AValiação QuÍmica e Atividades AntifÚngica e AntioXidante dos Óleos Essenciais dos Frutos Verdes e Maduros de *Citrus limonia* Osbeck. (Limão-China)

Antônio Carlos Pereira de Menezes Filho^{1*}

¹Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano, Campus Rio Verde, 75901-970, Rio Verde, Goiás, Brasil

E-mail: astronomoamadorgoias@gmail.com

Recebido: 08/06/2020, Aceito: 04/12/2020

Resumo

O objetivo do trabalho foi avaliar a composição química e as atividades antioxidante e antifúngica dos óleos essenciais dos frutos verdes e maduros de *Citrus limonia*. O óleo essencial foi produzido a partir da casca dos limões por hidrodestilação e o rendimento em porcentagem. O perfil químico realizado em cromatógrafo a gás com espectrômetro de massas. A atividade antioxidante e antifúngica foi realizada em diluições do óleo essencial na redução do radical DPPH, e pelo método de difusão em ágar. O rendimento foi de 2,63 e 3,44%, os compostos majoritários foram Limoneno 80,05%, 3-Careno 15,12% para o óleo essencial frutos verdes, e Limoneno 74,54%, 3-Careno 9,11 e α -Pinenos com 8,31% para o óleo essencial frutos maduros, respectivamente. A atividade antioxidante foi entre 49,82 a 100%, e 21,23 a 96,39% para frutos verdes e maduros, respectivamente. A atividade antifúngica foi de 1,08 a 88,17% e 9,17 a 71,45% para *Sclerotinia sclerotiorum*, 44,13 a 96,18%, e 6,51 a 93,51% para *Colletotrichum acutatum*, e 71,94 a 100%, e 25,18 a 90,03% para *Aspergillus flavus*, respectivamente, para frutos verdes e maduros de *C. limonia*. O óleo essencial de ambos os períodos de maturação para *Citrus limonia* apresentou importante resultado como agentes antioxidantes e antifúngicos.

Palavras-chave: *Aspergillus flavus*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Colletotrichum acutatum*, hidrodestilação

CHEMICAL EVALUATION AND ANTIOXIDANT AND ANTIFUNGAL ACTIVITIES OF ESSENTIAL OILS OF GREEN AND RIPE FRUITS FROM *Citrus limonia* Osbeck. (LIMON CHINA)

Abstract

The objective of the work was to evaluate the chemical composition and the antioxidant and antifungal activities of the essential oils of green and ripe fruits of *Citrus limonia*. The essential oil was produced from the peel of lemons by hydrodistillation and the percentage yield. The chemical profile performed in a gas chromatograph with mass spectrometer. The antioxidant and antifungal activity was carried out in dilutions of the essential oil in reducing the DPPH radical, and by the agar diffusion method. The yield was 2.63 and 3.44%, the major compounds were Limonene 80.05%, 3-Carene 15.12% for the essential oil of green fruits, and Limonene 74.54%, 3-Carene 9.11 and α -Pinene with 8.31% for the ripe fruit essential oil, respectively. The antioxidant activity was between 49.82 to 100%, and 21.23 to 96.39% for green and ripe fruits, respectively. The antifungal activity was 1.08 to 88.17% and 9.17 to 71.45% for *Sclerotinia sclerotiorum*, 44.13 to 96.18%, and 6.51 to 93.51% for *Colletotrichum acutatum*, and 71.94 to 100%, and 25.18 to 90.03% for *Aspergillus flavus*, respectively, for green and ripe fruits of *C. limonia*. The essential oil of both maturation periods for *Citrus limonia* showed an important result as antioxidant and antifungal agents.

Keywords: *Aspergillus flavus*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Colletotrichum acutatum*, hydrodistillation.

Introdução

Os citros apresentam suas origens a partir do Continente Asiático, sendo as primeiras sementes e mudas introduzidas no Brasil pelos colonizadores, na região do então estado da Bahia. As espécies introduzidas no território brasileiro apresentaram boa eficiência em desempenho de frutificação, considerado até melhores do que na própria região de origem. As principais espécies plantadas em solo brasileiro são dos gêneros *Citrus*, híbridos e afins, dentre eles o *Fortunella* e *Poncirus*, *Citrus sinensis*, *Citrus reticulata*, *Citrus deliciosa*, *Citrus limon*, *Citrus latifolia*, *Citrus aurantifolia*, *Citrus limettoides*, *Citrus paradisi*, *Citrus medica*, *Citrus aurantium* e *Citrus grandis* (LOPES et al., 2011).

A representatividade dos citros, no Brasil, apresenta importante parcela na economia brasileira, por ser este país, o maior produtor e exportador de citros do mundo. As principais culturas são representadas pelas variedades de laranjas, tangerinas, limeiras ácidas e os limões verdadeiros. São Paulo é o estado brasileiro com maior produção, apresentando importante parcela representativa com cerca de 85%, e um total de 14,8 milhões de toneladas (t) de laranja, 1,5 milhão de t de limão, na variedade taiti, e de tangerinas nas variedades Ponkan e o tangor Murcott (LOPES et al., 2011). A região do Rio Grande do Sul no Brasil, segundo Castilhos et al. (2019), apresenta em dados de 2017 uma área de 35 mil hectares com produção bruta de 390 milhões de reais nas culturas de laranja, limão e tangerinas.

O limão-china, também conhecido como limão-rosa ou limão-cravo, pertence ao gênero e espécie *Citrus limonia* Osbeck. De acordo com Rebequi et al. (2009), a variedade china corresponde ao hibridismo entre o limoeiro verdadeiro [*Citrus limon* (L.) Brum. f.] e a tangerina (*Citrus reticulata sensu* Swingle).

Os citros são importantes fontes de ácido hidroxicinâmico, flavonoides e de óleo essencial a partir do flavedo (casca), sendo quase sua composição quase que exclusivamente de D-Limoneno, β -Pineno, γ -Terpineno e de Citral (Neral e Geranial). Os inúmeros compostos extraídos da casca do limão apresentam importantes atividades biológicas, pois atuam como eficientes agentes antioxidantes inibidores ou supressores de oxigênio singlete, dentre outros radicais e superóxidos, inativadores de metais pró-oxidantes, com ação larvicida, inseticida e antifúngica (DIMITRIOS, 2006; LIMA et al. 2008; LUZIA; JORGE, 2010).

Os óleos essenciais (OEs) podem ser extraídos de sementes, frutos, flores, folhas, galhos, cascas, raízes e tubérculos (POMBO et al., 2018). É importante saber que, o OE apresenta uma complexa composição

fitoquímica de monoterpenos, sesquiterpenos e de fenilpropanoides (XAVIER et al., 2016). Com isso, os compostos que constituem o OE, bem como as atividades antioxidantes e antifúngicas, são também influenciados pelas variações de produção a partir dos metabólitos primários e secundários nos vegetais. Na determinação dos constituintes químicos dos OEs, fatores como período, sazonalidade, estresse, região de cultivo, ou mesmo horário de coleta podem interferir tanto positiva quanto negativamente nos teores dos compostos voláteis, influenciando todo o processo ao qual o OE será destinado (LEAL et al., 2001; PEREIRA; CARDOSO, 2012).

A atividade antioxidante promovida pelos OEs vem ganhando atenção da comunidade científica, visto que, estes são eficientes agentes antioxidantes no sequestro de radicais livres que produzem ações deletérias nas células, como alterações significativas nas biomoléculas de DNA e RNA, podendo provocar inúmeros tipos de tumores, além de estar envolvido com outras patologias relacionadas ao estresse oxidativo, como no envelhecimento precoce da pele, cirrose e artrite reumatoide (MORAIS et al., 2006; EVERTON et al., 2018).

De acordo com Hirata et al. (2004), os radicais livres são constituídos de um átomo ou associação de átomos que possuem um elétron desemparelhado, orbitando a zona mais externa da eletrosfera do núcleo atômico. Os radicais mais comuns são Oxigênio e Nitrogênio, assim como ânions superóxido ($O_2^{\cdot-}$), hidroxila ($\cdot OH$) e lipoperoxila ($LOO^{\cdot}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), óxido nítrico ($NO^{\cdot}$) e o peroxinitrito ($ONOO^{\cdot}$). Estes radicais em excesso desencadeiam lesões celulares como peroxidação dos lipídeos, inibindo também funções enzimáticas e a ativação excessiva de genes pró-inflamatórios (GUTTERIDGE; HALLIWELL, 2010; SILVA; FERRARI, 2011).

Outra importante ação é a atividade antifúngica, onde os produtos de formulações fungicidas atuais são provenientes de moléculas sintéticas, que muitas vezes pode ser prejudicial às diferentes formas de vida, principalmente para os insetos, devido a sérios problemas ambientais a curto, médio e longo prazo no meio ambiente. Com isso, o estudo dos OEs como agentes fúngicos e fungistáticos é exaustivamente avaliado, buscando a cada pesquisa, novas fontes de extração para o desenvolvimento de novos produtos com características na linha verde que promovam a qualidade de vida e um meio ambiente mais saudável (SILVA et al., 2018; BAGHERABADI; ZAFARI; GHOBADI, 2018; MARTINAZZO et al., 2019).

O uso de compostos orgânicos a partir do metabolismo secundário de plantas vem sendo amplamente investigado frente a agentes fúngicos que causam sérios problemas agrícolas e econômicos no

desenvolvimento de um país. Importantes ações antifúngicas são observadas em fungos fitopatogênicos em frutas, hortaliças e sementes, bem como na preservação de alimentos e no desenvolvimento de agentes fungicidas de uso tópico e interno em humanos e animais (SANTOS et al., 2011).

Entre as várias formas fitopatológicas estão os fungos, *Sclerotinia sclerotiorum* (mofo-branco), o *Colletotrichum acutatum* uma das formas conhecidas por antracnose e o gênero *Aspergillus*, *Aspergillus flavus* que produz uma importante e mortal toxina (micotoxina), que comumente causam perdas significativas anuais na produção de grãos e frutas (XAVIER et al., 2016).

O mofo-branco (*Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary manifesta-se com maior intensidade no período chuvoso nas áreas de culturas de soja, milho, algodão e grãos-de-bico (GRAU; HARTMAN, 2015). Os escleródios são a principal forma de infecção em plantas, podendo ficar viáveis no solo por até 11 anos (SILVA et al., 2018).

Antracnose é o nome dado à doença causada por diversos fungos do gênero *Colletotrichum*. É uma fitopatologia bem conhecida entre os fruticultores de banana, morango, mamão, abacate, noni e pimenta-de-cheiro, que quando se instala causa podridão intensa e rápida nos frutos em desenvolvimento e no armazenamento, sendo o *Colletotrichum acutatum* um dos fungos de maior importância fitopatogênica para este gênero, de acordo com Yenjit et al. (2010), Sousa et al. (2018), e Silva et al. (2019). Já para o gênero dos fungos *Aspergillus*, *Aspergillus flavus* é altamente perigoso, devido à produção de metabólitos secundários como micotoxina e aflotoxina, que podem desencadear a morte de animais e humanos (VALENTINI et al., 2019).

Estudos realizados com populações soropositivas (vírus HIV I/II/III) ligam a ação provocada por estas toxinas ao aumento de células CD4 e ao desenvolvimento de vários tipos de tumores malignos (SAMSON et al., 2014). *Aspergillus flavus* se desenvolve com grande facilidade em grãos armazenados como soja, milho, amendoim, algodão, sorgo e nozes (AMAIKE; KELLER, 2011; MARTINAZZO et al., 2019).

O trabalho teve por objetivo avaliar o perfil químico e as atividades antioxidante e antifúngica dos óleos essenciais dos frutos verdes e maduros de *Citrus limonia* (limão-china) coletados em Rio Verde, Goiás, Brasil em 2019.

Material e Métodos

Coleta do material

O limão (*C. limonia*) variedade “china” foi coletado em dois períodos de maturação, verde e maduro nos meses entre agosto e setembro de 2019, na propriedade rural localizada no município de Rio Verde, estado de Goiás, Brasil, com localização georreferenciada (17°43'11.8"S 50°53'05.2"W) (Garmin, Mod. GPS/Glonass 64x).

Produção do óleo essencial

O OE dos frutos verdes e maduros foi extraído por hidrodestilação em equipamento tipo *Clevenger* (Mylabor). Em triplicata, foram pesados cerca de 200 g de flavedo do fruto em balança analítica digital (Marte, Mod. AY220). O material foi, em seguida, triturado em processador de alimentos (Philco, Mod. PH900) com 500 mL de água destilada e realizado a extração. O sistema ficou em refluxo por 3 horas. Posteriormente, o hidrolato foi coletado e transferido ao freezer a -10 °C. Após o congelamento da água, o OE foi coletado com auxílio de uma pipeta de *Pasteur* (Labor Import) de 3 mL. O rendimento foi calculado, conforme equação [1].

$$\text{Rend. (\%)} = (\text{massa OE/massa in natura}) \times 100 \text{ Eq. [1]}$$

O OE, após determinação da massa, foi armazenado em frasco de vidro âmbar e mantido em refrigerador a -8 °C até ser submetido às análises.

Análise do perfil químico por CG-EM

A análise da constituição química do OE dos frutos verdes e maduros foi realizada em sistema de cromatógrafo a gás com espectrômetro de massas (CG-EM), equipado com auto-injetor (Shimadzu), coluna Restek Rtx-5ms (30 m x 0,250 mm x 0,25 µm) fundida com sílica, e espectrômetro de massas (Shimadzu) com detector por ionização por impacto eletrônico (IE) (70 eV). A temperatura inicial foi mantida a 60 °C por 3 minutos, seguido de um acréscimo de 3 °C min⁻¹ até atingir 200 °C e, posteriormente, foi programada para um aumento de temperatura de 15 °C min⁻¹ até 270 °C, permanecendo nessa temperatura por mais de 1 minuto.

As temperaturas do injetor e do detector foram de 250 °C e 300 °C. A análise foi realizada, utilizando gás hélio (He) como carreador com pressão de injeção de 50 KPa, faixa de detecção do espectrômetro de massas: 43-600 m/z: 2,0 min⁻¹ e fluxo de 3 mL min⁻¹. A identificação dos componentes do OE foi baseada pelo índice de retenção linear (Índice de Kovats) (IK), calculado em relação aos tempos de retenção da série homóloga de *n*-alcanos (C-06 a C-42) (Sigma-Aldrich) e no padrão de fragmentação observado nos espectros de massas, através do espectro de íons totais, por comparação destes com a literatura (ADAMS, 2007) e espectroscopia (Nist 11) do CG-EM.

Atividade biológica na redução do DPPH

A atividade antioxidante foi determinada, segundo Mezza et al. (2018) adaptado. Foi utilizado radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) (Sigma-Aldrich, P.A – ACS, pureza 100%). O ensaio antioxidante foi realizado pelo método de microdiluição em microplacas de 96 poços (Videplast), utilizando leitora de microplacas UV-Vis (Molecular Devices, Mod. Spectramax M3). Para cada poço, foi adicionado 100 $\mu\text{L mL}^{-1}$ de uma solução metanólica de DPPH (Sol. Padrão) na concentração 0,06 mMol mL^{-1} , 100 $\mu\text{L mL}^{-1}$ de OE diluído em metanol (Dinâmica, P.A – ACS, pureza 99,8%) nas seguintes concentrações: Puro; 50; 40; 30; 20; 10; 5; 2,5 e 1,25 $\mu\text{L mL}^{-1}$. A microplaca foi mantida em local escuro e resfriado a 4 °C. A leitura foi realizada no comprimento de ondas em 517 nm, após 1 hora de reação. Uma curva padrão foi realizada com a solução de DPPH na concentração 0,06 mMol mL^{-1} de referência. Como controle negativo, utilizou-se a solução de referência de DPPH 0,06 mMol mL^{-1} , e como branco instrumental o metanol. Os resultados foram expressos em percentagem (%) de redução de DPPH.

Atividade antifúngica pelo método de difusão em ágar

O teste antifúngico foi realizado pela metodologia de difusão em ágar. Foram utilizados isolados de *Sclerotinia sclerotiorum*, *Colletotrichum acutatum* e *Aspergillus flavus*, mantidos em meio batata, dextrose e ágar (Kasvi, BDA). Os isolados foram doados pelos laboratórios de Produtos Naturais e de Química Tecnológica do IF Goiano Campus Rio Verde, Goiás, Brasil, e mantidos em banco micológico no laboratório de Química Tecnológica na mesma instituição. A atividade antifúngica dos OEs sobre o crescimento micelial de *S. sclerotiorum*, *C. acutatum* e *A. flavus*, foram avaliados através de diferentes concentrações, partindo de 100 (OE puro); 50; 25; 12,5; 6,25; 3,13 e 1,56 $\mu\text{L mL}^{-1}$ diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO) (Vetec, P.A – ACS, pureza 99,7%). Como controle negativo, utilizou-se a testemunha (ausência de óleo essencial) e DMSO puro, e como controle positivo fungicida de referência *Frownicide*® 500 SC (ISK, Fluazinam), registro no Ministério da Agricultura nº 7695, na concentração pré-determinada de 10 $\mu\text{L mL}^{-1}$.

As concentrações dos OEs foram adicionadas ao meio de cultura BDA após esterilização e resfriamento, bem como para os tratamentos com fungicida e DMSO. Após solidificação do meio em câmara de fluxo laminar (Marconi, Mod. MA1550), 1 disco de micélio para cada cepa de *S. sclerotiorum*, *C. acutatum* e *A. flavus* com 7 mm de diâmetro, foi depositado separadamente no centro da placa de Petri de 10 cm de diâmetro. Em seguida, foram incubadas em estufa de cultura

bacteriológica (De Leo, Mod. DL-CBE42L) à temperatura entre 20 °C (GARCIA et al., 2012), 23 °C (BRAGANÇA et al., 2016), e 25 °C (HU et al., 2017), respectivamente.

A avaliação consistiu em medições diárias do diâmetro das colônias, por meio de um paquímetro digital (Digimess, Mod. 100-174BL) 150 mm, iniciadas após 24 horas a partir do início da incubação, e encerradas quando as colônias fúngicas, do tratamento testemunha e DMSO, atingiram completamente a área interna da placa de Petri. A determinação do percentual de inibição de crescimento (%PIC) foi realizada, de acordo com a equação 2 proposta por Garcia et al. (2012).

$$\% \text{PIC} = (\text{DTT} - \text{DTQ}) / \text{DTT} \times 100 \text{ Eq. [2]}$$

Onde PIC = percentual de inibição de crescimento, DTT = diâmetro no tratamento testemunha, DTQ = diâmetro no tratamento químico.

Análise estatística

A análise consistiu em uma avaliação em triplicata seguida de ($\pm$) desvio padrão para determinação do rendimento de OE e antioxidante. Para ambos os ensaios, foi adotado teste de *Student* e *Tukey* ($p \geq 0,05$). O ensaio antifúngico foi realizado em quadruplicata, seguido de ($\pm$) desvio padrão das médias. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias de todos os tratamentos com OE foram comparadas ao fungicida comercial pelo teste de *Scott-Knott*, com nível de significância de 5%. O programa de estatística empregado foi o *PAST 3* (versão livre, 2019).

Resultados e Discussão

O rendimento dos OEs foi de $2,63a \pm 0,21$ para frutos verdes, e de $3,44a \pm 0,04$ para frutos maduros, não apresentando diferença estatística significativa em ambas às amostras pelo teste de *Student* ($p \geq 0,05$). Os frutos cítricos em inúmeros trabalhos apresentam alto rendimento de extração de OE (TEIXEIRA; MARQUES; FIGUEIREDO, 2013; TEIXEIRA; MARQUES; PIO, 2014; SIMAS et al., 2015). Lopes et al. (2013) também encontraram um bom rendimento de OE de 9,90; 10,76 e 5,70% na casca dos frutos de *Citrus limettoides* var. Tanaka coletados nas regiões de Campestre, Nova América e Itapuranga no estado de Goiás, Brasil, respectivamente.

Os compostos majoritários foram Limoneno com 80,05% e 3-Careno com 15,12% para frutos verdes, e para frutos maduros Limoneno 74,54%, 3-Careno 9,11% e α -Pineno com 8,31%. Moosavy et al. (2017) encontraram para o OE da casca de *Citrus limon* o D-

Limoneno 46,93%, γ -Terpineno 16,89% e *Tri*-Ciclono com 6,67% como compostos majoritários. Lopes et al. (2013) obtiveram o Limoneno como composto principal na casca dos frutos de *C. limettoides* var. Tanaka coletados em três regiões no estado de Goiás, Brasil, com 75,06; 75,18 e 70,6% para Campestre, Nova América e Itapuranga, respectivamente. De acordo com Simas et al. (2015), o Limoneno é o componente predominante na composição dos OEs de frutas cítricas, variando entre as diferentes espécies e entre as variedades de uma mesma espécie.

Na Tabela 1, estão apresentados os resultados da atividade de redução do radical DPPH em diferentes concentrações de OEs dos frutos verdes e maduros de *C. limonia*.

Tabela 1. Atividade antioxidante pela redução do DPPH em sucessivas diluições dos óleos essenciais dos frutos verdes e maduros de *C. limonia*.

Conc. mg mL ⁻¹	FLV (%)	FLM (%)
Puro	100 ± 0,00aA	96,3 ± 0,39aA
50	97,3 ± 0,19bA	82,1 ± 0,09bB
40	92,1 ± 0,21bA	74,3 ± 0,33cB
30	85,9 ± 0,11cA	49,8 ± 0,61dB
20	66,2 ± 0,13dA	47,3 ± 0,51edB
10	56,6 ± 0,41edA	21,2 ± 0,14fB
5	49,8 ± 0,33f	-
2,5	-	-
1,25	-	-

FLV = Fruto limão verde. FLM = Fruto limão maduro. (-) não determinado. Resultados referem à média de três repetições seguidas por ($\pm$) desvio padrão. Os resultados na coluna seguida de letras (minúsculas) e (maiúsculas) diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($p \geq 0,05$). Fonte: Autores, 2019.

De acordo com Yazgan et al. (2019), o OE de limão apresenta importante atividade biológica como agente antioxidante. Isso pode ser observado neste estudo com os OEs a partir dos frutos verdes e maduros de *C. limonia*, onde para o OE dos frutos verdes foi observada alta capacidade na redução do radical DPPH em todas as concentrações, onde o puro apresentou redução de 100%. Não foi observado ação antioxidante nas concentrações inferiores a 5 mg mL⁻¹. Estatisticamente, as concentrações 50 e 40 mg mL⁻¹ não apresentaram diferença significativa, entretanto, observa-se alta eficiência na percentagem de redução do DPPH acima de 90%. O mesmo foi observado para o OE dos frutos maduros, em que em todas as concentrações, exceto nas concentrações inferiores a 10 mg mL⁻¹, não foi observado atividade antioxidante.

Ambas as amostras de OE, neste estudo, mostraram, para o modelo antioxidante DPPH, importante atividade na ação antioxidante. Entretanto, outros ensaios deverão ser realizados para determinação da concentração de inibição (CI₅₀), e comparando entre outros modelos de agentes oxidantes, como FRAP, ABTS⁺ e ORAC. Sendo assim, sugere-se que ambos os OEs de *C. limonia* podem ser inseridos em estudos no desenvolvimento de fórmulas para cosméticos, bem como aditivos antioxidantes em alimentos e na indústria de biotecnologia. Na análise estatística para determinar ambas as amostras de OEs dos frutos verdes e maduros nas respectivas concentrações, foi possível inferir estatisticamente que todas as concentrações apresentaram diferença estatística pelo teste de Tukey ($p \geq 0,05$).

Moosavy et al. (2017) encontraram atividade antioxidante de 55,09% em OE de *C. limon* adquirido em Tabriz, Irã, entretanto, os pesquisadores não determinaram a atividade quanto à maturidade das amostras avaliadas. De acordo com Bakkali et al. (2008), os OEs apresentam atividade antioxidante naturalmente, isso se deve aos constituintes químicos por uma complexa constituição química, envolvendo as classes de terpenóides, terpenos, aromáticos e alifáticos.

Na Figura 1, a porcentagem de inibição de crescimento PIC para os OEs dos frutos verdes e maduros de *C. limonia* sobre o isolado fúngico de *S. Sclerotiorum* é apresentada.

É possível observar na Figura 1, boa atividade de inibição de crescimento fúngico em ambos os OEs dos frutos verdes e maduros de *C. limonia* para o isolado de *S. sclerotiorum*. No ensaio anfúngico, foi possível verificar que *S. sclerotiorum* apresentou baixa resistência em ambos os OEs, mesmo nas menores concentrações 1,56 e 3,13 μ L mL⁻¹, apresentando taxas de PIC entre 1,08 a 88% para OE frutos verdes e de 9,17 a 71% para o OE dos frutos maduros, respectivamente.

Quando comparados ao fungicida comercial *Frownside* na concentração de 10 μ L mL⁻¹, o mesmo apresentou atividade de supressão do crescimento de 100%. Observa-se que ambos os OEs mesmo mostrando altas taxas de inibição foram estatisticamente inferiores ao fungicida comercial, conforme teste de *Scott-Knott* 5%. As melhores concentrações foram entre 25 a 100 μ L mL⁻¹ para OE frutos verdes, e entre 50 a 100 μ L mL⁻¹ para OE frutos maduros. Possível sugestão seria avaliar em trabalhos futuros a combinação de ambos os OEs, ou mesmo combinações entre outros OEs do gênero *Citrus*.

Trabalho similar, no entanto, avaliando a inibição de frutos verdes e maduros de frutos não cítricos, realizado por Menezes Filho et al. (2020) onde avaliaram o OE de frutos verdes e maduros de *Zanthoxylum rhoifolium* sobre *S. sclerotiorum*,

Figura 1. Porcentagem de inibição de crescimento para o isolado de *Sclerotinia sclerotiorum* em diferentes concentrações de óleo essencial dos frutos verdes e maduros de *Citrus limonia*. Letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de *Scott-Knott* com nível de significância de 5%.

C. gloeosporioides e *A. flavus*. Os pesquisadores obtiveram alta porcentagem de inibição de crescimento tanto para o OE frutos verdes entre 12-80% para *S. sclerotiorum*, entre 5-46% para *C. gloeosporioides*, e entre 15-21% para *A. flavus*, e para o OE dos frutos maduros entre 19-55% para *S. sclerotiorum*, entre 3-91% para *C. gloeosporioides* e entre 2-44% para *A. flavus* nas mesmas concentrações aplicadas neste estudo. Embora tenha utilizado outra espécie de *Colletotrichum* que apresentou maior sensibilidade no OE dos frutos maduros de *Z. rhoifolium*.

Vários trabalhos avaliam a ação antifúngica de inúmeros OEs, como nos estudos de Davari e Ezazi (2017), onde os pesquisadores analisaram os OEs de *Zhumereia majdae* e *Heracleum persicum* em diferentes concentrações para os isolados de *S. sclerotiorum* com PIC de 63,11% a 100%. Ma et al. (2016) obtiveram diferentes concentrações de OE de *Ziziphora clinopodioides*, aplicado pelo método a vapor e contato em plantas de *Brassica campestris*. Na fase a vapor, os investigadores observaram redução de germinação de 75%, e em plantas cultivadas em vasos de 41,3 a 97,1% de PIC para *S. sclerotiorum*. Xavier et al. (2016), utilizando OE das folhas de *Cardiophyllum calophyllum*, obtiveram alta inibição contra *S. sclerotiorum* de 87,63% para a maior concentração, e de 28,27% para a menor concentração de OE diluído.

Estão apresentadas as porcentagens de inibição de crescimento PIC para os OEs dos frutos verdes e maduros de *C. limonia* sobre o isolado de *C. acutatum*, de acordo com a (Figura 2).

O isolado de *C. acutatum* apresentou baixa resistência nas diversas concentrações de OEs para ambos os períodos de maturação dos frutos de *C. limonia*. Os resultados para este isolado do gênero *Colletotrichum* foi superior ao verificado na (Figura 1) para o isolado do gênero *Sclerotinia*. Os OEs demonstraram ser altamente eficientes no combate deste fungo. As maiores concentrações 50 e 100 µL mL⁻¹ apresentaram PIC médio de 96% para OE frutos verdes e de 89% a 93% para OE frutos maduros. Quando comparados ao fungicida de referência e pelo teste de *Scott-Knott* 5%, foi possível determinar que as concentrações 50 e 100 µL mL⁻¹ são as melhores opções para uso como agente fungistático equiparáveis ao fungicida de referência como observados na (Figura 2).

Pineda et al. (2018) avaliaram o composto miristicina a partir do OE de *Petroselinum crispum* sobre isolado de *C. acutatum*, na concentração de 100 µg mL⁻¹ já obtiveram bons resultados de inibição de crescimento. Já na concentração de 200 µg mL⁻¹, observaram a redução de crescimento de 35% e para a concentração de 400 µg mL⁻¹ 55% de redução.

Dias-Arieira et al. (2010) estudaram a ação antifúngica dos OEs de *Azadirachta indica* e *Eucalyptus citriodora* sobre o desenvolvimento de *C. acutatum*, obtendo eficientes taxas de inibição entre 84,4% a 74,4%, e de 91,1% a 35,6%, respectivamente, em diferentes concentrações.

Celoto et al. (2008) avaliaram diferentes extratos de vegetais como melão-de-são-caetano, espirradeira e eucalipto, obtendo valor de PIC superior a 50%. Em

Figura 2. Porcentagem de inibição de crescimento para o isolado de *Colletotrichum acutatum* em diferentes concentrações de óleo essencial dos frutos verdes e maduros de *Citrus limonia*. Letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de *Scott-Knott* com nível de significância de 5%.

especial, para o extrato de melão-de-são-caetano observaram inibição para o isolado de *Colletotrichum gloeosporioides* superior a 90%.

Na Figura 3, os resultados de inibição de crescimento sobre o isolado fúngico de *A. flavus* em ambos os OEs dos frutos verdes e maduros de *C. limonia* foram apresentados.

Como se observa na Figura 3, o isolado de *A. flavus* apresentou baixa resistência para o OE frutos verdes, mesmo na menor concentração de 1,56 $\mu\text{L mL}^{-1}$ com 71% de PIC, possivelmente, devido aos compostos majoritários Limoneno com maior porcentagem, e α -Pineno que apenas foi observado neste OE.

No entanto, Perea et al. (2018) encontraram alta resistência em *Aspergillus niger* empregando diferentes concentrações de OE de *Citrus aurantium* mesmo puro. Quanto à atribuição como atividade fungitóxica, Xia, Mao e Luo (1998) atribuem ao composto α -Pineno ação antifúngica (inibição e morte) em *Candida albicans*. E nos estudos de Dias et al. (2019) e Dias et al. (2020) para Limoneno em *Macrophomina phaseolina* e *S. sclerotiorum*. Já na pesquisa de Ünal et al. (2012), os pesquisadores avaliaram o composto D-Limoneno isolado sobre inúmeras cepas fúngicas, onde atribuíram efetiva ação de inibição fúngica. Novos estudos deverão ser realizados, isolando este composto no OE dos frutos maduros de *C. limonia* e subsequente avaliação da sua atividade fungistática para *A. Flavus*, visto que, o mesmo não foi observado no OE frutos maduros. O teor de Limoneno foi inferior e não apresentou na

constituição química o α -Pineno. Para o OE frutos maduros, também foi observado excelente PIC até a concentração de 6,25 $\mu\text{L mL}^{-1}$ com 25%. O OE frutos verdes apresentou resultados equiparáveis ao grupo estatístico do fungicida de referência, nas concentrações 12,5 a 100 $\mu\text{L mL}^{-1}$, e para o OE frutos maduros nas concentrações entre 50 a 100 $\mu\text{L mL}^{-1}$ conforme teste de *Scott-Knott* 5%.

Valentini et al. (2019) avaliaram a atividade de inibição do OE de *Citrus latifolia* sobre isolados de *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp., encontrando importantes taxas de inibição de crescimento sobre sementes de feijão. Moreira-Valente et al. (2015) avaliaram a Miristicina extraída de OE empregando a concentração de 0,3%, observando boa eficiência de inibição sobre a cepa de *A. flavus* e *Aspergillus ochraceus* com 85% e 80% de PIC, respectivamente.

Ênfase deve ser dada também sobre os importantes resultados antimicrobianos observados nos estudos de Yazgan et al. (2019), posto que os pesquisadores obtiveram bons resultados quanto à atividade bactericida ao aplicarem o OE de *C. limonum* em nanoemulsões para os isolados de *Staphylococcus aureus*, *Photobacterium damsela*, *Vibrio vulnificus*, *Proteus mirabilis*, *Serratia liquefaciens*, *Pseudomonas luteola*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae* e *Salmonella paratyphi*.

Vários estudos sobre atividade antifúngica, utilizando OEs sobre espécies dos gêneros *Sclerotinia*, *Colletotrichum* e *Aspergillus* já foram bem elucidadas

Figura 3. Porcentagem de inibição de crescimento para o isolado de *Aspergillus flavus* em diferentes concentrações de óleo essencial dos frutos verdes e maduros de *Citrus limonia*. Letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de *Scott-Knott* com nível de significância de 5%.

por outros pesquisadores, entretanto, é importante que novas pesquisas sejam realizadas avaliando um número maior de vegetais que apresentem não somente uma eficiente atividade antifúngica, como também bons rendimentos de extração. Não é vantajoso termos um OE com alta especificidade de inibição de crescimento para numerosas variedades de isolados fúngicos, se a sua extração apresenta gasto com grandes quantidades de material vegetal, e baixo rendimento total de extração. Outras ações, possivelmente, com efeitos ao longo prazo, poderia ser o isolamento dos compostos majoritários para que se possam ser testados individualmente *in vitro* ou *in situ*.

Conclusão

Este estudo visou avaliar o óleo essencial extraído dos frutos verdes e maduros de *Citrus limonia*, verificando se há diferenças entre a inibição fúngica de *Sclerotinia sclerotiorum*, *Colletotrichum acutatum* e *Aspergillus flavus*, sendo estes novos agentes com alto potencial antifúngico natural. O óleo essencial dos frutos verdes e maduros de *C. limonia* apresentou bom rendimento de extração, neste estudo, quando comparados a outras espécies de *Citrus*, bem como, para os ensaios de atividade antioxidante na redução do radical livre DPPH, e para inibição de crescimento fúngico em isolados de *S. sclerotiorum*, *C. acutatum* e *A. flavus*.

Trabalhos futuros deverão ser realizados em novos modelos de radicais oxidantes, bem como, a combinação de ambos os óleos essenciais, bem como dos compostos α -Pino e Limoneno isolados na

avaliação *in vitro* e em casas de vegetação na avaliação da atividade antifúngica.

Agradecimentos

Ao Instituto Federal Goiano Campus Rio Verde – GO; aos laboratórios de Química Tecnológica, Fisiologia Vegetal, Química de Produtos Naturais, Química Geral e Química Orgânica; a Universidade Federal de Jataí, Campus Jatobá – GO; a Universidade Federal de São Carlos – SP; a Universidade Estadual de Goiás, Campus Santa Helena – GO; Universidade Federal de Goiás, Campus Samambaia – GO; a Central Analítica; aos órgãos de fomento em pesquisa, CAPES, CNPq, FAPEG e FINEP.

Referências

- ADAMS, R. P. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. 4th Edition, 2007. pp. 804.
- AMAIKE, S.; KELLER, N. P. *Aspergillus flavus*. **Annual Review of Phytopathology**, v. 49, p. 107-133, 2011.
- BAGHERABADI, S.; ZAFARI, D.; GHOBADI, A. *Colletotrichum gloeosporioides* s. str., the causal agent of a leaf spot disease of *Schefflera arboricola* in Iran. **Mycologia Iranica**, v. 5, n. 1, p. 29-34, 2018.
- BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils-a

review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 2, p. 446-475, 2008.

BRAGANÇA, C. A. D.; DAMM, U.; BARONCELLI, R.; MASSOLA JÚNIOR, N. S.; CROUS, P. W. Species of the *Colletotrichum acutatum* complex associated with anthracnose diseases of fruit in Brazil. **Fungal Biology**, v. 120, n. 4, p. 547-561, 2016.

CASTILHOS, R. V.; BRUGNARA, E. C.; SABIÃO, R. R.; ANDRADE, T. P. R.; NEGRI, G. Primeiro registro de *Aleurocnthus woglumi* (Hemiptera: Aleyrodidae) no estado de Santa Catarina, Brasil. **Citrus Research & Technology**, v. 40, n. 1-5, p. 1-5, 2019.

CELOTO, M. I. B.; PAPA, M. F. S.; SACRAMENTO, L. V. S.; CELOTO, F. J. Atividade antifúngica de extratos de plantas a *Colletotrichum gloeosporioides*. *Acta Scientiarum*, v. 30, n. 1, p. 1-5, 2008.

DAVARI, M.; EZAZI, R. Chemical composition and antifungal activity of the essential oil of *Zhumeria majdae*, *Heracleum persicum* and *Eucalyptus* sp. against some important phytopathogenic fungi. **Journal of Mycologie Médicale**, p. 1-6, 2017. doi:10.1016/j.mycmed.2017.06.001

DIAS, A. L. B.; SOUSA, W. C.; BATISTA, H. R. F.; ALVES, C. C. F.; SOUCHIE, E. L.; SILVA, F. G.; PEREIRA, P. S.; SPERANDIO, E. M.; CAZAL, C. M.; FORIM, M. R.; MIRANDA, M. L. D. Chemical composition and *in vitro* inhibitory effects of essential oils from fruit peel of three species and limonene on mycelial growth of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Brazilian Journal of Biology**. V. 80, n. 2, p. 460-464, 2020.

DIAS-ARIEIRA, C. R.; FERREIRA, L. R.; ARIEIRA, J. O.; MIGUEL, E. G.; DONEGA, M. A.; RIBEIRO, R. C. F. Atividade do óleo de *Eucalyptus citriodora* e *Azadirachta indica* no controle de *Colletotrichum acutatum* em morangueiro. **Summa Phytopathologica**, v. 36, n. 3, p. 228-232, 2010.

DIAS, L. R. C.; SANTOS, A. R. B.; FILHO, E. R. P.; SILVA, P. H. S.; SOBRINHO, C. A. óleo essencial de *Lippia sidoides* Cham (alecrim-pimenta) no controle de *Macrophomina phaseolina* em feijão-caupi. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v. 24, n. 1, 2019.

DIMITRIOS, B. Sources of natural phenolics antioxidants. **Trends in Food Science & Technology**, v. 17, n. 9, p. 505-512, 2006.

EVERTON, G. O.; SILVA, M. G. S.; TELES, A. M.; MOUCHREK, A. N. Atividade antioxidante e

antimicrobiana das folhas e frutos de *Citrus limon* (L.) Brun (limão siciliano). **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v. 23, n. 4, 2018.

FIORI, A. C. G.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R.; VIDA, J. B.; SCAPIM, C. A.; CRUZ, M. E. S.; PASCHOLATI, S. F. Antifungal activity of leaf extracts and essential oils of some medicinal plants against *Didymella bryoniae*. **Journal of Phytopathology**, v. 148, n. 7-8, p. 483-487, 2000.

GARCIA, R. Á.; JULIATTI, F. C.; BARBOSA, K. A. G.; CASSEMIRO, T. A. Atividade antifúngica de óleo e extratos vegetais sobre *Sclerotinia sclerotiorum*. **Bioscience Journal**, v. 28, n. 1, p. 48-57, 2012.

GUTTERIDGE, J. M.; HALLIWELL, B. Antioxidants: Molecules, medicines, and myths. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 393, n. 4, p. 561-564, 2010.

GRAU, C. R.; HARTMAN, G. L. *Sclerotinia* stem rot. In: HARTMAN, G. L.; RUPE, J. C.; SIKORA, E. J.; DOMIER, L. L.; DAVIS, J. A.; STEFFEY, K. L. Compendium of soybean diseases and pests. 5ª Ed., St. Paul, MN: **American Phytopathological Society**, pp. 59-62, 2015.

HIRATA, L. L.; SATO, M. E. O.; SANTOS, C. A. M. Radicais livres e o envelhecimento cutâneo. **Acta Farmacêutica Bonaerense**, v. 23, n. 3, p. 418-424, 2004.

HU, Y.; ZHANG, J.; KONG, W.; ZHAO, G.; YANG, M. Mechanisms of antifungal and anti-aflatoxigenic properties of essential oil derived from turmeric (*Curcuma longa* L.) on *Aspergillus flavus*. **Food Chemistry**, v. 220, p. 1-8, 2017.

LEAL, T. C. A.; FREITAS, S. P.; DA SILVA, J. F.; DE CARVALHO, A. J. C. Avaliação do efeito da variação estacional e horário de colheita sobre o teor foliar de óleo essencial de capim-cidreira (*Cymbopogon citratus* (DC) Stapf. **Revista Ceres**, v. 48, n. 278, p. 445-453, 2001.

LIMA, R. K.; CARDOSO, M. G.; MORAES, J. C.; VIEIRA, S. S.; MELO, B. A.; FILGUEIRAS, C. C. Composição dos óleos essenciais de anis-estrelado *Illicium verum* L. e de capim-limão *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf: Avaliação do efeito repelente sobre *Brevicoryne brassicae* (L.) (Hemiptera: Aphididae). **BioAssay**, v. 3, n. 8, 2008.

- LOPES, J. M. S.; DÉO, T. F. G.; ANDRADE, B.; GIROTO, M.; FELIPE, A. L. S.; JÚNIOR, C. E. I.; BUENO, C. E. M. S.; SILVA, T. F.; LIMA, F. C. C. Importância econômica dos citros no Brasil. **Revista Científica Eletrônica de Agronomia**, v. 20, n. 2, p. 1-4, 2011.
- LOPES, L. T. A.; DE PAULA, J. R.; TRESVENZOL, L. M. F.; BARRA, M. T. F.; FERRI, P. H.; FIUZA, T. S. Composição química e atividade antimicrobiana do óleo essencial e anatomia foliar e caulinar de *Citrus limettoides* Tanaka (Rutaceae). **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 34, n. 4, p. 503-511, 2013.
- LUZIA, D. M.; JORGE, N. Potencial antioxidante de extratos de sementes de limão (*Citrus limon*). **Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, n. 2, p. 489-493, 2010.
- MA, B.-X.; BAN, X.-Q.; HE, J.-S.; HUANG, B.; ZENG, H.; TIAN, J.; CHEN, Y.-X.; WANG, Y.-W. Antifungal activity of *Ziziphora clinopodioides* Lam. essential oils against *Sclerotinia sclerotiorum* on rapeseed plants (*Brassica campestris* L.). **Crop Protection**, v. 89, p. 289-295, 2016.
- MARTINAZZO, A. P.; OLIVEIRA, F. S.; TEODORO, C. E. S. Antifungal activity of *Cymbopogon citratus* essential oil against *Aspergillus flavus*. **Ciência e Natura**, v. 41, n. e20, p. 01-08, 2019.
- MENEZES FILHO, A. C. P.; CHRISTOFOLI, M.; SOUSA, W. C.; CASTRO, C. F. S. Avaliação química e atividades antioxidante e antifúngica dos óleos essenciais dos frutos verdes e maduros de *Zanthoxylum rhoifolium* (Lam.). **Arquivos Científicos**, v. 3, n. 1, p. 171-180, 2020.
- MEZZA, G. N.; BORGARELLO, A. V.; GROSSO, N. R.; FERNANDEZ, H.; PRAMPARO, M. C.; GAYOL, M. F. Antioxidant activity of rosemary essential oil fractions obtained by molecular distillation and their effect on oxidative stability of sunflower oil. **Food Chemistry**, v. 242, p. 9-15, 2018.
- MISHARINA, T. A.; SAMUSENKO, A. L. Antioxidant properties of essential oils from lemon, grapefruit, coriander, clove, and their mixtures. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 45, n. 4, p. 438-442, 2008.
- MOOSAVY, M. H.; HASSANZADEH, P.; MOHAMMADZADEH, E.; MAHMOUDI, R.; KHATIBI, S. A.; MARDANI, K. Antioxidant and antimicrobial activities of essential oil of lemon (*Citrus limon*) peel *in vitro* and in a food model. **Journal of Food Quality & Hazards Control**, v. 4, p. 42-48, 2017.
- MORAIS, S. M.; CATUNDA, F. E. A.; DA SILVA, A. R. A.; NETO, J. M.; RONDINA, D.; CARDOSO, J. H. L. Atividade antioxidante de óleos essenciais de espécies de *Croton* do nordeste do Brasil. **Química Nova**, v. 29, n. 5, p. 907-910, 2006.
- MOREIRA-VALENTE, V. M.; NEWANDRAN-JHAM, G.; MARANGON-JARDIM, C.; DEV-DHINGRA, O.; GHIVIRIGA, I. Major antifungals in nutmeg essential oil against *Aspergillus flavus* and *A. ochraceus*. **Journal of Food Research**, v. 4, n. 1, p. 51-57, 2015.
- PEREA, E. M.; CALEÑO, J. L. C.; OSPINA, C. C. C.; ARTEAGA, J. J. M. Potencial antimicrobiano y citotóxico del aceite esencial de *Citrus aurantium* Engl (naranja agria) y *Swinglea glutinosa* Merr (limón de cerco). **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v. 23, n. 3, 2018.
- PEREIRA, R. J.; CARDOSO, M. G. Metabólitos secundários vegetais e benefícios antioxidantes. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 3, n. 4, p. 146-152, 2012.
- PINEDA, R.; VIZCAÍNO, S.; GARCÍA, C. M.; GIL, J. H.; DURANGO, D. Antifungal activity of extracts, essential oil and constituents from *Petroselinum crispum* against *Colletotrichum acutatum*. **Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín**, v. 71, n. 3, p. 8563-8572, 2018.
- POMBO, J. C. P.; RIBEIRO, E. R.; PINTO, R. L.; DA SILVA, B. J. M. Efeito antimicrobiano e sinérgico de óleos essenciais sobre bactérias contaminantes de alimentos. **Segurança Alimentar e Nutricional**, v. 25, n. 2, p. 108-117, 2018.
- REBEQUI, A.M.; CAVALCANTE, L.F.; NUNES, J.C.; DINIZ, A.A.; BREHM, M.A.S.; BECKMANN-CAVALCANTE, M.Z. Produção de mudas de limão cravo em substrato com biofertilizante bovino irrigado com águas salinas. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 32, n. 2, p. 219-228, 2009.
- SANTOS, J. C.; FILHO, C. D. C.; BARROS, T. F.; GUIMARÃES, A. G. Atividade antimicrobiana *in vitro* dos óleos essenciais de orégano, alho, cravo e limão sobre bactérias patogênicas isoladas de vôngole.

Semina: Ciências Agrárias, v. 32, n. 4, p. 1557-1564, 2011.

SAMSON, R. A.; VISAGIE, C. M.; HOUBRAKEN, J.; HONG, S. -B.; HUBKA, V.; KLAASSEN, C. H. W.; PERRONE, G.; SEIFERT, K. A.; SUSCA, A.; TANNEY, J. B.; VARGA, J.; KOCSUBÉ, S.; SZIGETI, G.; YAGUCHI, T.; FRISVAD, J. C. Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. **Studies in Mycology**, v. 78, p. 141-173, 2014.

SILVA, W. J. M.; FERRARI, C. K. B. Metabolismo mitocondrial, radicais livres e envelhecimento. **Revista Brasileira de Geriatria e Gerontologia**, v. 14, n. 3, p. 441-451, 2011.

SILVA, D. D.; GROENEWALD, J. Z.; CROUS, P. W.; ADES, P. K.; NASRUDDIN, A.; MONGKOLPORN, O.; TAYLOR, P. W. J. Identification, prevalence and pathogenicity of *Colletotrichum* species causing anthracnose of *Capsicum annum* in Asia. **IMA Fungus**, v. 10, n. 8, p. 1-32, 2019.

SILVA, E. A. J.; DA SILVA, V. P.; ALVES, C. F.; ALVES, J. M.; SOUCHIE, E. L.; BARBOSA, L. C. A. Chemical composition of the essential oil of *Psidium guajava* leaves and its toxicity against *Sclerotinia sclerotiorum*. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 39, n. 2, p. 865-874, 2018.

SIMAS, D. L. R.; DE AMORIM, S. H. B. M.; DE OLIVEIRA, J. M.; ALVIANO, D. S.; DA SILVA, A. J. R. Caracterização dos óleos essenciais de frutas cítricas. **Citrus Research & Technology**, v. 36, n. 1, p. 15-26, 2015.

SOUSA, E. S.; SILVA, J. R. A.; ASSUNÇÃO, I. P.; MELO, M. P.; FEIJÓ, F. M.; MATOS, K. S.; LIMA, G. S. A.; BESSA JR, J. E. A. *Colletotrichum* species causing anthracnose on lima bean in Brazil. **Tropical Plant Pathology**, v. 43, p. 78-84, 2018.

SCHUCK, V. J. A.; MARISA FRATINI, M.; CRISTIANE, S.; RAUBER, C. S.; HENRIQUES, A.; SCHAPOVAL, E. E. S. Avaliação da atividade antimicrobiana de *Cymbopogon citratus*. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 37, n. 1, 2001.

TEIXEIRA, J. P. F.; MARQUES, M. O. M.; FIGUEIREDO, J. O. Composição química de óleos essenciais de quinze genótipos de limão em duas épocas de colheita. **Citrus Research & Technology**, v. 34, n. 2, p. 65-74, 2013.

TEIXEIRA, J. P. F.; MARQUES, M. O. M.; PIO, R. M. Caracterização dos óleos essenciais em frutos de nove genótipos de tangerina. **Citrus Research & Technology**, v. 35, n. 1, p. 1-10, 2014.

ÜNAL, M. Ü.; UÇAN, F.; ŞENER, A.; DİNÇER, S. Research on antifungal and inhibitory effects of DL-limonene on some yeasts. **Turkish Journal of Agriculture and Forestry**, v. 36, p. 576-582, 2012.

VALENTINI, R.P.; BONOME, L. S.; MOURA, G. S.; SIQUEIRA, D. J.; TOMAZI, Y.; FRANZENER, G.; BITTENCOURT, H.VON. H. Essential oils of tahiti lemon and cinnamon bark in control of storage fungi and the physiological and sanitary quality of beans. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 86, p. 1-9, e0172019, 2019.

XAVIER, M. N.; ALVES, J. M.; CARNEIRO, N. S.; SOUCHIE, E. L.; SILVA, E. A. J.; MARTINS C. G. M.; AMBRÓSIO, M. A. L. V.; EGEEA, M. B.; ALVES, C. C. F.; MIRANDA, M. L. D. Composição química do óleo essencial de *Cardiopetalum calophyllum* Schltdl. (Annonaceae) e suas atividades antioxidante, antibacteriana e antifúngica. **Revista Virtual de Química**, v. 8, n. 5, 2016.

XIA, Z.; MAO, X.; LUO, Y. Study on antifungal mechanism of alpha-pinene. **Bulletin of Human Medical University**, v. 24, n. 6, p. 507-509, 1998.

YAZGAN, H.; OZGUL, Y.; KULEY, E. Antimicrobial influence of nanoemulsified lemon essential oil and pure lemon essential oil on food-borne pathogens and fish spoilage bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v. 306, p. 108266, 2019.

YENJIT, P.; ISSARAKRAISILA, M.; INTANA, W.; CHANTRAPROMMA, K. Fungicidal activity of compounds extracted from the pericarp of *Areca catechu* against *Colletotrichum gloeosporioides* in vitro and in mango fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v. 55, p. 129-132, 2010.