanism of action of insecticidal secondary metabolites of plant origin.** *Crop Protection*, Guildford, v. 29, n. 9, p. 913-920, 2010.

Raut, J. S. & Karuppayil, S. M. (2014). A status review on the medicinal properties of essential oils. *Industrial Crops and Products*, 62, 250-264. 10.1016/j.indcrop.2014.05.055, 2014.

RAUT, J. S. & Karuppayil, S. M. **A status review on the medicinal properties of essential oils.** *Industrial Crops and Products*, 62, 250-264. 10.1016/j.indcrop.2014.05.055.

REIS, Lineu Belicodos; FADIGAS, Eliane A. F. Amaral; CARVALHO, Cláudio Elias. Energia, **Recursos Naturais e a Prática do Desenvolvimento Sustentável**. 2. ed, Barueri, SP: Manole, 2012, 440p

RYAN, M. F.; BYRNE, O. Plant-Insect coevolution and inhibition of acetylcholinesterase. *Journal of Chemical Ecology*, New York, v. 14, n. 14, p. 1965- 1975, 1988.

SALAS MP, Céliz G, Geronazzo H, Daz M, Resnik S. Atividade antifúngica de flavonoides naturais e enzimaticamente modificados isolados de espécies cítricas. **Química alimentar**, 2011.

SANTANA, I, I. Fundamentos em aromatologia – **Instituto Brasileiro de aromatologia-IBRA**. 2018.

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, 2003. 112p.

SANTOS, M. A. T.; AREAS, M. A.; REYES, F. G. R. Piretróides: **uma visão geral.** *Alimentos e Nutrição*, Araraquara, v. 18, n. 3, p. 339-349, 2007

SCHICK, M. P.; SCHICK, R. O. Understanding and implementing safe and effective flea control. *Journal of the American Animal Hospital Association*, v. 22, p. 421- 434, 1986.

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

SHARON-ASA, L. et al. Citrus fruit flavor and aroma biosynthesis: isolation, functional characterization, and developmental regulation of Cstps1, a key gene in the production of the sesquiterpene aroma compound valencene. *The Plant Journal*, v. 36, n. 5, p. 664-674, 2003.

SILVA SL, Char JS, Figueiredo PMS, Yano T, Cytotoxic evaluation of essential oil from *Casearia sylvestris* Sw on human cancer cells and erythrocytes. *Acta amazônica*, 2008.

SIMAS *et al.* **Produtos naturais para o controle da transmissão da dengue: atividade larvicida de Myroxylon balsamum (óleo vermelho) e de terpenóides e fenilpropanóides**, 2004.

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

STEWART, J. J. P. 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.

SUN, J. D-Limonene: safety and clinical applications. *Alternative Medicine Review*, 12(3). 2007.

SUSSMAN, J.L., Harel, M., Frolow, F., Oefner, C., Goldman, A., Toker, L., et al., 1991. Atomic structure of acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: a prototypic acetylcholine-binding protein. **Science** 253, 872–879.

SWAMY, M. K., Akhtar, M. S. & Sinniah, U. R. Antimicrobial Properties of Plant Essential Oils against Human Pathogens and Their Mode of Action: An Updated Review. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2016, 1-21. 10.1155/2016/30124622016.

TAYLOR, Richard D.; JEWSBURY, Philip J.; ESSEX, Jonathan W. A review of protein-small molecule docking methods. **Journal of computer-aided molecular design**, v. 16, p. 151-166, 2002.

TSAO R, Lee S, Rice PJ, Jensen C, Coats JR. **Monoterpenoids and Their Synthetic Derivatives as Leads for New Insect-Control Agents**. In: **In Synthesis and Chemistry of Agrochemicals IV**. 1995. p. Chapter 28.

VERMA, V. C.; Pathak, P. H. Effect Of Citrus Sinensis Oil Volatiles On Egg Hatchability Of Rice Moth (*Corcyra Cephalonica*) And Its (Gc-Ms) Analysis. **World Journal Of Pharmaceutical Research**, 4, N. 6, P. 1461-1473, 2015.

VIEGAS, C, J. Terpenos com atividade inseticida: uma alternativa para o controle químico de insetos. **Quim. Nova**, Vol. 26, No. 3, 390-400, 2003.

VILLAMIZAR, L. H. et al. **Linalool, a Piper aduncum essential oil component, has selective activity against Trypanosoma cruzi trypomastigote forms at 4 °C**. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** (Online), v. 112, p. 131-139, 2017.

WANNES WA et al. **Antioxidant activities of the essential oils and methanol extracts from myrtle (*Myrtus communis* var. *italica* L.) leaf, stem and flower**. **Food and Chemical Toxicology**; 48(5): 1362-1370, 2010.

WARE, G. W.; WHITACRE, D. M. An introduction to insecticides. (4th edition). In: WARE, G. W. (Ed.). **The pesticide book**. Willoughby: Meister, 2004. Disponível em: . Acesso em: 4 abr. 2012

WELCH, Bernardo L. A significância da diferença entre duas médias quando as variâncias populacionais são desiguais. **Biometrika**, v. 29, n. 3/4, p. 350-362, 1938.

YANG, C., Chen, H., Chen, H., Zhong, B., Luo, X. & Chun, J. **Antioxidant and Anticancer Activities of Essential Oil from Gannan Navel Orange Peel**. **Molecules**, 22(8), 1391. 10.3390/molecules22081391. 2017.

ZAYED, A. A.; SAEED, R. M. A.; EL NAMAKY, A. H.; ISMAIL, H. M.; MADY, H. Y. **Influence of *Allium sativum* and *Citrus limon* oil extract and *bacillus thuringiensis israelensis* on some biological aspects of *Culex pipiens* larvae (Diptera: Culicidae)**. **W.J. Zool.**, v. 4: p. 109-121, 2009.

ZHANG, M. L., Tao, N. G. & Liu, Y. J., Chemical composition and antimicrobial activities of essential oil from the peel of bingtang sweet orange (*Citrus sinensis* Osbeck). **International Journal Of Food Science & Technology**, 44(7), 1281-1285. 10.1111/j.1365-2621.2009.01947.2009.

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