



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÂNICA E INORGÂNICA
CURSO DE QUÍMICA BACHARELADO

MARIA DAIANE DE FREITAS

**ESTUDO FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIOLÓGICO DE *Citrus*
aurantium L.**

FORTALEZA

2021

MARIA DAIANE DE FREITAS

ESTUDO FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIOLÓGICO DE *Citrus*
aurantium L.

Monografia apresentada à Coordenação do Curso de Bacharelado em Química do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do grau de Bacharel em Química.

Orientadora: Profa. Dra. Telma Leda Gomes de Lemos.

Coorientadora: Profa. Dra. Davila Zampieri

FORTALEZA

2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- F937e Freitas, Maria Daiane de.
Estudo fitoquímico e avaliação do potencial biológico de *Citrus aurantium* L. / Maria Daiane de Freitas. – 2021.
60 f. : il. color.
- Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Curso de Química, Fortaleza, 2021.
Orientação: Profa. Dra. Telma Leda Gomes de Lemos.
Coorientação: Profa. Dra. Dávila de Souza Zampieri.
1. *Citrus aurantium* L.. 2. Extrato em AcOEt. 3. Atividade antioxidante. 4. Atividade antifúngica. 5. Naringina. I. Título.

CDD 540

MARIA DAIANE DE FREITAS

ESTUDO FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIOLÓGICO DE *Citrus*
aurantium L.

Monografia apresentada ao Curso de Química Bacharelado do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Química.

Aprovada em: ___/___/____.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Telma Leda Gomes de Lemos (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Davila Zampieri (Coorientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Msc. Francisco Erivaldo Freitas da Silva
Universidade Federal do Ceará (UFC)

A Deus.

Aos meus pais, Antônio e Gorete, meus irmãos,
Dalvan, Delvânia e Digiane, meus avós,
Amélia, Josias e Francisca, meu tio Gerson e
todos os meus amigos.

AGRADECIMENTOS

A Deus por me fortalecer nas minhas dificuldades e me permitir realizar esse sonho.

Aos meus pais, Antônio e Gorete pela educação que me passaram e pelo incentivo em todas as decisões que eu tomei.

Aos meus irmãos, Dalvan, Delvânia, Digiane e meus avós, Amélia, Josias e Francisca e ao meu tio Gerson, por serem sempre a minha base em todos os momentos.

À minha orientadora profa. Dra. Telma Leda Gomes de Lemos, pela oportunidade de ser sua bolsista, por toda a motivação, confiança durante essa etapa, pela ótima orientação profissional e por ajudar na minha formação como pessoa, muitíssimo obrigada.

À minha coorientadora profa. Dra. Davila Zampiere, por todos os ensinamentos e incentivo a expandir minhas ideias e melhorar meu pensamento crítico.

Ao Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal do Ceará por ceder o material vegetal para o estudo.

Ao prof. Dr. Francisco Felipe de Souza Maia pela obtenção dos espectros de massas de baixa resolução.

Aos operadores, Débora e Alisson pela aquisição dos espectros de RMN.

Ao prof. Dr. Francisco José Queiroz Monte pela elucidação estrutural da substância.

Ao Msc. Anderson Freitas de Sousa pela realização do experimento de inibição da enzima Acetilcolinesterase.

À Dra. Maria Francilene Sousa Silva pela execução da Atividade Citotóxica.

À Msc. Larissa Alves Lopes, do Laboratório de Toxinas Vegetais (LABTOx) pela efetuação do ensaio antifúngico.

À minha amiga de infância, Luiza, por todo apoio e suporte em cada fase da minha vida.

Aos integrantes do grupo bioMASS, Rodolfo e Erivaldo por todas as sugestões, de forma especial agradeço ao Rodolfo pela paciência e pela disponibilidade de ajudar a aprimorar esse trabalho, meus sinceros agradecimentos.

Aos meus amigos adquiridos durante minha estadia no Laboratório de Biotecnologia e Produtos Naturais (LBPN), Iolanda, Renan, Emerson e Gisele vocês foram essenciais no meu aprendizado, principalmente a Iolanda e o Renan que não mediram esforços para me ajudar, tanto profissionalmente como pessoalmente, é muito bom poder contar com vocês sempre.

Aos meus amigos Rebeca, Marilia, Vanessa, Jéssica, Ana Luiza e meu amigo de longas datas, Vitor, vocês tornam os meus dias mais descontraídos, tenho um carinho enorme por vocês.

À Universidade Federal do Ceará por todo recurso disponibilizado durante todo o percurso.

À CAPES, CNPq (PIBIC) pelo suporte financeiro que possibilitou a realização desse trabalho.

“O sonho é o que leva a gente para frente. Se a gente for seguir a razão, fica aquietado, acomodado”.

(Ariano Suassuna)

RESUMO

O uso de plantas com finalidade terapêutica é uma prática milenar, visto que os compostos de fontes naturais possuem um elevado potencial bioativo. Espécies de *Citrus*, em especial *Citrus aurantium* L., também conhecida como laranja da terra, destaca-se por conter compostos fenólicos, principalmente da classe dos flavonóides, que apresentam ação antioxidante, anti-inflamatória, preventiva de doenças cardiovasculares, entre outras. Diante do exposto, este trabalho tem como objetivo investigar a composição química e o potencial biológico do extrato em acetato de etila das cascas de *C. aurantium*. Inicialmente, o extrato, foi submetido a ensaios biológicos tais como: atividade antioxidante pelo método do DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil), inibidor da acetilcolinesterase, antifúngica sobre três cepas de *Candida* (*C. albicans*, *C. krusei* e *C. parapsilosis*), citotóxica sobre linhagens de células tumorais humanas PC3 (próstata), HCT-116 (carcinoma de colón-humano), e SNB-19 (glioblastoma). A atividade antioxidante, mostrou um CI_{50} 55,55 $\mu\text{g/mL}$, semelhante a naringina CI_{50} 36,21 $\mu\text{g/mL}$, um composto puro relatado na literatura. A atividade de inibição da enzima acetilcolinesterase, usando eserina como padrão, não exibiu resultado satisfatório. O extrato apresentou elevado potencial antifúngico para duas cepas de *Candida* (*C. albicans* e *C. parapsilosis*) com uma porcentagem de inibição maior do que 90 % para ambas. Por conseguinte, foram realizados ensaios para investigação dos mecanismos de ação do extrato frente as cepas estudadas, onde foi observado que as células de leveduras, na presença do extrato, não produziram espécies reativas de oxigênio (EROs). Contudo, o ensaio da determinação da integridade celular apontou que houve uma desintegração na membrana celular das células fúngicas quando estas foram tratadas com o extrato em estudo. O ensaio de citotoxicidade frente a linhagens de células tumorais PC3 (próstata) e HCT-116 (carcinoma de colón-humano) revelou uma atividade moderada, com porcentagem de inibição de 62,53% e 50,31%, respectivamente, numa concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$. A análise do extrato usando CLAE, possibilitou isolar e caracterizar uma flavanona, conhecida como naringina. Portanto, novas análises são necessárias para a determinação da composição do extrato a fim de atribuir estas ao potencial antimicrobiano observado.

Palavras-chave: *Citrus aurantium* L.. Extrato em AcOEt. Atividade antioxidante. Atividade antifúngica. Naringina.

ABSTRACT

The use of plants for therapeutic purposes is an ancient practice, since compounds from natural sources have a high bioactive potential. *Citrus* species, especially *Citrus aurantium* L., also known as orange of the earth, stands out for containing phenolics compounds, mainly from the flavonoid class, which present antioxidant, anti-inflammatory, and preventive action against cardiovascular diseases, among others. Therefore, this work aims to investigate the chemical composition and the biological potential of the ethyl acetate extract of *C. aurantium* peels. Initially, the extract was submitted to biological tests such as: antioxidant activity by the DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) method, inhibitor of acetylcholinesterase, antifungal activity on three strains of *Candida* (*C. albicans*, *C. krusei* and *C. parapsilosis*), cytotoxic on human tumor cell lines PC3 (prostate), HCT-116 (human colon carcinoma), and SNB-19 (glioblastoma). The antioxidant activity, showed an IC₅₀ 55.55 µg/mL, similar to naringin IC₅₀ 36.21 µg/mL, a pure compound reported in the literature. The inhibition activity of acetylcholinesterase enzyme, using eserine as a standard, did not exhibit satisfactory result. The extract showed high antifungal potential for two *Candida* strains (*C. albicans* and *C. parapsilosis*) with a percentage of inhibition greater than 90 % for both. Therefore, assays were performed to investigate the mechanisms of action of the extract against the strains studied, where it was observed that the yeast cells, in the presence of the extract, did not produce reactive oxygen species (ROS). However, the cell integrity assay pointed out that there was a disintegration in the cell membrane of the fungal cells when they were treated with the extract under study. The cytotoxicity assay against PC3 (prostate) and HCT-116 (human-colon carcinoma) tumor cell lines revealed moderate activity, with inhibition percentage of 62.53% and 50.31%, respectively, at a concentration of 100 µg/mL. Analysis of the extract using HPLC, made it possible to isolate and characterize a flavanone, known as naringin. Therefore, further analyses are needed to determine the composition of the extract in order to attribute these to the observed antimicrobial potential.

Keywords: *Citrus aurantium* L.. Extract in AcOEt. Antioxidant activity. Antifungal activity. Naringin.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Laranja da Terra (<i>Citrus aurantium</i>), a) Árvore, b) e c) Fruto e d) Casca	16
Figura 2 - Esqueleto base dos flavonóides	17
Figura 3 - Principais monoterpênos presente no óleo essencial de <i>Citrus aurantium</i>	18
Figura 4 - Reação de hidrólise da acetilcolina	21
Figura 5 - Reação de captura do radical DPPH ^o frente a um agente antioxidante	27
Figura 6 - Espectro de massas da diacetona álcool.....	32
Figura 7 - Espectro de massas do β-pineno.....	32
Figura 8 - Espectro de massas do D-limoneno.....	32
Figura 9 - Espectro de massas do 3-careno.....	32
Figura 10 - Espectro de massas do α-terpineol.....	32
Figura 11 - Cromatograma CLAE, da fração metanólica das cascas de <i>Citrus aurantium</i>	33
Figura 12 - Cromatograma CLAE, da fração acetônica das cascas de <i>Citrus aurantium</i>	33
Figura 13 - Espectro ultravioleta de Flav 04	34
Figura 14 - Espectro de infravermelho de Flav 04	35
Figura 15 - Espectro de RMN ¹ H (CD ₃ OD, 300 MHz) de Flav 04	36
Figura 16 - Espectro de RMN ¹³ C (CD ₃ OD, 300 MHz) de Flav 04	37
Figura 17 - Estrutura química de Flav 04	38
Figura 18 - Espectro bidimensional de correlação heteronuclear ¹³ C X ¹ H - HSQC de Flav 04	39
Figura 19 - Correlações de HMBC da aglicona	40
Figura 20 - Espectro bidimensional de correlação heteronuclear ¹³ C X ¹ H – HMBC de Flav 04	40
Figura 21 - Correlações de HMBC do raminosídeo	41
Figura 22 - Espectro bidimensional de correlação homonuclear ¹ H X ¹ H – COSY de Flav 04	42

Figura 23 -	Correlação homonuclear (COSY) da aglicona.....	42
Figura 24 -	Correlação homonuclear (COSY) do raminosídeo.....	43
Figura 25 -	Micrografias de indução de produção de EROs em células de <i>C. albicans</i> tratadas com DMSO 5% em NaCl 0,5 M (A e B), AcOEt 500 µg/mL (C e D), AcOEt 250 µg/mL (E e F) e anfotericina B 8.6×10^{-6} M (G e H)	47
Figura 26 -	Micrografias de indução de produção de EROs em células de <i>C. parapsilosis</i> tratadas com DMSO 5% em NaCl 0,5 M (A e B), AcOEt 125 µg/mL (C e D), AcOEt 62,5 µg/mL (E e F) ou anfotericina B 8.6×10^{-6} M (G e H)	47
Figura 27 -	Micrografias de determinação da integridade celular em células de <i>C. albicans</i> tratadas com DMSO 5% em NaCl 0,5 M (A e B), AcOEt 500 µg/mL (C e D), AcOEt 250 µg/mL (E e F) ou anfotericina B 8.6×10^{-6} M (G e H).....	48
Figura 28 -	Micrografias de determinação da integridade celular em células de <i>C. parapsilosis</i> tratadas com DMSO 5% em NaCl 0,5 M (A e B), AcOEt 125 µg/mL (C e D), AcOEt 62,5 µg/mL (E e F) ou anfotericina B 8.6×10^{-6} M (G e H)	48
Figura 29 -	Conversão do sal MTT em azul de formazan	49

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1- Composição química do óleo essencial das cascas de <i>Citrus aurantium</i>	31
Gráfico 2 - Curva de calibração da atividade antioxidante do extrato em AcOEt.....	43
Gráfico 3 - Curva de calibração da atividade antioxidante do padrão Ácido ascórbico.....	44
Gráfico 4 - Curva de calibração da atividade antioxidante do padrão Trolox.....	44
Gráfico 5 - Inibição de crescimento celular do extrato de acetato de etila frente a células tumorais na concentração de 100 µg/mL.....	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Estrutura química dos principais flavonóides de <i>Citrus aurantium</i>	17
Tabela 2 - Dados espectroscópios do composto Flav 04 e os dados reportados na literatura (RIAZ <i>et al.</i> , 2013) para a Naringina.....	38
Tabela 3 - Dados de concentração inibitória (CI ₅₀) para a determinação da capacidade antioxidante.....	44
Tabela 4 - Dados da atividade de inibição da enzima acetilcolinesterase.....	45
Tabela 5 - Inibição de cepas de <i>Candida</i> induzidas pelo extrato em acetato.....	46
Tabela 6 - Concentração inibitória média do extrato em acetato de etila na concentração de 100 µg/mL frente as linhagens de células tumorais.....	50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AcOEt	Acetato de Etila
ACN	Acetonitrila
CIM	Concentração Inibitória Mínima
COSY	<i>Correlation Spectroscopy</i>
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
DPPH°	2,2 difenil-1-picril-hidrazil
<i>d</i>	Dupleto
<i>dd</i>	Duplo dupleto
DAD	Detector de arranjo de diodos
EM	Espectrometria de Massa
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Connectivity</i>
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>
IDH	Índice de Deficiência de Hidrogênio
IV	Infravermelho
MHz	Mega hertz
<i>m</i>	Multiplete
CD ₃ OD	Metanol deuterado
MTT	Sal de tetrazólio
p.f	Ponto de fusão
ppm	Partes por milhão
RMN ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear de carbono-13
RMN ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio
<i>s</i>	Simpleto
UV- Vis	Ultravioleta visível

LISTA DE SÍMBOLOS

J	Constante de Acoplamento
λ	Comprimento de onda
δ_C	Deslocamento químico de Carbono-13
δ_H	Deslocamento químico de Hidrogênio
$^{\circ}\text{C}$	Graus Celsius
®	Marca Registrada
μ	Micro (10^{-6})
mm	Milímetro
nm	Nanômetro
%	Porcentagem

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1	Considerações sobre a espécie <i>Citrus aurantium</i> L.	16
2.2	Composição química de <i>Citrus aurantium</i> L.	16
2.3	Potencial biológico dos metabólitos secundários de <i>Citrus aurantium</i>.	19
2.3.1	<i>Atividade antioxidante.</i>	19
2.3.2	<i>Atividade de inibição da enzima acetilcolinesterase.</i>	20
2.3.3	<i>Considerações sobre infecções fúngicas causadas por <i>Candida</i>.</i>	21
2.3.4	<i>Atividade citotóxica</i>	22
3	OBJETIVOS	23
3.1	Objetivo Geral.	23
3.2	Objetivos Específicos	23
4	MATERIAIS E MÉTODOS	24
4.1	Coleta dos frutos.	24
4.2	Obtenção do extrato em acetato de etila.	24
4.3	Fracionamento do extrato em acetato etila.	24
4.4	Método Analítico.	25
4.4.1	<i>Cromatografia líquida de Alta Eficiência (CLAE).</i>	25
4.5	Método físico de análise.	25
4.5.1	<i>Ponto de Fusão.</i>	25
4.6	Métodos Espectroscópios e Espectrométrico.	25
4.6.1	<i>Espectroscopia de absorção na região infravermelho (IV).</i>	25
4.6.2	<i>Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN).</i>	26
4.6.3	<i>Espectrometria de massas (EM).</i>	26
4.7	Atividades Biológicas.	26
4.7.1	<i>Atividade antioxidante pela captura do radical livre DPPH°.</i>	26
4.7.2	<i>Ensaio de inibição da enzima acetilcolinesterase.</i>	28
4.7.3	<i>Atividade antifúngica in vitro frente as cepas de <i>Candida albicans</i>, <i>Candida krusei</i> e <i>Candida parapsilosis</i>.</i>	28
4.7.3.1	<i>Mecanismo de ação antimicrobiana.</i>	29
a -	<i>Indução da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs).</i>	29

b -	Determinação da integridade da membrana celular.....	29
4.7.4	<i>Atividade citotóxica</i>	29
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
5.1	Composição química do óleo essencial de <i>Citrus aurantium</i>	31
5.2	Análise por CLAE das frações metanólica e acetônica e isolamento do composto Flav 04 de <i>Citrus aurantium</i>	32
5.3	Determinação estrutural de Flav 04 do extrato em acetato de etila de <i>Citrus aurantium</i>	34
5.4	Ensaio biológico do extrato em acetato de etila	43
5.4.1	<i>Análise da atividade antioxidante pela captura do radical livre DPPH°</i>	43
5.4.2	<i>Avaliação de inibição da enzima acetilcolinesterase</i>	45
5.4.3	<i>Avaliação do potencial antifúngico frente as cepas de Candida (<i>C. albicans</i>, <i>C. krusei</i> e <i>C. parapsilosis</i>)</i>	45
5.4.3.1	<i>Verificação do mecanismo de ação antimicrobiana do extrato em acetato de <i>Citrus aurantium</i></i>	46
a -	Indução da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs).....	46
b -	Determinação da integridade da membrana celular.....	47
5.4.4	<i>Avaliação da atividade citotóxica do extrato em AcOEt</i>	46
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	51
	REFERÊNCIAS	52

1. INTRODUÇÃO

O cultivo de laranja (*Citrus sinensis*) tem grande destaque no mercado brasileiro de fruticultura, enquadrando o Brasil como principal produtor de laranjas *in natura* do mundo (FAOSTAT, 2021; USDA/FAS, 2021). Em 2019 o país foi responsável pela produção de 15,1 milhões de toneladas de laranjas (CASERTA *et al.*, 2019) e, a nível de mercado global, é responsável por três quartos do valor atrelado a comercialização do suco da fruta, caracterizando-se como maior exportador de suco de laranja do mundo (IBGE, 2021; USDA/FAS, 2021).

Dentro do mercado mundial da citricultura, o Brasil é responsável por 22% da produção de diferentes espécies de citros comerciais, seguido da China com 12, 3%, Índia 11,1%, EUA 6,4%, México com 6,3% e os demais países somam 41,8 % (LADANYIA, 2018). Segundo Kender e Khan (2007), de toda a diversidade de citros produzida no país, 61% são correspondentes às laranjas, 22% às tangerinas e mandarinas, 12% de limões e limas e 5% de toranjas e pomelos.

No entanto, existem espécies de citros, como *Citrus aurantium* L., que não são incluídas na produção em grande escala por não serem apreciadas pelo mercado consumidor, pois apresentam sabor amargo (MOURA; AREAS, 2013). Porém, essa espécie pode ser usada como fonte de produtos naturais de valor agregado, visto que em sua composição são encontradas substâncias com potencial bioativo (LAMINE *et al.*, 2019).

O gênero *Citrus* pertence à família Rutaceae de origem essencialmente Pantropical, possui uma grande diversidade, com cerca de 150 gêneros e 1.600 espécies. Dentro dessa variedade, 32 gêneros estão no Brasil (PIRANI *et al.*, 2002). Os citros possuem grande número de citações sobre suas propriedades terapêuticas. De maneira geral são utilizados na medicina popular em problemas de baço e estômago, manifestados na forma de distensão abdominal e epigástrica, náusea, vômito e perda de apetite (SIMÕES, 2007). Também na medicina popular as cascas são utilizadas na forma de chás como calmante e auxiliar digestivo (CARVALHO; COSTA, 2002).

Assim como em outros vegetais, os frutos de citros produzem diversas classes de substâncias químicas, as quais são denominados metabólitos. Estes metabólitos podem ser divididos em metabólitos primários (aminoácidos, lipídios, carboidratos, proteínas e etc.), que apresentam função estrutural, plástica e de armazenamento de energia, e metabólitos secundários (terpenos, compostos fenólicos, quinonas, alcalóides e compostos nitrogenados), que tem como objetivo principal proteger as plantas contra estresse abióticos e bióticos, além

de possuírem valores nutricionais e farmacológicos (BRAZ-FILHO, 1994; BORGES; AMORIM, 2020).

A importância dos citros vai além do viés financeiro, visto que há uma grande diversificação de substâncias potencialmente bioativas, nos frutos, nas folhas e nas flores dessas espécies, que podem ganhar aplicabilidade em diversas áreas (DEGIRMENCI; ERKURT, 2020; YU *et al.*, 2020). Logo, é de suma importância a busca pela agregação de valor a espécies de citros pouco estudadas do ponto de vista químico e do potencial farmacológico.

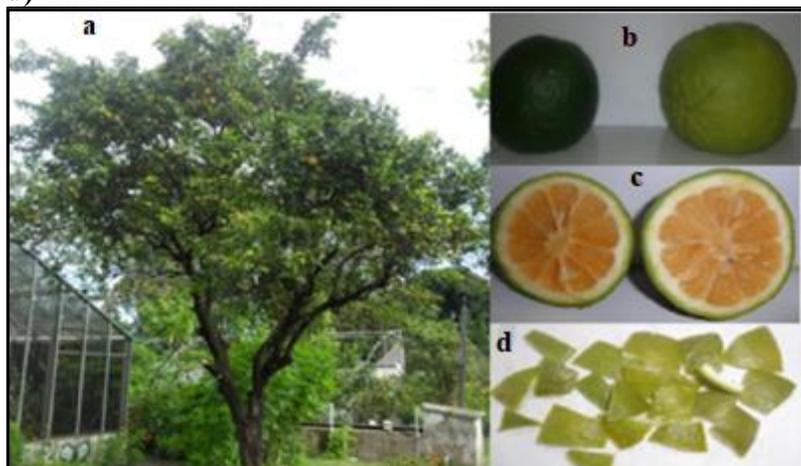
Diante do exposto, o presente trabalho visa, portanto, explorar o potencial químico dos compostos presentes nas cascas do fruto de *Citrus aurantium* L. a partir da avaliação da ação antioxidante, antiacetilcolinesterásica, antifúngica e citotóxica. O estudo também visa avaliar a composição química a fim de isolar constituintes presentes nas cascas desta espécie a partir do uso de técnicas cromatográficas, espectrométrica (EM) e espectroscópicas (IV, RMN ^1H e RMN ^{13}C).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Considerações sobre a espécie *Citrus aurantium* L.

Citrus aurantium, que é tipicamente conhecida como laranja amarga, laranja da terra ou laranja azeda, é uma árvore que pertence à ordem Geraniales e a família Rutaceae. A laranja da terra apresenta porte de médio a grande, as folhas contêm características morfológicas laminares, com pontas, base arredondada, flores grandes, os frutos de aspecto sensorial ácido e amargo, de difícil consumo. Na Figura 1, é mostrado detalhes desta espécie, como a árvore, frutos e suas cascas. Sua maior importância em citricultura decorre de seu uso como porta-enxerto (MOURA; AREAS, 2013).

Figura 1- Laranja da Terra (*Citrus aurantium*). a) Árvore, b) e c) Fruto e d) Casca



Fonte: Silva, 2012.

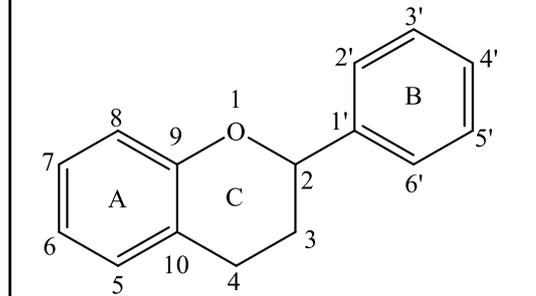
2.2 Composição química de *Citrus aurantium* L

A literatura reporta que, a composição química de *C. aurantium* inclui uma matriz de compostos fixos e voláteis diversificada, como: vitaminas, minerais, flavonóides glicosilados, terpenóides, aminas biogênicas e cumarinas. Dentre os compostos fixos, a classe dos flavonóides ganha notoriedade devido a sua importância no papel fisiológico, farmacológico e os seus benefícios para a saúde tais como indução de apoptose de células cancerosas do pulmão e fígado humano, atividade antioxidante, antidiabética e vasodilatadora (SUNTAR *et al.*, 2018).

Os flavonóides, podem ser encontrados em diversas formas estruturais. Entretanto, a maioria possui 15 átomos de carbono em seu núcleo fundamental Figura 2, (pág. 17) constituído por duas fenilas ligadas por uma cadeia de carbonos entre elas. Geralmente os

flavonóides de origem natural apresentam oxigênio em sua estrutura, podendo estar conjugados com açúcares (SIMÕES, 2007).

Figura 2- Esqueleto base dos flavonóides



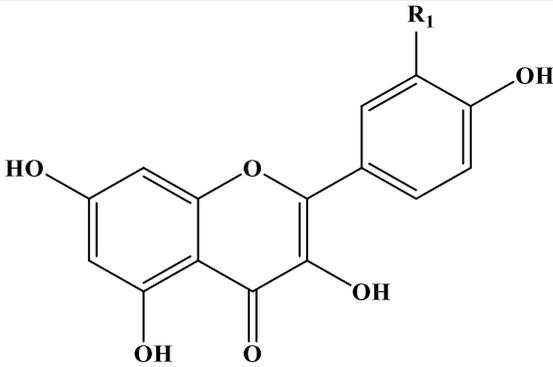
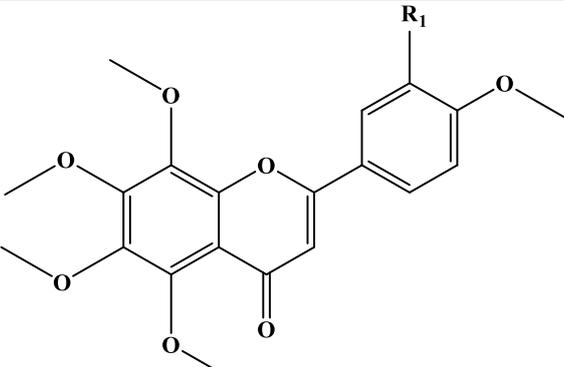
Fonte: adaptação de Simões, (2007).

Os flavonóides reportados na espécie *C. aurantium* são, principalmente, quatro grupos, incluindo as flavonas, flavanonas, flavonóis e as polimetoxiflavonas, conforme mostrado na Tabela 1. A partir da variedade de compostos citados é possível afirmar que esta é uma espécie de *Citrus* rica em flavonóides, que são considerados compostos com potencial biológico.

Tabela 1- Estrutura química dos principais flavonóides de *Citrus aurantium*

Continua

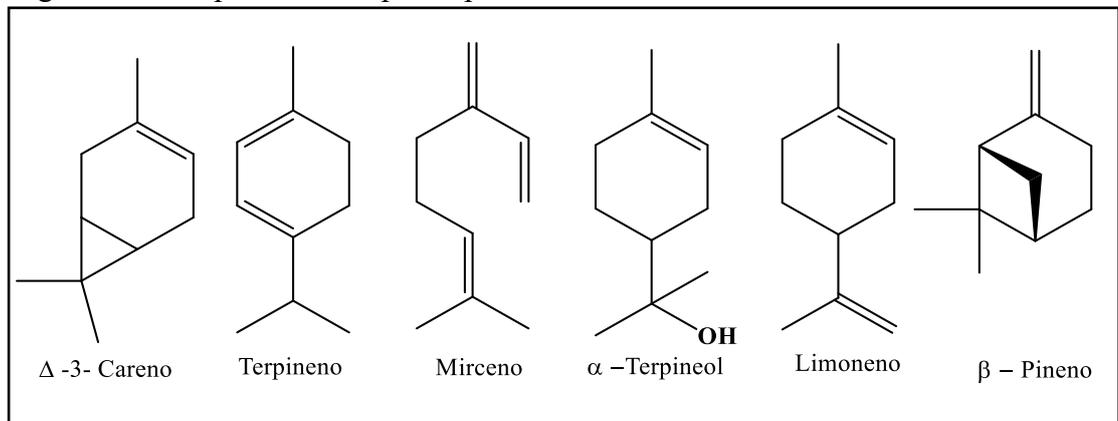
Flavanonas	Flavonas
<p>Hesperetina: R₁= OH; R₂= OH; R₃= OCH₃</p> <p>Naringenina: R₁= OH; R₂= H; R₃= OH</p> <p>Hesperidina: R₁= O- rutinosídeo; R₂= OH; R₃= OCH₃</p> <p>Neohesperidina: R₁= O- neohesperidose; R₂= OH; R₃= OCH₃</p> <p>Narirutina: R₁= O- rutinosídeo; R₂= H; R₃= OH</p> <p>Naringina: R₁= O- neohesperidose; R₂= H; R₃= OH</p>	<p>Apigenina: R₁= H; R₂= OH</p> <p>Luteolina R₁= OH; R₂= OH</p> <p>Diosmetina R₁= OH; R₂= OCH₃</p>

Flavonóis	Polimetoxiflavonas
	
Campferol: R ₁ = H Quercetina: R ₁ = OH	Nobiletina: R ₁ = OCH ₃ Tangeritina: R ₁ = H

Fonte: adaptação de Suntar *et al.*, (2018).

Na classe de subprodutos presente no gênero *Citrus*, pode-se citar o óleo essencial, contido principalmente nas cascas dos frutos. Os compostos voláteis que compõem o óleo essencial de *C. aurantium*, são majoritariamente hidrocarbonetos terpenóides, que possuem até 10 carbonos na sua estrutura (LAMINE *et al.*, 2019), e por apresentarem menor massa molecular volatizam mais facilmente, tornando-se importantes na fragrância dos óleos essenciais. Os terpenóides são assim designados porque essas substâncias derivam de unidades isoprênicas, constituindo unidades pentacarbonadas (SIMÕES, 2007). Na Figura 3, podemos observar alguns monoterpenos que fazem parte da constituição do óleo essencial de *C. aurantium*.

Figura 3- Principais monoterpenos presente no óleo essencial de *Citrus aurantium*



Fonte: adaptação de Nidhi *et al.*, (2020).

2.3 Potencial biológico dos metabólitos secundários de *Citrus aurantium*

Em meio a diversidade de compostos presentes na composição de *C. aurantium* destacam-se as flavanonas, compostos fenólicos derivados de flavonóides que, assim como a hesperidina, naringina, narirutina e neohesperidina, são responsáveis por possuírem diversos benefícios à saúde. Essa classe de compostos pode atuar como agente antioxidante, anticancerígeno, anti-inflamatório e na prevenção de doenças cardiovasculares. Estudos *in vivo*, utilizando modelo animal, reportaram que o consumo de naringina e hesperidina reduzem os níveis de colesterol de 32 a 40% (KUROWSKA; MANTHEY, 2004).

A espécie *C. aurantium*, apresenta uma diversidade de estudos biológicos, tais como: propriedade anti-inflamatória, anticonceptiva (HAMED I *et al.*, 2019), anticatarata (KULKARNI *et al.*, 2018), antioxidante e antimicrobiana (GUO *et al.*, 2018), citotóxica (HANAN; SHAKINAZ, 2011) e atua também na prevenção de danos neurológicos causados pela doença de Alzheimer (ABOU *et al.*, 2020).

Estudos envolvendo a avaliação do potencial biológico dos compostos voláteis contidos no óleo essencial de *C. aurantium* reportaram a sua atividade antifúngica frente a cepas de *Candida albicans* (NIDHI *et al.*, 2020), *Fusarium culmorum*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus niger* (ELGAT *et al.*, 2020). Efeitos ansiolíticos e sedativo também foram relatados para o extrato hidroetanólico das folhas e o óleo essencial. (CARVALHO; COSTA, 2002; MORLEY; FERGUSON; KOROPATNCIK, 2007).

2.3.1 Atividade antioxidante

Um agente antioxidante é uma substância sintética ou natural que tem a função de prevenir ou retardar a deterioração causada pela ação do oxigênio presente no ar, podendo ser substâncias orgânicas ou enzimas, capazes de agir contra danos de oxidação nos tecidos animais (HUANG; OU; PRIOR, 2005).

Os antioxidantes são os responsáveis por inibir os radicais livres, substâncias que possuem elétrons não pareados, gerados durante processos oxidativos. Esses, agem doando um átomo de hidrogênio a espécie reativa, tornando tais compostos estáveis e inibindo sua ação. No entanto, quando há um desequilíbrio nesse sistema, os radicais livres não neutralizados podem provocar danos nas moléculas do organismo, razão pela qual são associados a doenças degenerativas, cardíacas, oculares, distúrbios cerebrais, enfraquecimento do sistema imunológico e envelhecimento (MARIUTTI; BRAGAGNOLO, 2007; MELO *et al.*, 2011).

Entre os antioxidantes naturais pode-se citar a vitamina C, vitamina E, os flavonóides quercetina, rutina, entre outros.

A atividade antioxidante *in vitro*, pode ser avaliada por diversos métodos, verificando-se a presença de compostos com potencial bioatividade (SÁNCHEZ MORENO, 2002). O uso de tais testes se faz necessário para promover uma seleção inicial de substâncias que possam ser candidatas a fármacos (ALVES *et al.*, 2010).

As principais técnicas *in vitro* usados na determinação da capacidade antioxidante são: método baseado na captura do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), teste de descoloração do radical ABTS (2,2'-azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)) ensaio da capacidade de absorção do radical oxigênio (ORAC) e verificação do poder antioxidante pela redução férrica (FRAP). Há outros métodos antioxidantes, conforme descrito por Giada Maria (2014), onde é empregado o uso de lipídeos, nos quais os mais comuns são β - caroteno-ácido linoleico, ensaios com LDL humana e compostos reativos ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).

2.3.2 Atividade de inibição da enzima acetilcolinesterase

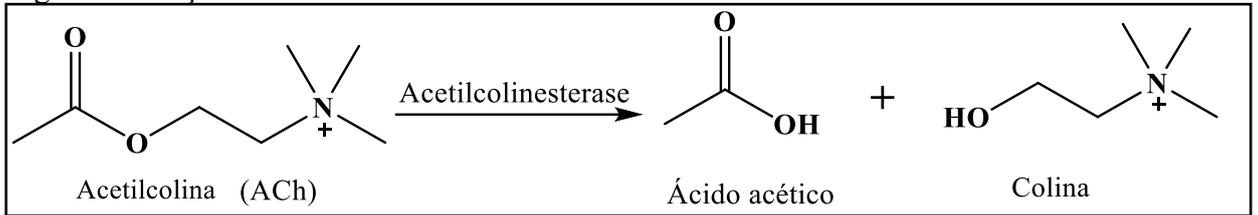
Segundo a Organização Mundial de Saúde (WHO, 2021), cerca de 50 milhões de pessoas no mundo são acometidas por doenças que afetam a memória. O mal de Alzheimer, doença classificada como um tipo de demência que compromete o sistema cognitivo das pessoas, principalmente os idosos, que os torna vulneráveis e dependentes de terceiros para as necessidades básicas.

A doença de Alzheimer (DA), é uma patologia caracterizada pela perda de sinapses e neurônios no córtex cerebral causado pelo déficit de neurotransmissores. Os sintomas iniciais dessa enfermidade compreendem a perda da memória de curto prazo, problemas para lembrar palavras, delírios, ansiedade, afastamento do ciclo social e conforme o avançar dessa enfermidade esse problema se agrava podendo apresentar alucinações, mudanças de personalidade e comportamento, não reconhecer os parentes próximos e necessidade de cuidados essenciais como alimentação e higiene (MARTINS, 2019).

A acetilcolina (ACh) é um neurotransmissor importante do sistema nervoso, pois, está relacionado ao sistema de alerta do corpo, ao aprendizado, memória e controle das funções motoras. O indivíduo acometido pela DA, apresenta uma deficiência na secreção desse neurotransmissor no córtex cerebral. A ACh presente nas redes neurais é hidrolisada pela enzima acetilcolinesterase, formando colina e ácido acético conforme Figura 4 (pág. 21),

(MOTA *et al.*, 2012).

Figura 4- Reação de hidrólise da acetilcolina



Fonte: elaborado pela autora.

Dessa forma, os medicamentos usados na DA, são compostos que inibem a atuação da acetilcolinesterase, deixando disposto a acetilcolina no sistema nervoso.

2.3.3 Considerações sobre infecções fúngicas causadas por *Candida*.

De acordo com a Sociedade Brasileira de Dermatologia (2021), fungos são microrganismos presentes em todos os ambientes e podem estar associados a seres vivos. Podem causar doenças diversas nos reinos animal e vegetal. Entre as inúmeras doenças provocadas por estes microrganismos tem-se as relacionadas a pele, unhas, cabelos e etc.

Aproximadamente um bilhão de pessoas apresentam infecções fúngicas e em mais de 150 milhões de pessoas essas infecções aparecem de forma grave, gerando grande impacto nas suas vidas ou podendo ser fatais. Estima-se que a mortalidade associada a doenças fúngicas seja de 1,5 milhão por ano, onde a forma grave das doenças é desencadeada quando associadas a outros problemas de saúde como a síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), câncer, asma, diabetes, transplante de órgãos e tratamento com corticoides (BONGOMIN *et al.*, 2017).

As infecções fúngicas mais comuns são causadas pelos gêneros: *Candida*, *Aspergillus*, *Pneumocystis* e *Cryptococcus*. Sendo que a *Candida* spp. são responsáveis por cerca de 15% das infecções de hemoculturas, associados a casos que necessitam de unidade de terapia intensiva e ocupa o terceiro lugar nesse grupo de infecções adquiridas por fungos (AL ABOODY; MICKYMARAY, 2020).

Candida é pertencente ao gênero de leveduras *Ascomycetous*, possuindo em torno de 150 espécies, sendo 20 espécies associadas a infecções hospitalares. Entres as espécies desse fungo tem-se: *C. albicans*, é a espécie que mais gera doenças infecciosas (50-70%), seguida de *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. krusei* (NG *et al.*, 2013).

As doenças fúngicas trazem, portanto, preocupação aos médicos e pesquisadores, devido a resistência que fungos patogênicos adquirem a antibióticos existentes, tornando-se necessário a descoberta de novos antifúngicos (AL ABOODY; MICKYMARAY, 2020).

2.3.4 Atividade citotóxica

O efeito tóxico causado nas células por compostos nocivos é chamado de citotoxicidade e quando expostas a essas substâncias, as células podem progredir efetivamente para a fase de morte, tornando-se capazes de ativar a morte celular programada, a apoptose, ou essas células podem necrosar devido a perda integral da membrana lipoproteica. As substâncias que causam esse efeito, atuam inibindo a síntese de ácidos nucleicos e proteínas, afetam a produção de energia celular e desintegram a membrana plasmática ou organelas intracelulares que contém membranas (ISTIFLI; ILA, 2019).

Os testes de citotoxicidade verificam o comportamento da célula frente ao material colocado de forma direta ou indireta, assim, é avaliado se houve crescimento ou morte celular depois da exposição a esse material (SAKAGUCHI; POWERS, 2012). Os métodos *in vitro* apresentam vantagens em relação aos métodos *in vivo*, devido a rapidez, sensibilidade e reprodutibilidade. (ANDREANI *et al.*, 2017).

Logo, há um interesse terapêutico nos ensaios citotóxicos, na perspectiva de encontrar fármacos seguros e eficazes que possam ser usados no tratamento do câncer (MACHADO *et al.*, 2010). Segundo a Organização Mundial de Saúde (WHO, 2021) o câncer matou quase 10 milhões de pessoas em 2020, sendo, portanto, uma das principais causas de morte no mundo.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar o potencial químico e biológico do extrato em acetato de etila das cascas de *Citrus aurantium* L. (laranja da terra).

3.1 Objetivos Específicos

- Obter o extrato em AcOEt das cascas (flavedo) de *Citrus aurantium* L.;
- Identificar e quantificar os constituintes químicos do óleo essencial extraído das cascas de *Citrus aurantium*;
- Isolar e purificar os constituintes químicos do extrato em AcOEt usando a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE);
- Caracterizar estruturalmente, os metabólitos secundários através de técnicas espectroscópicas tais como IV, RMN ^1H e ^{13}C (uni e bidimensional);
- Avaliar o potencial antioxidante pelo método do DPPH do extrato em AcOEt;
- Avaliar a atividade inibitória da enzima acetilcolinesterase do extrato em AcOEt;
- Avaliar a atividade antifúngica do extrato em AcOEt sobre cepas de *Candida*, tais como *C. albicans*, *C. krusei* e *C. parapsilosis*;
- Avaliar a citotoxicidade *in vitro* do extrato em AcOEt sobre linhagens de células tumorais humanas PC3 (próstata), HCT-116 (carcinoma de colón-humano), e SNB-19 (glioblastoma).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Coleta dos frutos

As laranjas foram coletadas no Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal do Ceará (UFC)-Campus do Pici em Fortaleza-CE, às 15:45 horas do dia 26 de setembro de 2019.

Posterior a coleta, os frutos foram devidamente higienizados com água destilada e depois foi realizada a separação manual das cascas (flavedo), utilizando um ralador e uma faca de mesa. Em seguida as cascas foram cortadas e pesadas.

4.2 Obtenção do extrato em acetato de etila

As laranjas foram inicialmente esterilizadas em solução de hipoclorito de sódio, cortadas ao meio e separadas das cascas. As cascas do fruto foram cortadas em pedaços pequenos e pesadas resultando em 398 g. Em seguida foram alocadas em um balão de fundo redondo onde adicionou-se água destilada até submergir todas as cascas. Em sequência foram submetidas ao processo de hidrodestilação usando o doseador de Clevenger e uma manta de aquecimento para a extração do óleo essencial, por um período de 3 horas. Posteriormente o óleo essencial foi tratado com sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4) para remoção da água residual. Após este procedimento o mesmo foi reservado em frasco de cor âmbar, pesado, apresentando rendimento de 0,36 %. O óleo essencial foi armazenado à $-20\text{ }^\circ\text{C}$ e posteriormente analisado por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (CG-EM).

A água-mãe resultante do processo de hidrodestilação, foi submetida a uma sequência de extrações líquido-líquido com AcOEt da marca Synth®, onde a cada 100 mL de água-mãe utilizou-se por 3 x100 mL de solvente. Logo em seguida a fração extraída com AcOEt foi concentrada sob pressão reduzida em um rotaevaporador da marca Heidolph, modelo Laborota 4000, à temperatura ambiente. O extrato apresentou rendimento de 0,47 %.

4.3 Fracionamento do extrato em acetato de etila

O extrato foi submetido a extração sólido-líquido usando acetona e metanol, ambos da marca Synth®, esse processo foi realizado fazendo lavagens sucessivas para cada fração. Em sequência, as frações resultantes foram concentradas separadamente e submetidas a análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) para verificação do perfil cromatográfico e separação do composto.

4.4 Método Analítico

4.4.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

As frações metanólica e acetônica foram analisadas por CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência) em um Cromatógrafo da marca Shimadzu[®] com o sistema de bomba binário (L201147), equipado com detector de UV- Vis (arranjo de Diodo). Utilizou-se coluna de fase reversa, Luna C₁₈ (2, 5 x 250 mm, 5 μm (analítica) e 4,6 x 250 mm, 5 μm (semi-preparativa) ambas da marca Phenomenex[®]. Como fase móvel foi usado acetonitrila (CH₃CN) grau HPLC da marca SK Chemicals[®] e água deionizada, ambos foram filtrados separadamente através de uma membrana de náilon de 45 μm (Millipore). Cada amostra foi dissolvida separadamente nos eluentes (CH₃CN/H₂O) na razão de 1/1 e filtradas em membrana de difluoreto de polivinilideno 0,45 μm.

A metodologia usada nas injeções baseou-se em gradiente de concentração, onde foi incluído uma mistura contendo 8% de CH₃CN, após 20 minutos a taxa de CH₃CN foi de 55 % e ao chegar em 30 minutos a concentração de CH₃CN chegou a 50 %, e por fim aos 33 min a concentração de CH₃CN foi correspondente a 4 % preparando o sistema para injeções posteriores. O fluxo aplicado durante as corridas com a coluna semi-preparativa foi de 4,5 mL/min com uma temperatura de 40 °C, com a detecção por varredura de UV-Vis no comprimento de onda (λ) de 280 nm.

4.5 Método físico de análise

4.5.1 Ponto de Fusão

A medida do ponto de fusão foi realizada no equipamento de microdeterminação digital da marca Mettler Toledo equipado com uma estação de aquecimento FP82HT, um microscópio ótico monocular acoplado. A taxa de aumento de temperatura foi ajustada para 1,5 °C/min e não foi corrigida.

4.6 Métodos Espectroscópios e Espectrométrico

4.6.1 Espectroscopia de absorção na região infravermelho (IV)

O espectro na região do infravermelho, foi adquirido no Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará, usando um Espectrômetro de Infravermelho com Transformada de Fourier (IV-TF), marca Perckin Elmer[®], modelo FT-IR SPECTRUM 100. Utilizou-se pastilhas de brometo de potássio (KBr) na proporção de 1% de

amostra. A análise foi adquirida na faixa de número de onda de 4000 a 400 cm^{-1} .

4.6.2 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de RMN ^1H , e ^{13}C (uni e bidimensionais), foram realizados em um espectrômetro da marca Bruker[®] modelo Avance DPX-300, no Centro Nordestino de Aplicação e uso de Ressonância Magnética Nuclear (CENAUREMN) da Universidade Federal do Ceará. As análises foram adquiridas na frequência de 300 MHz para hidrogênio e 75 MHz para carbono-13.

Para obtenção dos espectros de RMN, foi utilizado metanol deuterado (CD_3OD) da marca Cambridge Isotope Laboratories, Inc (CIL). Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em parte por milhão (ppm) e tomados como referência no espectro de RMN ^1H pelos sinais dos hidrogênios das moléculas residuais não deuteradas em δ_{H} 4, 87. Nos espectros de RMN ^{13}C os sinais foram referenciados em δ_{C} 49,15.

As multiplicidades são indicadas como simpleto (*s*), duplete (*d*), duplete largo (*dl*), tripleto (*t*) e multiplete (*m*).

4.6.3 Espectrometria de massas (EM)

O espectro de massas de baixa resolução do óleo essencial foi obtido no Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Norte, Campus Apodi (IFRN), usando um cromatógrafo gasoso da marca Shimadzu modelo QP2010, utilizando coluna capilar preenchida com 5 % difenil e 95 % dimetil polisiloxano com dimensões de 30 m x 0,25 mm x 0,25 μm da marca RESTEK-RTX[®]. A análise contou com rampa de aquecimento, apresentando no tempo 0 min 180 °C e após 10 min 280 °C, sendo utilizado hélio como gás de arraste.

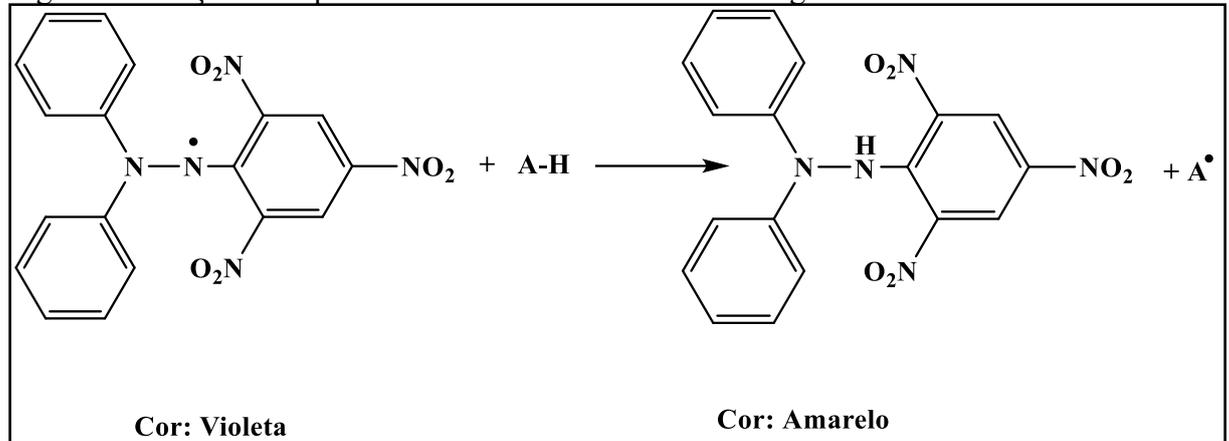
4.7 Atividades Biológicas

4.7.1 Atividade antioxidante pela captura do radical livre DPPH[°]

Uma das técnicas utilizada para detectar a capacidade antioxidante de compostos, é o método baseado na eliminação do radical livre estável 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH), Figura 5 (pág. 27). A reação ocorre através da captura de hidrogênio presente na substância antioxidante pela molécula de DPPH[°], formando um composto estável. Por apresentar-se na

forma radicalar, é bastante reativo na presença de luz, exigindo cuidados específicos na realização desses testes. (OLIVEIRA, 2015).

Figura 5 - Reação de captura do radical DPPH[•] frente a um agente antioxidante



Fonte: adaptação de Oliveira, (2015).

A análise antioxidante foi baseada no método de Hegazi e El Hady (2002), com modificações. O método consistiu primeiramente em preparar uma solução metanólica de DPPH 60 μM , seguida das respectivas concentrações da amostra (0,002; 0,004; 0,008; 0,016; 0,031; e 0,062 mg/ mL). Depois da adição da solução de DPPH nas soluções contendo a amostra, estas foram armazenadas na ausência de luz por 30 minutos. Após esse período transferiu-se individualmente cada solução para uma cubeta de quartzo e as leituras foram realizadas em um espectrofotômetro da marca Shimadzu, modelo UV mini-1240. Antes das leituras o equipamento foi calibrado com metanol PA da marca Synth[®] e em seguida ajustou-se o comprimento de onda (λ) em 515 nm. A medida do branco foi realizada com 2 mL de metanol e 2 mL da solução de DPPH o procedimento foi realizado em triplicata utilizando ácido ascórbico (vitamina C) e o ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico (Trolox) como padrões positivos.

Os dados obtidos foram analisados usando a Equação 1 descrita abaixo, onde AA% corresponde a porcentagem da atividade antioxidante.

$$AA\% = \left[1 - \left(\frac{Abs\ branco}{Abs\ DPPH} \right) \right] \times 100 \quad (1)$$

A partir dos resultados foi construída uma curva de porcentagem da capacidade inibitória (eixo y) vs concentração em mg/mL (eixo x), permitindo assim o cálculo da concentração inibitória de 50% (CI₅₀), tanto das amostras como dos padrões positivos.

4.7.2 Ensaio de inibição da enzima acetilcolinesterase

O teste realizado, teve como base o procedimento descrito por Ellman *et al.*, (1961), com modificações realizadas por Rhee *et al.*, (2001). Os reagentes usados foram iodeto de acetilcolina (ATCI), enzima acetilcolinesterase (AChE) e ácido 5,5'- ditiobis-(2-nitrobenzoico) (DTNB) adquiridos pela Sigma-Aldrich®. O método utilizado é rápido e sensível a substâncias com ação anticolinesterásica, podendo ser realizado qualitativamente e quantitativamente.

O procedimento consistiu em retirar uma alíquota de 5µL de uma solução contendo o extrato em acetato, analisado em solvente na concentração 10 mg/mL, aplicando-o em uma cromatoplaça (DC-Alufolien, Sílica gel 60 F254, 0,2 mm Merck). Aguardando a secagem completa do solvente, em seguida foi borrifada uma mistura (1:1) de iodeto de acetilcolina (ATCI) com o reagente de Ellman ácido 5,5'- ditiobis-(2-nitrobenzoico), (DTNB, 1 mmol/L), esperando 3 minutos para secagem da cromatoplaça. Posteriormente, aplicou-se com um borrifador a enzima acetilcolinesterase (3 U/mL). Decorrido o tempo de 10 minutos foi avaliado a formação de halos na placa.

4.7.3 Atividade antifúngica *in vitro* frente as cepas de *Candida albicans*, *Candida krusei* e *Candida parapsilosis*.

O ensaio antifúngico foi realizado no laboratório de Toxinas Vegetais (LabTox) do Departamento de Bioquímica da UFC. O crescimento das culturas de leveduras para realização do teste seguiu o método previamente estabelecido por Neto *et al.*, 2017.

As células de leveduras foram cultivadas em caldo Sabouraud, o experimento foi realizado em placas de microtitulação de 96 poços com fundo chato. Inicialmente, incubou-se alíquotas de 100 µL da suspensão celular cultivadas em caldo Sabouraud de (*C. albicans*, *C. krusei* e *C. parapsilosis*) estabelecendo concentrações de $0,5 \times 10^3$ a $2,5 \times 10^3$ UFC/mL com 100 µL de cada concentração do extrato em acetato que foi solubilizado usando uma solução de DMSO 5% em NaCl 0,15 M (as concentrações finais da amostra variou de 500 µM a 31 µM). As placas foram incubadas no escuro a 37 °C por um período de 24 horas, em seguida fez-se a leitura de absorbância em 600 nm, usando um leitor de microplacas (Epoch, BioTek Instruments Inc. EUA). Para o controle positivo e negativo usou-se, respectivamente, Nistatina (122,7 µM) e DMSO 5% em NaCl 0,15 M. Considerou-se o crescimento das células no meio de cultura como 100% de crescimento. Os dados da análise foram obtidos de três experimentos independentes, com repetição de três cultivos biológico.

4.7.3.1 Mecanismo de ação antimicrobiana

a - Indução da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs);

As leveduras usadas no ensaio foram cultivadas em caldo Sabouraud por 18 horas a 37 °C. A concentração final das células foi padronizada para 10⁶ células/mL, em sequência alíquotas de 100 µL da suspensão de células foram incubadas com 100 µL da amostra (extrato em AcOEt), solubilizado com DMSO 5% em NaCl 0,15 M. Os padrões positivo e negativo foram, respectivamente, anfotericina B 8,6 x 10⁻⁶ M e uma solução DMSO 5% em NaCl 0,15 M a incubação das células foi realizada a 37 °C por um intervalo de 34 horas, em ambiente protegido da luz. Em seguida, as células de tratamento foram novamente incubadas, no escuro por 30 minutos a 37 °C com 2,7 diclorofluoresceína diacetato (DCFH-DA), posteriormente as células foram centrifugadas em equipamento (centrifuga Mikro 200R, HettCIh, Alemanha) 3000 × g por 5 min a uma temperatura de 22 °C e lavadas três vezes com uma solução de NaCl 0,15 M. Por último, foram preparadas adequadamente para observação sob um microscópio de fluorescência da marca Olympus BX41, com os comprimentos de onda de excitação e emissão de 488 nm e 525 nm, respectivamente. A presença de fluorescência verde indica a produção de espécies reativas de oxigênio (MAURYA *et al.*, 2011).

b - Determinação da integridade da membrana celular;

O ensaio *in vitro* de células das leveduras consistiu em incubar por 24 horas a 37 °C, com a amostra do extrato em AcOEt, usando como controle negativo uma solução de NaCl 0,15 M e como controle positivo uma solução de anfotericina B 8,6 × 10⁻⁶ M. Em seguida, as células tratadas (100 µL de suspensão) foram incubadas com iodeto de propídio onde a sonda emite fluorescência vermelha quando interage com material genético na concentração de 10³ µM, por 30 min a 37 °C (REGENTE *et al.*, 2014). Por fim, analisou-se as células em microscópio de fluorescência (Olympus BX41) a emissão de fluorescência vermelha é um indicativo de que houve permeabilização da membrana plasmática (comprimentos de onda de excitação e emissão de 488 nm e 525 nm, respectivamente).

4.7.4 Atividade citotóxica

A atividade citotóxica foi realizada no Laboratório de Oncologia Experimental (LOE) do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM). Realizou-se teste *in vitro* para as linhagens celulares SBN- 19 (glioblastoma), HCT-116 (carcinoma de

cólon- humano) e PC3 (próstata) cedidas pelo Instituto Nacional do Câncer (EUA).

O ensaio citotóxico foi realizado seguindo o método de Mosman (1983), que é baseado em uma análise colorimétrica em que o sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol) -2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazólio (MTT) se converte em azul de formazan, a partir de enzimas mitocondriais presentes somente nas células metabolicamente ativas. O estudo citotóxico pelo método do MTT permite definir facilmente a citotoxicidade, mas não o mecanismo de ação (BERRIDGE *et al.*, 1996).

As linhagens de células SNB-19, HCT-116, PC3 foram cultivadas em meio RPMI 1640, suplementado com 10 % de soro fetal bovino e 1 % de antibióticos, mantidas em estufa a 37 °C e atmosfera contendo 5% de CO₂. A amostra foi solubilizada em DMSO e os testes foram realizados na concentração de 100 µg/mL.

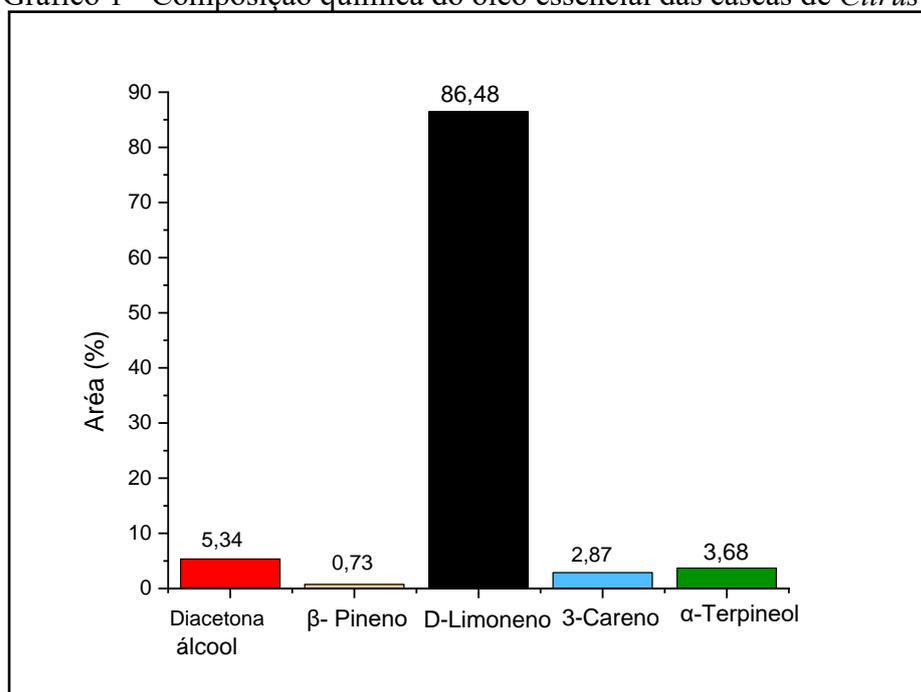
As células foram devidamente identificadas nas concentrações de 0,7 x 10⁵ células/mL (HCT-116), 0,1 x 10⁶ células/mL (SNB-19, e PC3). As placas foram incubadas por 72 horas após tratamentos com os compostos em estufa a 5% de CO₂ a 37 °C. Ao término deste, as placas foram centrifugadas e o sobrenadante foi descartado. Em seguida, foram adicionados 100 µL da solução de MTT (sal de tetrazólio), e então foram novamente incubadas por um período de 3h. A absorbância foi lida em 595 nm, após dissolução do precipitado com 100 µL de DMSO puro em espectrofotômetro de placa (DTX 880 Multimode Detector, Beckman Coulter, Inc. Fullerton, Califórnia, EUA).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Composição química do óleo essencial de *Citrus aurantium*

O óleo essencial das cascas de *Citrus aurantium* foi obtido por hidrodestilação e analisado por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM). Essa análise forneceu um cromatograma cujo os dados encontra-se apresentados no Gráfico 1, expresso em (%) de área por substâncias.

Gráfico 1 - Composição química do óleo essencial das cascas de *Citrus aurantium*

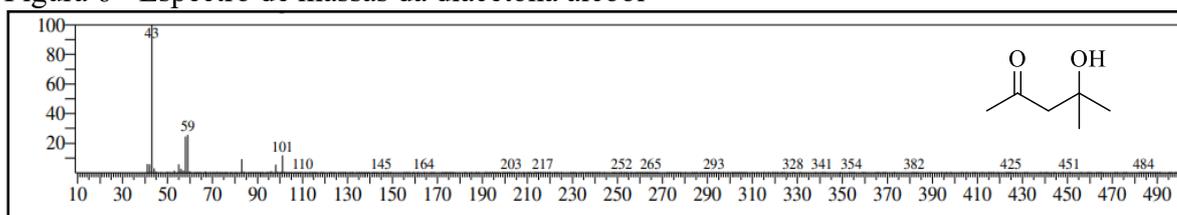


Fonte: elaborado pela autora.

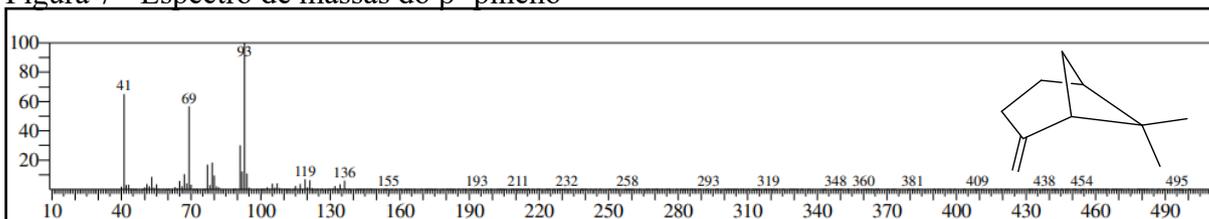
Pode-se verificar, por meio dos dados expostos no Gráfico 1 que o óleo essencial das cascas do fruto de *C. aurantium* é constituído majoritariamente por D-limoneno. Esse composto apresenta diversas atividades biológicas já citadas na literatura, tais como gastroprotetora, anti-inflamatória, quimiopreventiva entre outras (TEIXEIRA, 2013).

As figuras 6 a 10 (pág. 32) apresentam os espectros de massas dos constituintes presentes no óleo essencial das cascas de *C. aurantium*.

Figura 6 - Espectro de massas da diacetona álcool

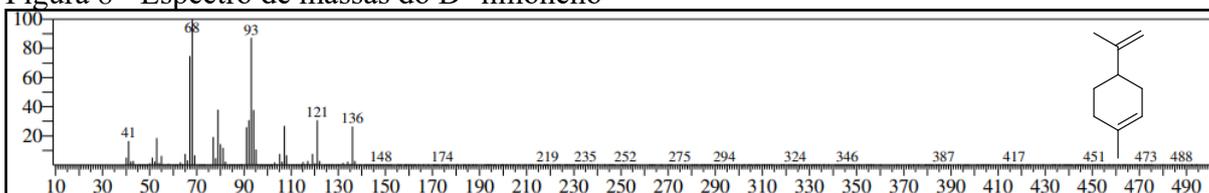


Fonte: elaborado pela autora.

Figura 7 - Espectro de massas do β - pineno

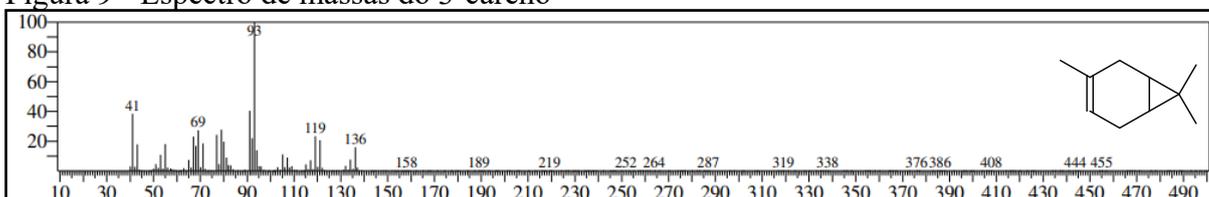
Fonte: elaborado pela autora.

Figura 8 - Espectro de massas do D- limoneno

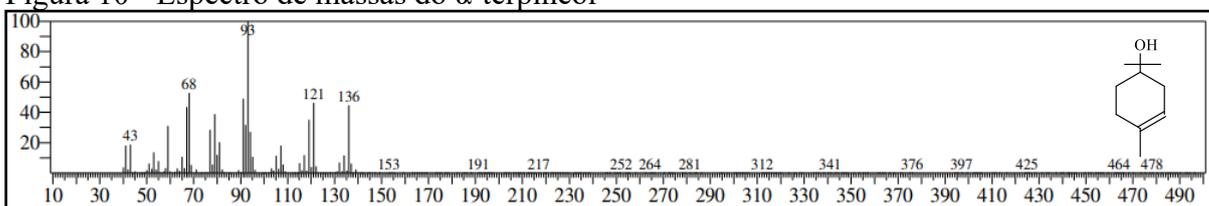


Fonte: elaborado pela autora.

Figura 9 - Espectro de massas do 3-careno



Fonte: elaborado pela autora.

Figura 10 - Espectro de massas do α -terpineol

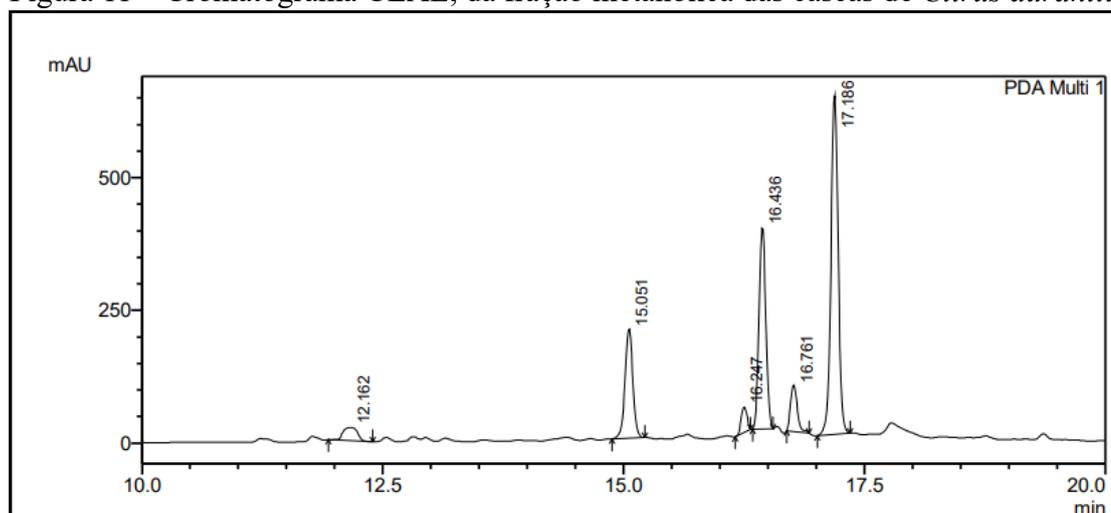
Fonte: elaborado pela autora.

5.2 Análise por CLAE das frações metanólica e acetônica e isolamento do composto Flav 04 de *Citrus aurantium*

As frações metanólica e acetônica foram analisadas por CLAE e o perfil cromatográfico estão expressos nas figuras 11 e 12 (pág. 33), respectivamente. Ambas frações foram observadas em 280 nm, pois esse comprimento de onda é uma região específica de absorção para compostos fenólicos.

Após análise dos cromatogramas, optou-se por fazer o isolamento de substâncias presente na fração metanólica, por esta apresentar picos com uma melhor separação. É possível perceber que alguns compostos estão presentes nos dois cromatogramas, diferindo a intensidade do sinal e o grau de separação entre os picos. A presença de vários ombros e picos que co-eluem na fração acetônica inviabilizou a separação eficiente das substâncias nessas condições cromatográficas, necessitando de um ajuste de método.

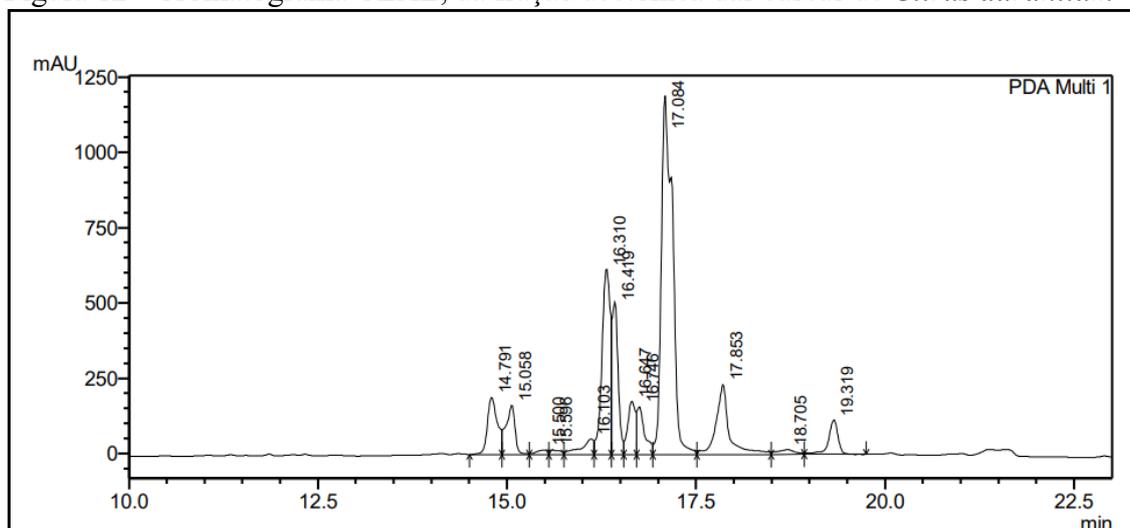
Figura 11 – Cromatograma CLAE, da fração metanólica das cascas de *Citrus aurantium*



Fonte: elaborado pela autora.

Após sucessivas injeções em CLAE, foi possível obter o composto **Flav 04**, referente ao tempo de 16,761 min. Os outros picos de maior intensidade estavam impuros o que impossibilitando a determinação estrutural via métodos espectroscópicos.

Figura 12 - Cromatograma CLAE, da fração acetônica das cascas de *Citrus aurantium*



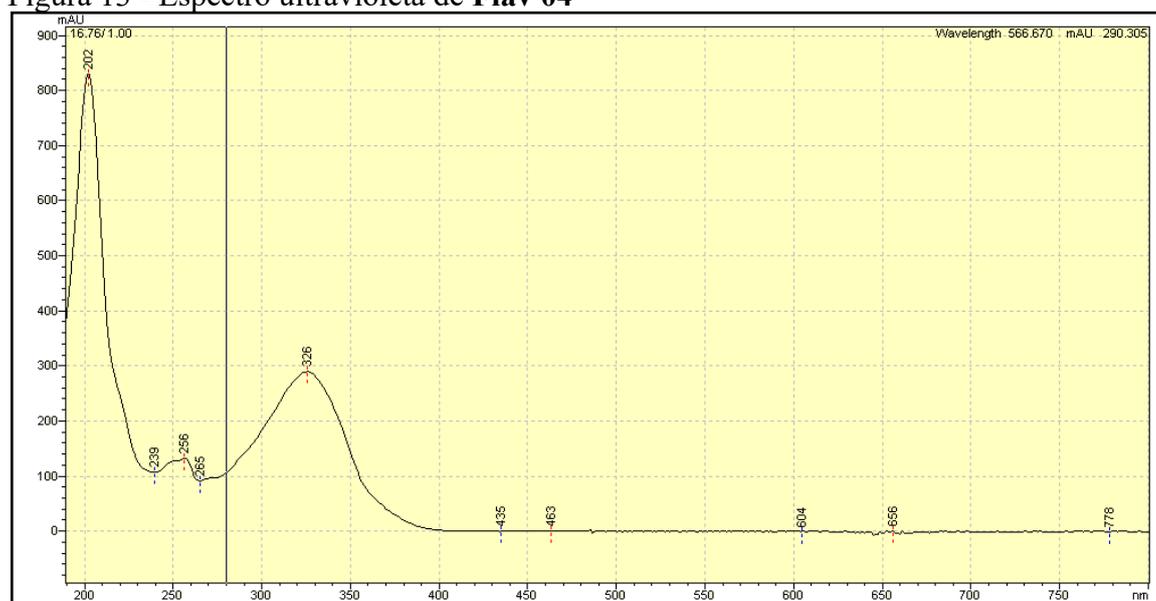
Fonte: elaborado pela autora.

5.3 Determinação estrutural de Flav 04 do extrato em acetato de etila de *Citrus aurantium*

O processo cromatográfico descrito anteriormente resultou em 7,5 mg de um sólido, de cor amarela, solúvel em metanol, com uma faixa de ponto de fusão de 86,2 – 88,1 °C, que foi denominado **Flav 04**.

O sistema de detecção de UV-Vis (arranjo de Diodo) no equipamento de CLAE, possibilitou a obtenção do espectro de ultravioleta (Figura 13), referente ao composto **Flav 04**, com tempo de retenção em 16,436 min. O espectro apresentou duas bandas na região do ultravioleta, uma banda de absorção máxima em 326 nm, característica das transições $\pi \rightarrow \pi^*$ de anéis aromáticos conjugados e outra banda de menor intensidade correspondente a transição do tipo $n \rightarrow \pi^*$ em 256 nm do grupamento cromóforo carbonila (PAVIA *et al.*, 2010).

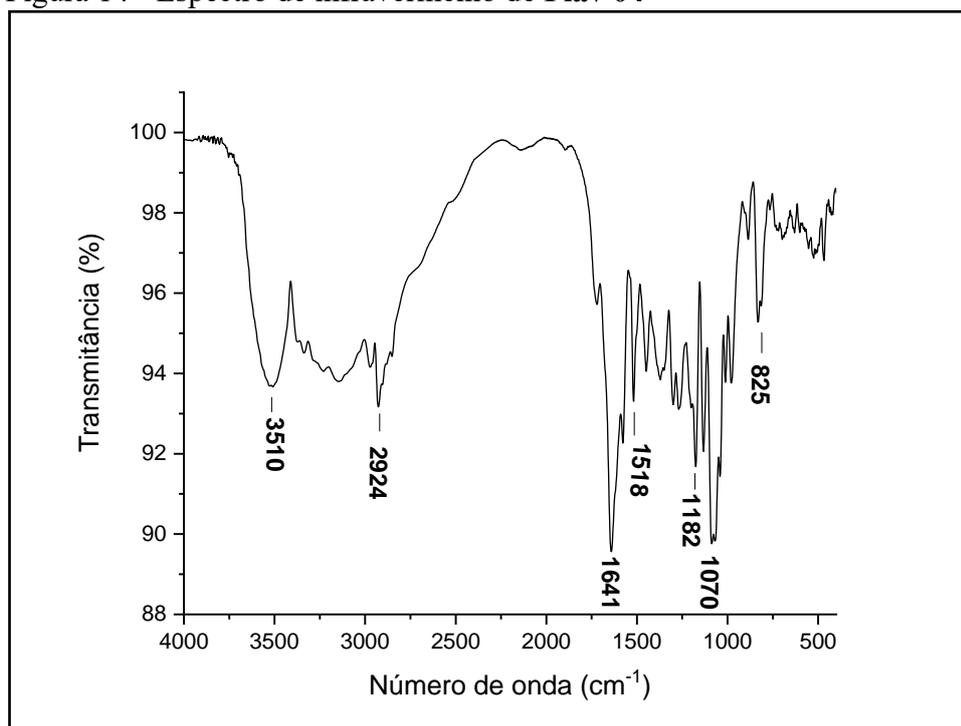
Figura 13 - Espectro ultravioleta de **Flav 04**



Fonte: elaborado pela autora.

O espectro de absorção na região do infravermelho (IV) de **Flav 04** (Figura 14, pág. 35), apresentou uma banda larga em 3510 cm^{-1} , referente a deformação axial da ligação O-H, a banda em 2924 cm^{-1} indica a vibração de estiramento relativo à presença de hidrogênio de carbono metilênico ($-\text{CH}_2-$). A banda em 1641 cm^{-1} característica de carbonila cetônica conjugada com o grupo arila. As três bandas de absorções em 1518 cm^{-1} , 1182 cm^{-1} e 1070 cm^{-1} evidenciam a deformação axial de ligação C-O e banda de deformação angular fora do plano de C-H em 825 cm^{-1} (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2007; PAVIA *et al.*, 2010).

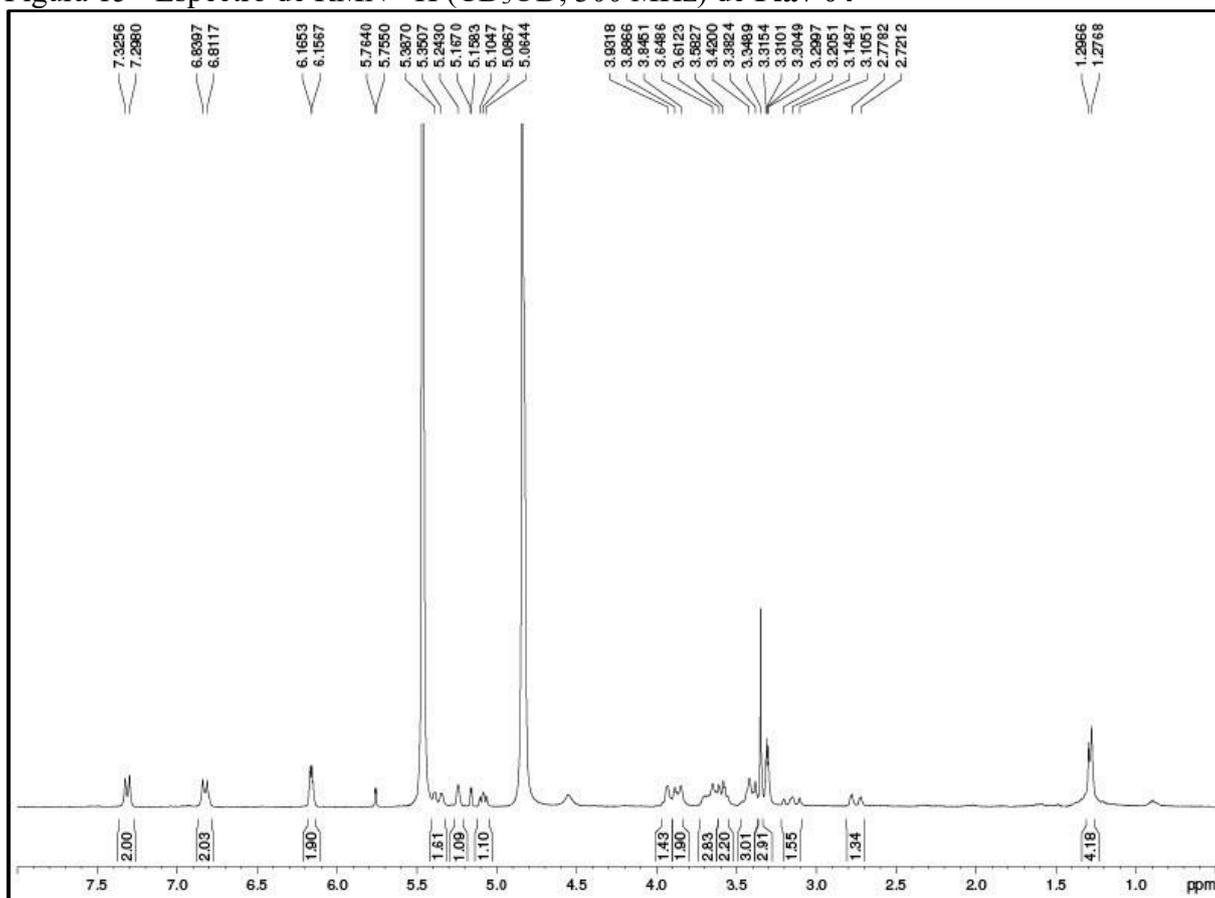
Figura 14 - Espectro de infravermelho de Flav 04



Fonte: elaborado pela autora.

O espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CD_3OD) expresso na Figura 15 (pág. 36) apresentou sinais correspondentes a dois dupletos em $\delta_{\text{H}} 7,32$ (d , $J = 8,28$ Hz, 1H) e $\delta_{\text{H}} 6,83$ (d , $J = 8,4$ Hz, 1H), sendo esses sinais atribuídos a hidrogênios de anel aromático posicionados *orto* e *para*, respectivamente. Além disso, foi verificado a presença de um singlete largo em torno de $\delta_{\text{H}} 4,5$ ppm, foi atribuído a hidrogênio de hidroxila. O sinal em $\delta_{\text{H}} 6,16$ (d , $J = 2,58$ Hz, 1H, 3H) do anel A apresenta hidrogênio de anel aromático mais blindado do que os hidrogênios $\delta_{\text{H}} 7,32$ e $\delta_{\text{H}} 6,83$ no anel C, isso porque os hidrogênios do anel A recebem densidade eletrônica dos pares de elétrons livre dos átomos de oxigênios vizinhos. O intervalo de $\delta_{\text{H}} 5,06 - 5,76$ ppm refere-se a hidrogênios ligados a carbonos saturados (sp^3), os sinais aparecem como: $\delta_{\text{H}} 5,24$ (m), $\delta_{\text{H}} 5,10$ (t) correspondendo a hidrogênios de carbonos metínicos. Um duplete largo $\delta_{\text{H}} 2,75$ (dl , $J = 17,0$ Hz, 1H) e um duplo duplete em $\delta_{\text{H}} 3,25$ (dd , $J = 17,0$ e $J = 13,0$ Hz, 1H) foram relacionados a hidrogênios de carbono metilênico. O sinal em $\delta_{\text{H}} 1,50$ (d , $J = 6,0$ Hz, 2H) indica a presença de hidrogênio de carbono metílico. (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2007; PAVIA *et al.*, 2010).

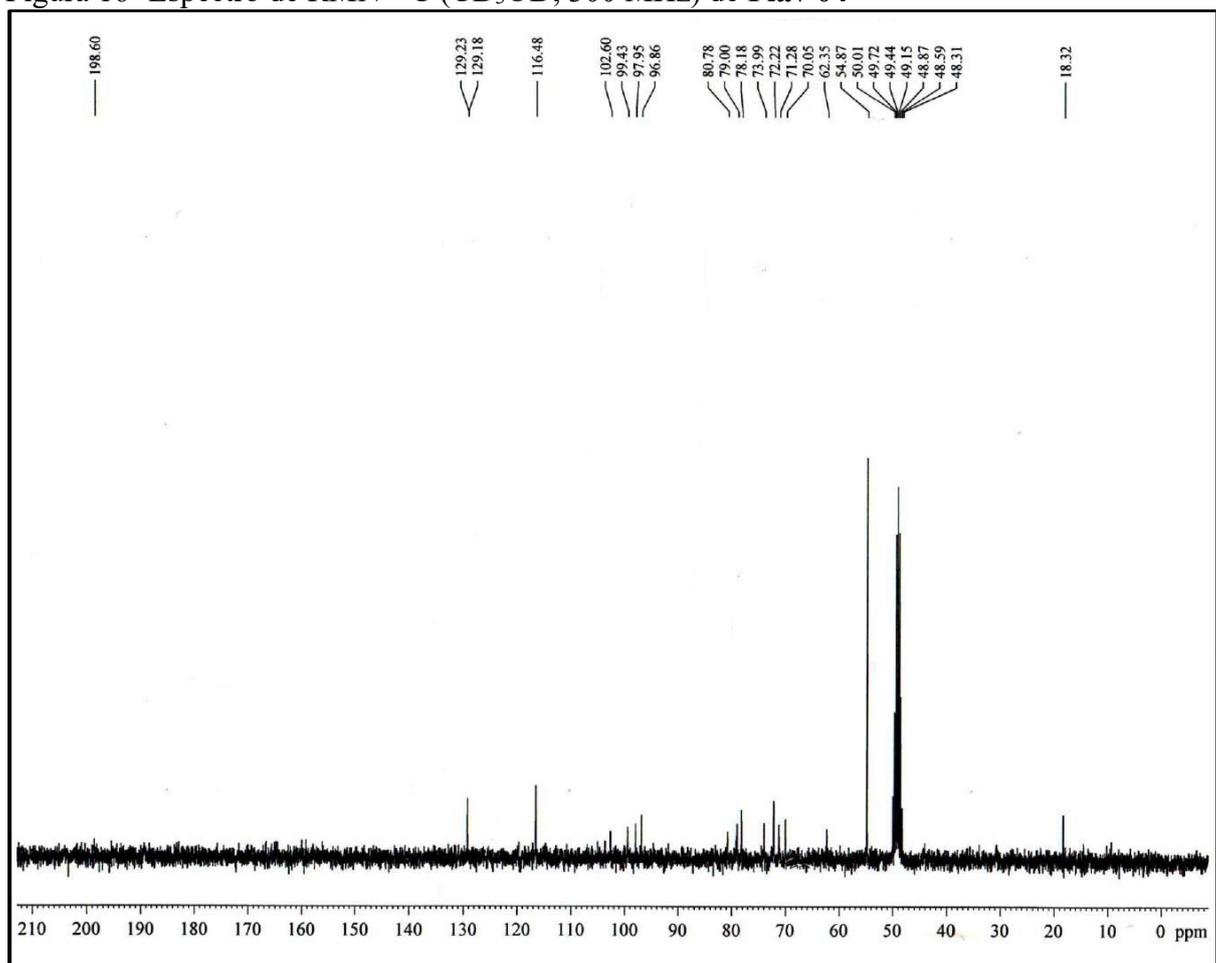
Figura 15 - Espectro de RMN ^1H (CD_3OD , 300 MHz) de **Flav 04**



Fonte: elaborado pela autora.

O espectro de RMN de carbono-13 (CD_3OD , 75 MHz), correspondente a Figura 16 (pág. 37) apresentou 25 sinais espectrais, sendo seis mais desprotegidos: δ_C 106,00, δ_C 116,00, δ_C 129,23, δ_C 159,00, δ_C 166,00 e δ_C 198,60 relacionados a carbonos com hibridização sp^2 , o sinal em δ_C 198,60 indica a presença de carbono carbonílico de cetona. Os sinais que estão na faixa de δ_C 18,32 a δ_C 54,87 correspondem a carbonos sp^3 , entre esses pode-se observar a presença de um sinal protegido em δ_C 18,32 referente a carbono metílico (CH_3) (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2007; PAVIA *et al.*, 2010).

Figura 16- Espectro de RMN ^{13}C (CD_3OD , 300 MHz) de **Flav 04**

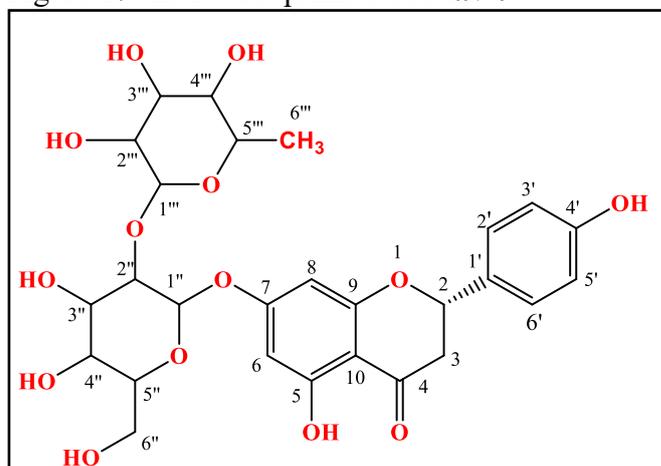


Fonte: elaborado pela autora.

Com base nos dados espectroscópicos de IV, RMN ^1H e ^{13}C (uni e bidimensionais), sugeriu-se a molécula como sendo um flavonóide glicosilado da classe das flavanonas representado na Figura 17 (pág. 38), cuja fórmula molecular é $\text{C}_{27}\text{H}_{32}\text{O}_{14}$, com Índice de Deficiência de Hidrogênio (IDH) igual a 12. A presença do sinal em δ_{C} 44,00 C-3 foi atribuído ao carbono no anel C desta classe. Observou-se ainda que esta flavanona apresenta duas unidades de açúcar, baseado nos dados RMN ^{13}C e da presença de dois carbonos anoméricos em δ_{C} 102,60 e δ_{C} 99,43. Os dados espectroscópicos sugerem que os dois açúcares são a glicose e a raminose, respectivamente. Outro dado importante e que esses açúcares estão ligados no carbono-7 em δ_{C} 166,00, do anel A da flavanona através do C-1'' da glicose. Assim de acordo com estes dados e com dados comparados com os da literatura (RIAZ *et al.*, 2013) pode-se concluir que o composto **Flav 04** se trata da Naringina (2S)-7-(4,5 dihidroxi-6(hidroxi metil)-3-(3,4,5-trihidroxi-6-metiltetrahidro-2H-piran-2-il)oxi)-5hidroxi-2-(4-fenilhidroxi)croman-4-ona), já identificada e reportada nas cascas de *Citrus aurantium*, apresentando atividades biológicas tais como antidiabética (SOMANATHAN *et al.*, 2021), antiviral contra o HIV tipo

1 (NZUZA; NDWANDWE; OWIRA, 2016), antitumoral sobre linhagens de células cancerosas da tireoide (ZHOU; XIA; ZHANG, 2019) e neuroprotetiva (MENG et al., 2021).

Figura 17- Estrutura química de **Flav 04**



Fonte: elaborado pela autora.

Tabela 2 - Dados espectroscópios do composto **Flav 04** e os dados reportados na literatura (RIAZ *et al.*, 2013) para a Naringina

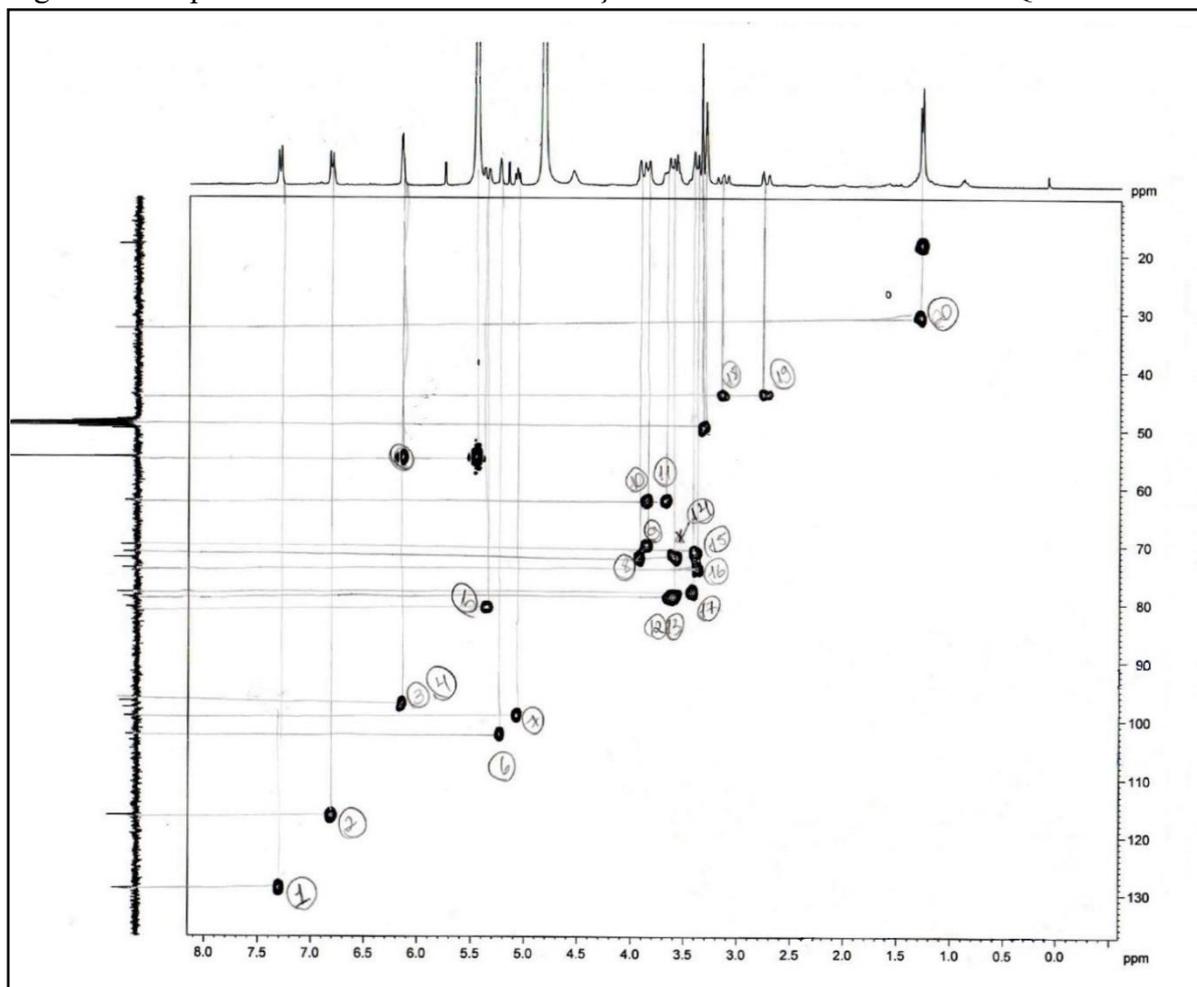
<i>Continua</i>						
Flav 04 (CD ₃ OD)			HMBC		Literatura (CD ₃ OD)	
	δ_C (ppm)	δ_H (ppm, multip. <i>J</i> , Hz)	$^2J_{CH}$	$^3J_{CH}$	δ_C (ppm)	δ_H (ppm, multip. <i>J</i> , Hz)
C						
4	198,60	-	H-3a/H-3b	-	198,51	-
7	166,00	-	H-6, H-8	-	166,58	-
9	-	-	-	-	164,61	-
10	106,00	-	-	H-6	104,90	-
1'	129,23	-	H-2'/H-6'	-	130,84	-
4'	159,00	-	H-2'/H-6'	-	159,07	-
CH						
2	80,78	5,33(<i>dd</i> , 10,89)	-	H-2'/H-6'		5,33(<i>dd</i> , 2,7 e 12,9, 1H)
5	-	-	-	-	164,98	
6	96,86	6,15	-	-		6,14 (<i>d</i> , 2,1, 1H)
8	97,95	6,16 (<i>d</i> , 2,58; 1H)	-	-		6,16 (<i>d</i> , 2,1, 1H)
2'/6'	129,18	7,31 (<i>d</i> , 8,28, 2H)	-	-	129,10	7,28 (<i>d</i> , 8,4, 2H)
3'/5'	116,48	6,83 (<i>d</i> , 8,4, 2H)	-	-	116,35	6,79 (<i>d</i> , 8,7, 2H)
1''	102,60	5,24	-	-	102,56	5,06 (<i>d</i> , 7,2 e 12,9, 1H)
1'''	99,43	5,10 (<i>m</i>)	-	-	99,41	5,24 (<i>d</i> , 1,2)
4'''	72,22 ou 73,99	-	-	CH ₃ -6'''	73,92	3,27 (<i>m</i> , 1H)
5'''	70,05	-	CH ₃ -6'''		69,98	3,92 (<i>m</i> , 1H)

CH ₂						
3		2,75 (<i>dl</i> , 17,0, 1H) 3,25 (<i>dd</i> , 17,0 e 13,0, 1H)	-	-		2,72(<i>dd</i> , 17,1 e 2,7, 1H) 3,16 (<i>dd</i> , 17,1 e 12,9, 1H)
6''	62,35	3,64 e 3,88	-	-	62,27	4,29 (<i>m</i> , 1H) 4,18 (<i>m</i> , 1H)
CH ₃						
6'''	18,32	1,50 (<i>d</i> , 6,0 Hz)	-	-	18,21	1,27 (<i>d</i> , 6,3; 3H)

Fonte: elaborado pela autora.

Os dados de HSQC Figura 18 mostra a correlação heteronuclear ¹H x ¹³C que possibilitou a associação direta dos hidrogênios com seus respectivos carbonos, conforme mostrado na Tabela 2 (pág. 38).

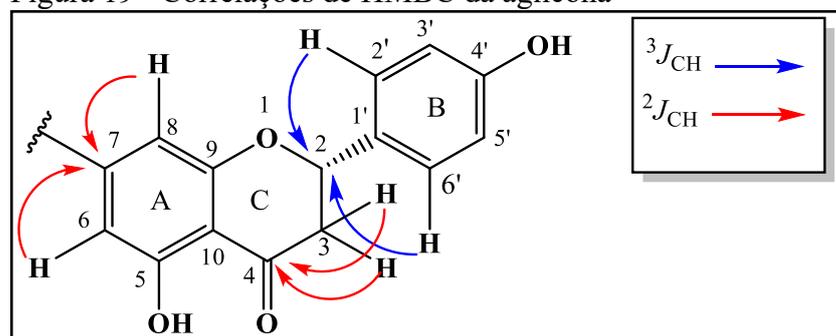
Figura 18 - Espectro bidimensional de correlação heteronuclear ¹³C x ¹H - HSQC de **Flav 04**



Fonte: elaborada pela autora.

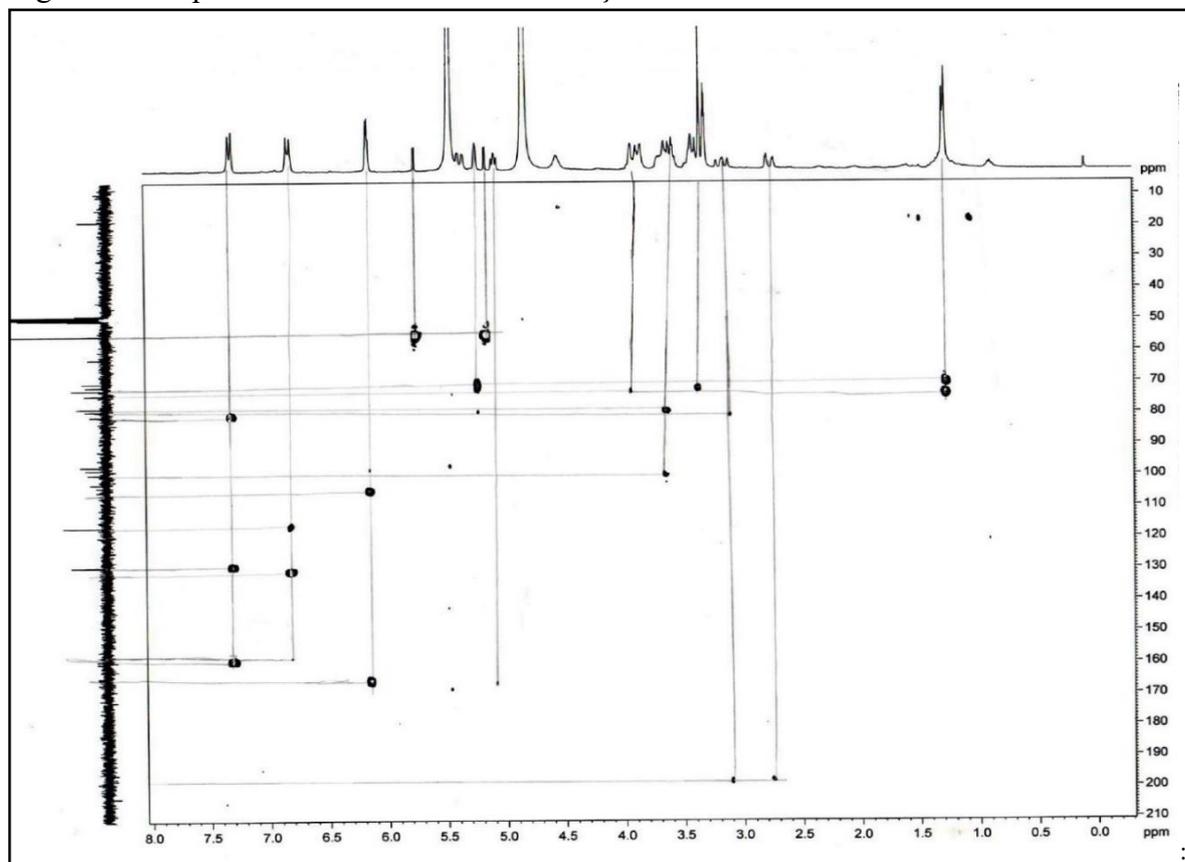
A análise do espectro bidimensional de correlação heteronuclear $^{13}\text{C} \times ^1\text{H}$ – HMBC Figura 20 (pág. 40) mostrou a correlação a longa distância (2J) dos H-3a e H-3b do anel C com o carbono carbonílico em δ_{C} 198,00, confirmando a estrutura base de uma flavanona. As correlações a três ligações (3J) dos H-2'/H-6' com o carbono na posição 2 justifica a substituição *para* no anel B da aglicona. Os hidrogênios δ_{H} 6,15 do (C-6) e δ_{H} 6,16 do (C-8) se correlacionam, ambos a duas ligações do carbono 7 em δ_{C} 166,00, definindo que na posição *meta* se encontra o grupo raminosídeo, conforme as correlações expressas na Figura 19.

Figura 19 - Correlações de HMBC da aglicona



Fonte: elaborado pela autora.

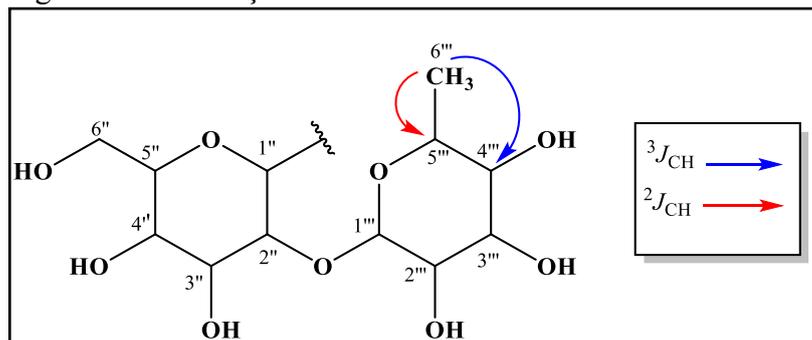
Figura 20 - Espectro bidimensional de correlação heteronuclear $^{13}\text{C} \times ^1\text{H}$ - HMBC de **Flav 04**



Fonte: elaborado pela autora.

As correlações a longa distância que aparecem no experimento bidimensional ^{13}C x ^1H – HMBC, Figura 20 (pág. 40), confirmaram a presença da metila da raminose em δ_{C} 18,32 pela correlação a duas ligações ($^2J_{\text{CH}}$) do CH_3 -6''' com o carbono 5''' δ_{C} 70,05, e a correlação a três ligações ($^3J_{\text{CH}}$) dos hidrogênios metílicos com o carbono 4''' em δ_{C} 72,22 ou 73,99, conforme representado na Figura 21.

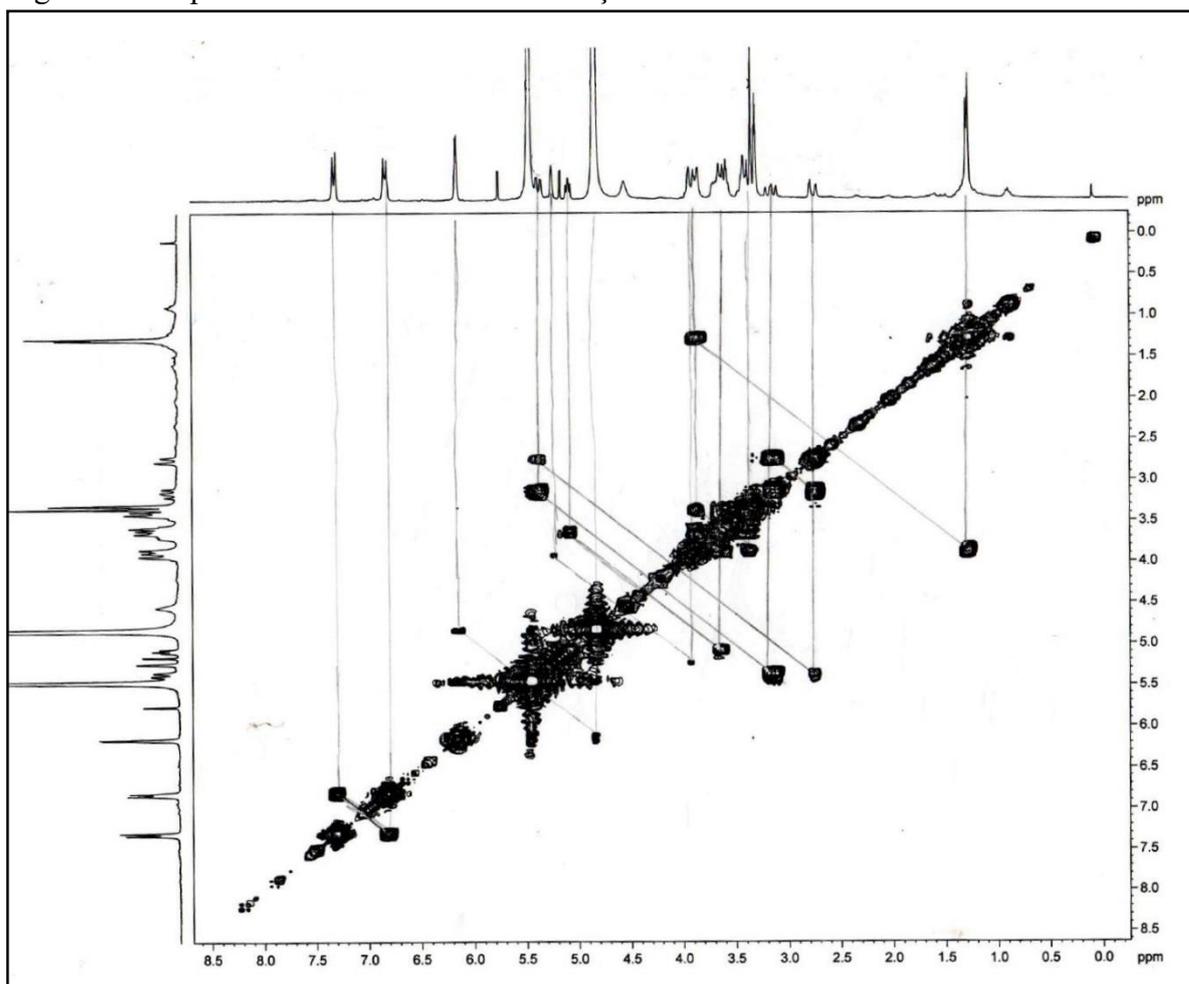
Figura 21: Correlações de HMBC do raminosídeo



Fonte: elaborado pela autora.

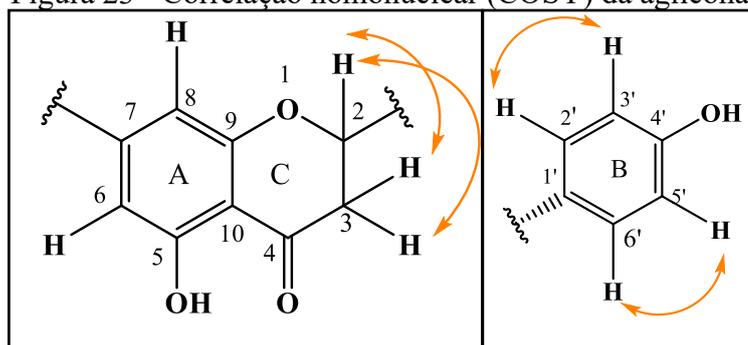
O espectro bidimensional de correlação homonuclear de ^1H x ^1H - COSY, Figura 22, (pág. 42) do composto **Flav 04**, mostrou correlação do hidrogênio 2 em δ_{H} 5,33 com os hidrogênios 3a (δ_{H} 2,75) e 3b (δ_{H} 3,25) afirmando a que o flavonóide em questão pertencente a classe das flavanonas e não possui insaturação entre os carbonos C-2 e C-3. Os hidrogênios 2'/6' em δ_{H} 7,31 possuem o mesmo ambiente químico, assim como os hidrogênios 3'/5' em δ_{H} 6,83, estes se correlacionam de forma homonuclear, confirmando a presença de um substituinte (OH) no carbono 4', conforme expresso na Figura 23 (pág. 42).

Figura 22 - Espectro bidimensional de correlação homonuclear $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ - COSY de **Flav 04**



Fonte: elaborado pela autora.

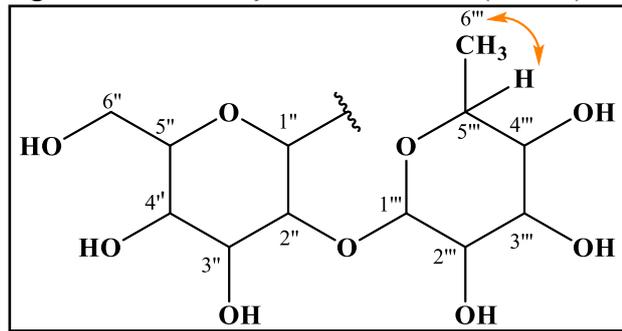
Figura 23 - Correlação homonuclear (COSY) da aglicona



Fonte: elaborado pela autora.

A correlação homonuclear de $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ - COSY do raminosídeo Figura 24, (pág. 43) mostra que o hidrogênio do carbono 5''' se correlaciona com os hidrogênios vicinais da metila (C-6'''), isso comprova que o açúcar ligado a glicose se trata de uma raminose, essa contém uma metila na sua estrutura o que a diferencia de outros açúcares.

Figura 24 - Correlação homonuclear (COSY) do raminosídeo



Fonte: elaborado pela autora.

5.4 Ensaios biológicos do extrato em acetato de etila

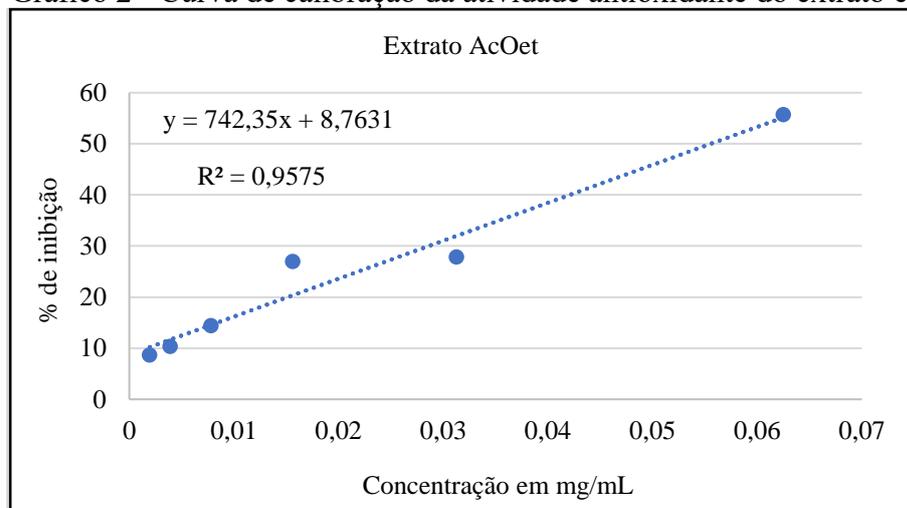
5.4.1 Análise da atividade antioxidante pela captura do radical livre DPPH°

Após o procedimento descrito no item 4.7, subitem 4.7.1, os dados foram organizados graficamente de modo a obter a equação da reta e a função da porcentagem de inibição (eixo y) vs a concentração da amostra (eixo x).

A atividade antioxidante é verificada a partir do CI_{50} (concentração inibitória de 50%), que é a capacidade que um agente antioxidante tem de capturar 50% dos radicais livres em uma solução de DPPH°. Logo, quanto menor for o valor de CI_{50} , maior é a atividade antioxidante nesse composto ou matriz de compostos (PUTON *et al.*, 2018).

O experimento espectrofotométrico do extrato em AcOEt (GRÁFICO 2), apresentou equação da reta ($y = 742,35x + 8,7631$) e uma correlação entre os pontos de 0,9575. A concentração inibitória de 50% obtida foi de 55,55 $\mu\text{g/mL}$.

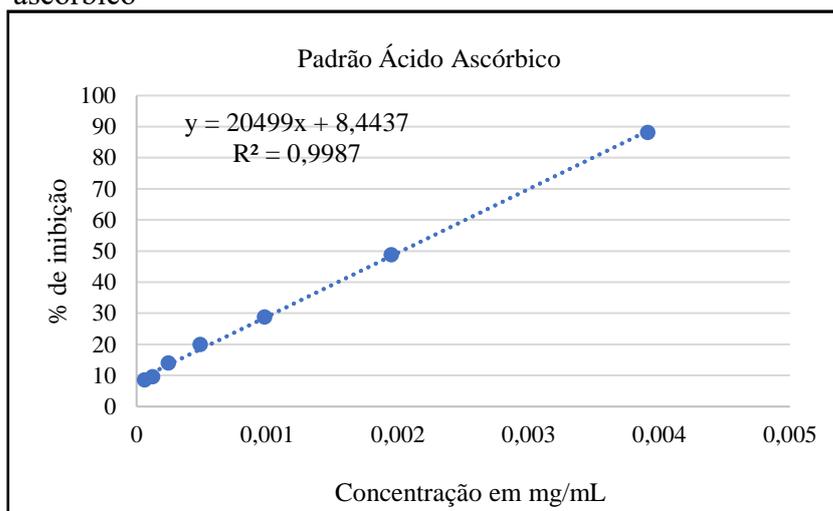
Gráfico 2 - Curva de calibração da atividade antioxidante do extrato em AcOEt



Fonte: elaborado pela autora.

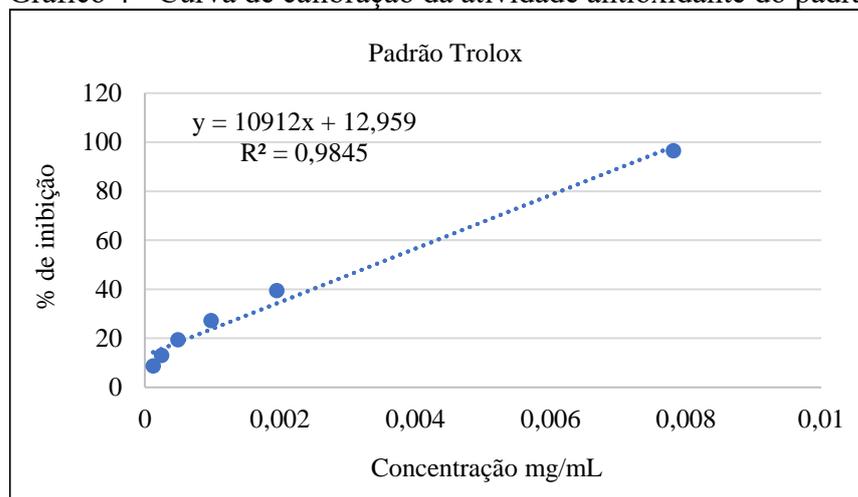
No teste antioxidante foram utilizados dois padrões positivos, o ácido ascórbico (GRÁFICO 3, pág. 44), que é um dos mais eficazes agentes antioxidante natural, apresentando ótima capacidade de capturar radicais livres (SUCUPIRA *et al.*, 2012), e o Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico) (GRÁFICO 4), este é um antioxidante sintético derivado da vitamina E.

Gráfico 3 - Curva de calibração da atividade antioxidante do padrão Ácido ascórbico



Fonte: elaborado pela autora.

Gráfico 4 - Curva de calibração da atividade antioxidante do padrão Trolox



Fonte: elaborado pela autora.

Tabela 3 - Dados de concentração inibitória (CI₅₀) para determinação da capacidade antioxidante

Amostra	CI ₅₀ (µg/mL)	Desvio Padrão
Extrato em AcOEt	55,55	1,489 x 10 ⁻²
Padrão ácido ascórbico	2,07	2,585 x 10 ⁻⁴
Padrão trolox	3,39	3,555 x 10 ⁻⁴

Fonte: elaborado pela autora.

A interpretação da atividade antioxidante dá-se por meio de comparação. De acordo com a Tabela 3, (pág. 44) pode-se observar que os padrões, ácido ascórbico e trolox, apresentaram um valor de CI_{50} aproximadamente 10 vezes maior que o extrato em acetato de *Citrus aurantium*, porém deve-se considerar que a matriz que compõe um extrato é diversa e pode haver compostos que inibem a capacidade antioxidante.

A literatura reporta valores de CI_{50} para compostos fenólicos, como exemplo da naringina, cujo valor é 36,21 $\mu\text{g/mL}$ próximo do valor da quercetina, 16,96 $\mu\text{g/mL}$. Este último é um metabolito secundário pertencente a subclasse dos flavonóis presentes em várias plantas, considerado um padrão por possuir elevado potencial antioxidante (RIAZ *et al.*, 2013). Assim, pode-se afirmar que os valores de compostos fenólicos encontrados na literatura, é próximo do valor de CI_{50} de 55,55 $\mu\text{g/mL}$ encontrado para o extrato de *C. aurantium*.

Como foi verificado por meio de dados espectroscópios, que o extrato apresenta compostos fenólicos em sua composição, esses funcionam como antioxidantes devido hidroxilas (OH) fenólicas, combatendo os radicais livres, através da doação de hidrogênio.

Os valores da correlação entre os pontos adquirido nas das curvas de calibração dos três experimentos estão dentro da margem esperada, passando maior confiabilidade aos valores encontrados de concentração inibitória dos radicais livres.

5.4.2- Avaliação de inibição da enzima acetilcolinesterase

O teste descrito no subitem 4.7.2 que descreve o método colorimétrico da atividade anti-acetilcolinesterásica não apresentou resultados satisfatórios. Não houve formação de formação de “halo” de inibição como mostra a Tabela 4.

Tabela 4 - Dados da atividade de inibição da enzima acetilcolinesterase

Amostra	Resultado	Tamanho do halo (mm)
Extrato em AcOEt	Negativo	**
Padrão Eserina	Positivo	9

Fonte: elaborado pela autora.

** Não houve formação de “halo” de inibição

5.4.3- Avaliação do potencial antifúngico frente a cepas de *Candida* (*C. albicans*, *C. krusei* e *C. parapsilosis*)

O extrato em acetato de etila foi capaz de reduzir o crescimento de todas as espécies de *Candida* avaliadas. Observou-se um efeito dose-dependente, o que significa que maiores

concentrações do extrato em acetato foram mais efetivas na inibição do crescimento das cepas de *Candida*. Os percentuais elevados de inibição, superiores aos 90%, foram encontrados para *C. albicans* e *C. parapsilosis*, tratadas com o extrato na concentração de 500 µg/mL conforme os dados expresso na Tabela 5.

Tabela 5 - Inibição de cepas de *Candida* induzidas pelo extrato em acetato

Amostra/Concentração	% de Inibição		
	<i>C. albicans</i>	<i>C. krusei</i>	<i>C. parapsilosis</i>
Ext. AcOEt 500 µg/mL	92,96	30,02	98,64
Ext. AcOEt 250 µg/mL	36,63	30,02	95,77
Ext. AcOEt 125 µg/mL	24,26	30,75	72,78
Ext. AcOEt 62,5 µg/mL	18,21	29,71	37,59
Ext. AcOEt 31,25 µg/mL	10,95	4,95	22,02
Nistatina (122,7 µM)	100	100	100

Fonte: elaborado pela autora.

Sendo assim, os ensaios de mecanismos de ação foram conduzidos com o extrato em acetato contra as duas espécies mais susceptíveis, *C. albicans* e *C. parapsilosis*.

5.4.3.1 - Verificação do mecanismo de ação antimicrobiana do extrato em acetato de *Citrus aurantium*

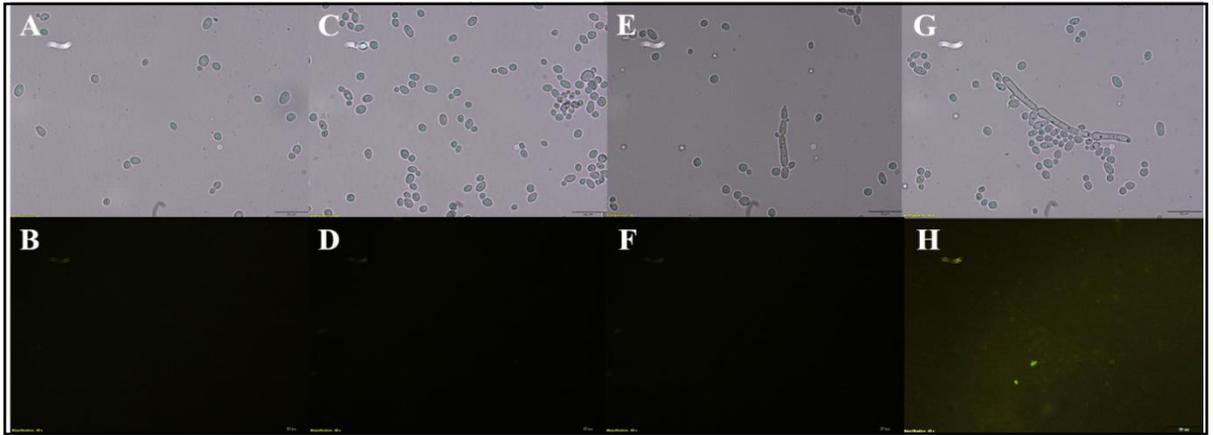
a - Indução da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs);

As espécies reativas de oxigênio (EROs) desempenham um papel fundamental no funcionamento celular sob condições de estresse, onde o balanço redox é normalmente comprometido. Como consequência, a produção de EROs aumenta de forma expressiva, causando danos em lipídeos, proteínas e no próprio DNA (WANG et al., 2016).

Os resultados encontrados indicam que não houve a superprodução de EROs para nenhuma das cepas de *Candida* tratadas com o extrato em AcOEt de *C. aurantium*, o que é indiciado pela ausência de fluorescência verde, apontado pelo DCFH-DA que é um corante permeável que pode ser oxidado por EROs e convertido em uma molécula fluorescente, a 2,7-dichlorofluoresceína conforme exposto nas Figuras 25 e 26 (pág. 47). As células que compõe o experimento foram observadas em um microscópio de fluorescência Olympus BX41

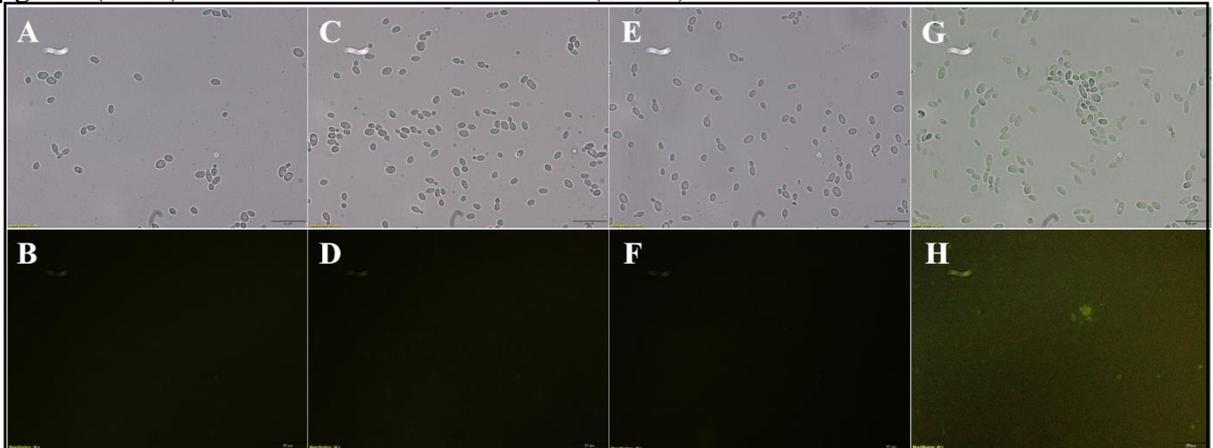
(comprimentos de onda de excitação e emissão de 488 nm e 525 nm, respectivamente).

Figura 25 - Micrografias de indução de produção de EROs em células de *C. albicans* tratadas com DMSO 5% em NaCl 0,5 M (A e B), AcOEt 500 µg/mL (C e D), AcOEt 250 µg/mL (E e F) e anfotericina B 8.6×10^{-6} M (G e H)



Fonte: elaborado pela autora.

Figura 26 - Micrografias de indução de produção de EROs em células de *C. parapsilosis* tratadas com DMSO 5% em NaCl 0,5 M (A e B), AcOEt 125 µg/mL (C e D), AcOEt 62,5 µg/mL (E e F) ou anfotericina B 8.6×10^{-6} M (G e H)



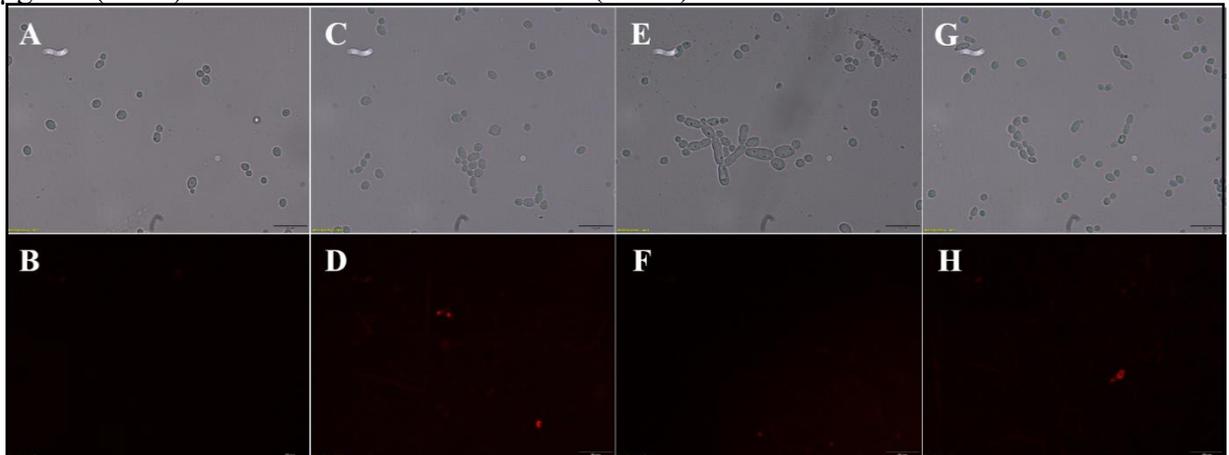
Fonte: elaborado pela autora.

b - Determinação da integridade da membrana celular;

As células de *C. albicans* e *C. parapsilosis* tratadas com o extrato em AcOEt de *C. aurantium*, emitiram fluorescência vermelha, o que indica que a membrana plasmática sofreu algum processo de ruptura que permitiu a entrada do iodeto de propídio. Tal efeito não foi observado no controle negativo, DMSO 5% em NaCl 0,15 M, onde não foi detectada emissão de fluorescência como podemos analisar nas Figuras 27 e 28 (pág. 48). O iodeto de propídio é um agente intercalante e fluoróforo que se liga ao DNA. Uma vez ligado ao DNA, a sua fluorescência é aumentada e pode ser observada por microscopia de fluorescência (WANG *et*

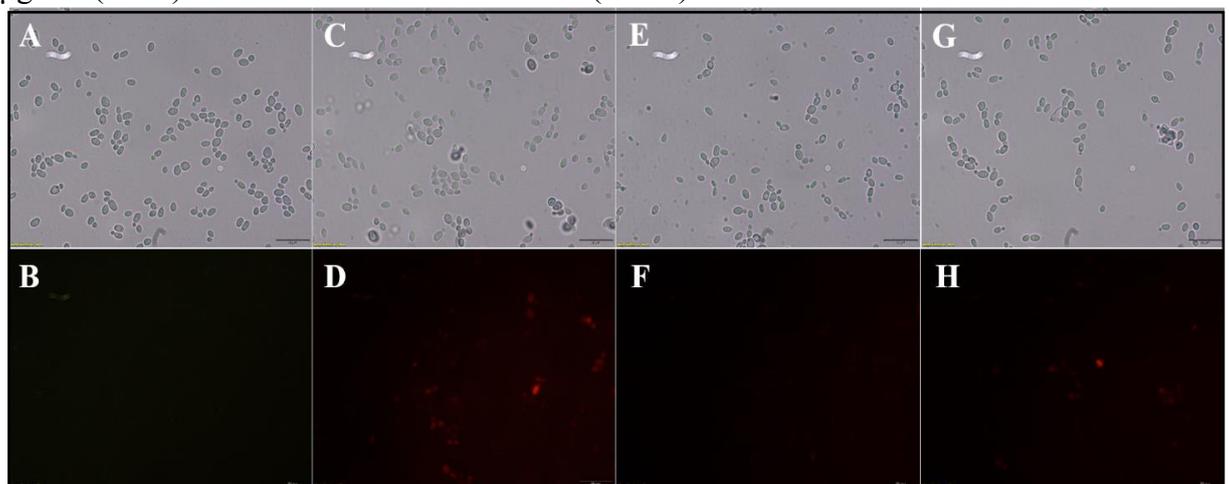
al., 2016). Por ser impermeável em membranas íntegras, esse agente é normalmente utilizado como marcador de células mortas.

Figura 27- Micrografias de determinação da integridade celular em células de *C. albicans* tratadas com DMSO 5% em NaCl 0,5 M (A e B), AcOEt 500 µg/mL (C e D), AcOEt 250 µg/mL (E e F) ou anfotericina B 8.6×10^{-6} M (G e H)



Fonte: elaborado pela autora.

Figura 28- Micrografias de determinação da integridade celular em células de *C. parapsilosis* tratadas com DMSO 5% em NaCl 0,5 M (A e B), AcOEt 125 µg/mL (C e D), AcOEt 62,5 µg/mL (E e F) ou anfotericina B 8.6×10^{-6} M (G e H)

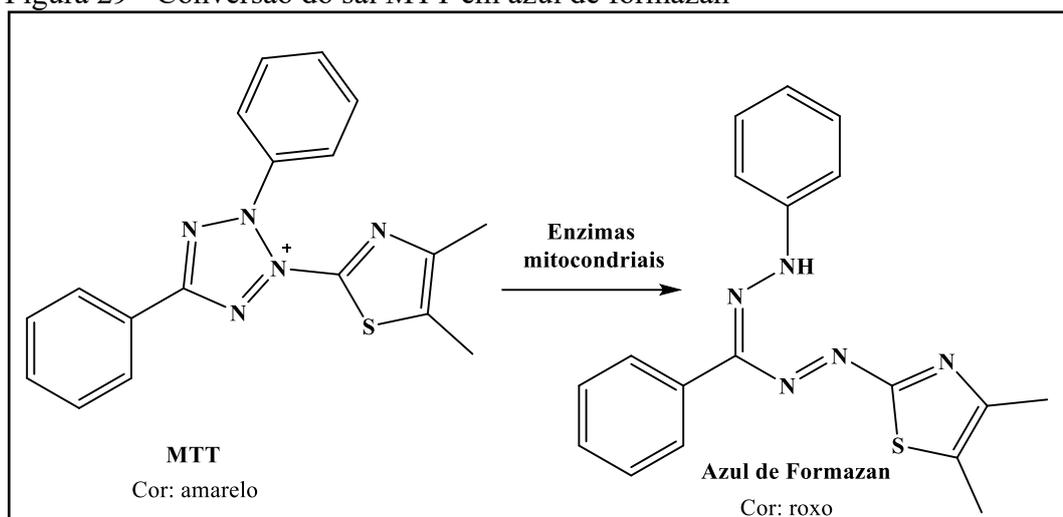


Fonte: elaborado pela autora.

5.4.3 Avaliação da atividade citotóxica do extrato em AcOEt

O método colorimétrico de viabilidade celular, baseia-se na conversão do sal MTT em azul de formazan pela ação de enzimas mitocondriais que estão presentes apenas em células metabolicamente ativas, conforme a reação expressa na Figura 29 (pág. 49).

Figura 29 - Conversão do sal MTT em azul de formazan

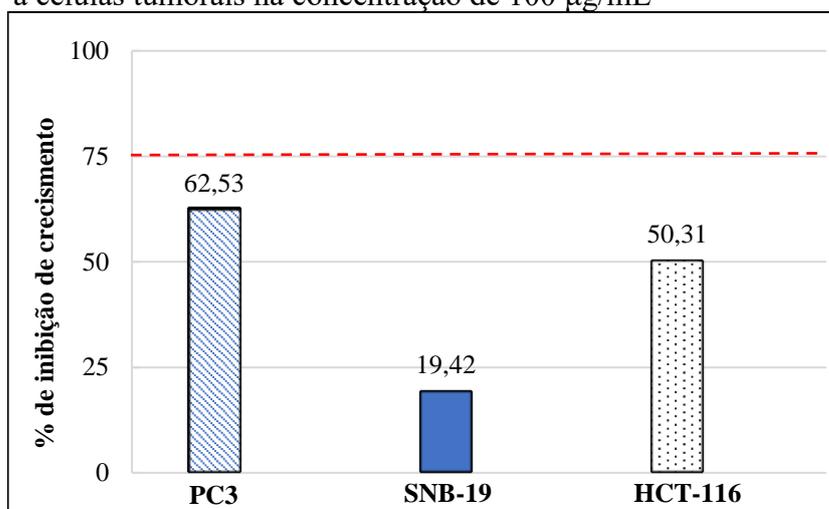


Fonte: adaptação de Magalhães; Thá; Leme, (2018).

O potencial de citotoxicidade foi classificado em três escalas; baixa atividade no qual a inibição do crescimento celular apresentou faixa 1 a 50%, atividade média quando o intervalo compreendido foi de 50,1 a 75% de inibição do crescimento celular e acima de 75% considerado alta capacidade de inibição do crescimento celular (ALMEIDA *et al.*, 2014; Comitê Técnico ISO / TC 194, 2009).

O extrato em AcOEt apresentou 62,53 % de inibição frente a linhagem PC3 (câncer de próstata) com um desvio padrão de $\pm 1,50$, sendo, portanto, considerado uma atividade média. A linhagem celular SNB-19 (glioblastoma) mostrou uma inibição de 19,42 % e desvio padrão de $\pm 1,72$, significando baixa atividade. As células HCT-116 (câncer colorretal) tiveram uma inibição de 50,31 %, desvio padrão de $\pm 2,13$, correspondendo a atividade média. A representação do Gráfico 5, (pág. 50) exhibe as respectivas porcentagens de inibição frente as linhagens de células cancerígenas.

Gráfico 5 - Inibição de crescimento celular do extrato de acetato de etila frente a células tumorais na concentração de 100 µg/mL



Fonte: elaborado pela autora.

Assim, com base nas porcentagens de inibição calculou-se a concentração inibitória média (CI₅₀) (Tabela 6) e seus respectivos intervalos de confiabilidade, sendo que CI₅₀ baixo significa que a amostra tem alta capacidade citotóxica e vice-versa. O extrato se mostrou potencialmente promissor para a linhagem PC3 (câncer de próstata) com uma concentração inibitória média de 68,05 µg/mL, as células HCT-116 (câncer colorretal) resultaram em CI₅₀ de 99,70 µg/mL e a linhagem SNB-19 se apresentou inativa na maior concentração usada que foi de 100 µg/mL.

Tabela 6 - Concentração inibitória média do extrato em acetato de etila na concentração de 100 µg/mL frente as linhagens de células tumorais

Amostra	Linhagens tumorais - CI ₅₀ µg/mL (Intervalo de confiança)		
	PC3	SNB-19	HCT-116
AcOEt	68,05 55,25 – 83,81	>100	99,70 93,79 – 106,0
Doxorrubicina (µM)	0,76 0,59 – 0,93	1,20 1,03 - 1,9	0,11 0,08 – 0,14

Fonte: elaborado pela autora.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estudo fotoquímico da espécie *Citrus aurantium* L. possibilitou o isolamento e a caracterização de um flavonóide glicosilado conhecido como naringina (**Flav 04**), relatado na literatura por possuir diversas atividades terapêuticas.

A atividade antioxidante pelo método do DPPH^o do extrato em AcOEt de *C. aurantium* exibiu um valor de CI₅₀ de 50,55 mg/mL, apresentado um potencial antioxidante bem próximo ao citado na literatura para a naringina (36,21 mg/mL), um composto puro bem conhecido. Tal atividade pode estar relacionada à presença de compostos fenólicos neste extrato.

A atividade citotóxica apresentou-se promissora para duas linhagens de células cancerosas, a PC3 (próstata) e HCT-116 (colorretal) com CI₅₀ de 68,05 µg/mL e 99,70 µg/mL, respectivamente, na escala adotada corresponde a atividade moderada. Esse resultado indica que o extrato *C. aurantium* contém moléculas com potencial citotóxico e pelo fato de um extrato possuir uma matriz complexa com substâncias de diversas classes, acredita-se que os compostos puros possuam maior capacidade citotóxica, assim, é relevante o isolamento de outros metabólitos secundários como perspectiva de novos agentes anticâncer.

A atividade antifúngica apontou resultados satisfatórios frente as cepas de *Candida albicans* e *Candida parapsilosis*, com capacidade inibitória de mais de 90% para ambas, na concentração de 500 µg/mL do extrato de *C. aurantium*, portanto, seguiu-se a investigação dos possíveis mecanismos de ação antimicrobiana nas células de *C. albicans* e *C. parapsilosis* submetidas à presença do extrato, e assim foi possível verificar que as leveduras quando em contato com o extrato sofrem desintegração da parede celular, chegando a apoptose.

A análise de inibição da enzima acetilcolinesterase do extrato não apresentou resultado satisfatório.

A investigação química e biológica do extrato em acetato de *C. aurantium* L. indicou a presença de substâncias potencialmente bioativas, evidenciado pelos testes biológicos realizados, esses resultados expandem os conhecimentos que se tem sobre essa espécie possibilitando a descoberta de novos fitoterápicos naturais, sem os diversos efeitos colaterais causados pelos medicamentos sintéticos.

REFERÊNCIAS

- ABOU, B. D.H.; IBRAHIM, B.M.; HASSAN, N.S.; YOUSUF, A.F.; El G. S. Exploiting citrus aurantium seeds and their secondary metabolites in the management of alzheimer disease. **Toxicology reports**. v. 7, p.723-729, 2020.
- AL ABOODY, M. S.; MICKYMARAY, S. Anti-fungal efficacy and mechanisms of flavonoids. **Antibiotics**. v. 9, n. 2, p. 1-42, 2020.
- ALMEIDA, J. R. G. S.; ARAÚJO, C. S.; PESSOA, C. O.; COSTA, M. P.; PACHECO, A. G. M. Antioxidant, cytotoxic and antimicrobial activity of *Annona vepretorum* Mart. (Annonaceae). **Revista Brasileira de Fruticultura**. v. 36, p. 258-64, 2014.
- ALVES, C. Q.; DAVIDL, J. M.; DAVID, J. P.; BAHIA, M. V.; AGUIAR, R, M. Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos. **Química Nova**. v. 33, n. 10, p. 2202-2210, 2010.
- ANDREANI, T.; SEVERINO, P.; DE HOLLANDA, L. M.; VAZZANA, M.; SOUTO, S. B.; SANTINI, A.; SILVA, A.M.; SOUTO, E. B. Cancer therapies: Applications, nanomedicines and nanotoxicology. **Nanostructures for Cancer Therapy**. p. 241-260, 2017.
- BERRIDGE, M. V.; TAN, A. S.; MCCOY, K. D.; WANG, R. The Biochemical and Cellular Basis of Cell Proliferation Assays that Use Tetrazolium Salts. **Biochemical**. v. 4, p. 14-19, 1996.
- BONGOMIN, F.; GAGO, S.; OLADELE, R.; DENNING, D. Global and multinational prevalence of fungal diseases estimate precision. **Journal of Fungi**. v. 3, p. 57, 2017.
- BRAZ-FILHO, R. Química de produtos naturais: importância, interdisciplinaridade, dificuldades e perspectivas. A peregrinação de Pacatubano. **Química Nova**. v. 17, 1994.
- BORGES, P. L.; AMORIM, A. V. Metabólitos secundários de plantas. **Revista Agrotecnologia**. v.11, n.1, p.54-67, 2020.
- CARVALHO, F. M. I. R.; COSTA, Mirtes. Anxiolytics and sedative effects of extracts and essential oil from *Citrus aurantium* L. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 25, n. 12, p. 1629-1633, 2002.
- CASERTA, R.; TEIXEIRA-SILVA, N.S.; GRANATO, L. M.; DORTA, S. O.; RODRIGUES, C. M.; Mitre, L. K.; YOCHIKAWA, J. T. H.; FISCHER, E. R.; NASCIMENTO, C. A.; SOUZA-NETO, R. R. and TAKITA, M. A.; 2019. **Citrus biotechnology: What has been done to improve disease resistance in such an important crop?**. *Biotechnology Research and Innovation*, 3, pp.95-109.
- DEGIRMENCI, H.; ERKURT, H. Chemical profile and antioxidant potency of *Citrus aurantium* L. flower extracts with antibacterial effect against foodborne pathogens in rice pudding. **LWT**. v. 126, p. 109273, 2020.
- ELGAT, W. A. A. A.; KORDY, A.M.; BÖHM, M.; ČERNÝ, R.; ABDEL-MEGEED, A.; SALEM, M. Z. M. Eucalyptus camaldulensis, *Citrus aurantium*, and *Citrus sinensis* Essential

Oils as Antifungal Activity against *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus*, and *Fusarium culmorum*. **Processes**. v. 8, n. 8, p.1003, 2020.

ELLMAN G. L.; COURTNEY K. D.; ANDRES V. J. R.; FEATHERSTONE R. M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**. v. 7, n. 2, p. 88-95, 1961.

FAOSTAT. Disponível em: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>. Acessado em: 26 Fev. 2021.

GIADA, MARIA. Uma abordagem sobre a capacidade antioxidante in vitro de alimentos vegetais e bebidas. **DEMETRA: Alimentação, Nutrição & Saúde**. v. 9, n. 1, p. 137-146, 2014.

GUO, J. J.; GAO, Z. P.; XIA, J. L.; RITENOUR, M. A.; LI, G. Y.; SHAN, Y. Comparative analysis of chemical composition, antimicrobial and antioxidant activity of citrus essential oils from the main cultivated varieties in China. **LWT**. v. 97, p. 825-839, 2018.

HAMEDI, A.; ZARSHENAS, M. M.; JAMSHIDZADEH, A.; AHMADI, S.; HEIDARI, R.; PASDARAN, A. Citrus aurantium (bitter orange) seed oil: pharmacogenetics, anti-inflammatory, and anti-nociceptive properties. **TIPS**. v. 5 n.3, p.153-164, 2019.

HANAN, A. A. A.; SHAKINAZ, T. E. S. Antioxidant capacity of hesperidin from *Citrus* peel using electron spin resonance and cytotoxic activity against human carcinoma cell lines. **Pharmaceutical Biology**. v. 49, p. 276-282, 2011.

HEGAZI, A. G.; EL HADY, F. K. A. Egyptian propolis: 3. Antioxidant, antimicrobial activities and chemical composition of propolis from reclaimed lands. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 57, n. 3-4, p. 395-402, 2002.

HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R. L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of agricultural and food chemistry**. v. 53, n. 6, p. 1841-1856, 2005.

IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). Produção Agrícola Municipal – PAM. Disponível em: <<https://www.ibge.gov.br/estatisticas/economicas/agricultura-e-pecuaria/9117-producaoagrícola-municipal-culturas-temporarias-e-permanentes.html?=&t=resultados>>. Acesso em: 26 Fev. 2021.

ISTIFLI, E. S.; İLA, H. B. (Eds.). **Cytotoxicity: Definition, identification, and cytotoxic compounds**. Books on Demand. ISBN 978-1-78984-754-3. 2019. 121 p.

KENDER, W. J.; KHAN, I. A. **Citrus breeding: Citrus genetics, breeding and biotechnology**. editora. I. A. Khan. CAB International, Wallingford, UK. 2007. 8 p.

KULKARNI, A.; NIMBALKAR, V. V.; ZAMEERUDDIN, M.; KHAN, H. N.; BUNDEL, S. S.; THOKE, S. Investigation of orange peel ethanolic extract as an anticataract agent. **WPPS**. v. 7, p. 1025-1033. 2018.

- KUROWSKA, E.M.; MANTHEY, J.A. Hypolipidemic effects and absorption of citrus polymethoxylated flavones in hamsters with diet-induced hypercholesterolemia. **Journal of agricultural and food chemistry**. v. 52, n 10, p.2879-2886, 2004.
- LADANYIA, M. **Citrus fruit: biology, technology and evaluation**. 1. ed. San Diego: Editora Academic press, 2018. 593 p.
- LAMINE, M.; RAHALI, F.Z.; HAMMAMI, M.; MLIKI, A. Correlative metabolite profiling approach to understand antioxidant and antimicrobial activities from citrus essential oils. **International Journal of Food Science & Technology**. v. 54, n 8, p.2615-2623, 2019.
- MACHADO, F. L.; KAISER C. R.; COSTA, S. S.; GESTINARI, L.M.; SOARES, A. R. Atividade biológica de metabólitos secundários de algas marinhas do gênero *Laurencia*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 20, p. 441-52, 2010.
- MAGALHÃES, W. L. E.; THÁ, E. L.; LEME, D.M. Método de determinação de concentrações não citotóxicas para avaliação da capacidade protetora da lignina contra danos ao DNA. **Embrapa Florestas-Comunicado Técnico**. n. 427, (INFOTECA-E). 2018.
- MARIUTTI, L. R. B.; BRAGAGNOLO, N. Antioxidantes naturais da família *lamiaceae*; Aplicação em produtos alimentícios. **Brazilian Journal of Food Technology**. v. 10, n. 2, p. 96-103, 2007.
- MARTINS, R. N.; BRENNAN, C. S.; FERNANDO, B.; BRENNAN, M. A.; FULLER, S. J. **Neurodegeneration and Alzheimer's disease: the role of diabetes, genetics, hormones, and lifestyle**. ed. 2019. John Wiley & Sons. 2019. 520 p.
- MAURYA, I. K.; PATHAK, S.; SHARMA, M.; SANWAL, H.; CHAUDHARY, P.; TUPE, S.; DESHPANDE, M.; CHAUHAN, V. S.; PRASAD, R. Antifungal activity of novel synthetic peptides by accumulation of reactive oxygen species (ROS) and disruption of cell wall against *Candida albicans*. **Peptides**. v.32, p. 1732-1740, 2011.
- MELO, C. M. T.; DA COSTA, L. A.; BONNAS, D. S.; CHANG, R. Compostos fenólicos e capacidade antioxidante de pimenta *capsicum chinense* (bode), *capsicum baccatum* variedade *praetermissum* (cumari) e *capsicum frutescens* (malagueta). **Enciclopédia Biosfera**. v. 7, n. 12, p. 1-6, 2011.
- MENG, X.; FU, M.; WANG, S.; CHEN, W.; WANG, J.; ZHANG, N. Naringin ameliorates memory deficits and exerts neuroprotective effects in a mouse model of Alzheimer's disease by regulating multiple metabolic pathways. **Molecular Medicine Reports**. v. 23, n. 5, p.1-13, 2021.
- MORLEY, K. L.; FERGUSON, P. J.; KOROPATNCIK, J. Tangeretin and nobiletin induce G1 cell cycle arrest but not apoptosis in human breast and colon cancer cells. **Cancer Letters**. v. 251, n. 1, p.168–178, 2007.
- MOTA, W. M.; BARROS, M. L.; CUNHA, P. E. L.; SANTANA, M.V.A.; STEVAM, C. S.; LEOPOLDO, P. T. G.; FERNANDES, R. P. M. Avaliação da inibição da acetilcolinesterase por extratos de plantas medicinais. **Revista brasileira de plantas medicinais**. v. 14, p.624-628, 2012.

MOURA, R. B.; AREAS, T. F. Laranja da terra: evidências científicas para diferentes aplicações terapêuticas. **Revista Fitos**. v. 7, n. 2, p. 110-118, 2013.

NETO, J. X. S.; PEREIRA, M. L.; OLIVEIRA, J. T. A.; ROCHA-BEZERRA, L. C. B.; LOPES, T. D. P.; COSTA, H. P. S.; SOUSA, D. O. B.; ROCHA, D. O. B.; GRANGEIRO, T.B.; FREIRE, J. E. C.; MONTEIRO-MOREIRA, A. C. O.; LOBO, M. D. P.; BRILHANTE, R.S.N.; VASCONCELOS, I. M. A chitin-binding protein purified from *Moringa oleifera* seeds presents anticandidal activity by increasing cell membrane permeability and reactive oxygen species production. **Frontiers in Microbiology**. v. 8, p. 1-12, 2017.

NG, K. P.; KUAN, C. S.; KAUR, H.; NA, S. L.; ATIYA, N.; VELAYUTHAN, R. D. *Candida* species epidemiology 2000-2013: a laboratory-based report. **Tropical Medicine & International Health**. v. 20, p. 1447–1453. 2015.

NIDHI, P.; ROLTA, R.; KUMAR, V.; DEV, K.; SOURIRAJAN, A. Synergistic potential of Citrus aurantium L. essential oil with antibiotics against *Candida albicans*. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 262, n.113135, 2020.

NZUZA, S.; NDWANDWE, D. E.; & OWIRA, P. M. Naringin protects against HIV-1 protease inhibitors-induced pancreatic β -cell dysfunction and apoptosis. **Molecular and cellular endocrinology**. v. 437, p. 1-10, 2016.

OLIVEIRA, G. L. S. Determinação da capacidade antioxidante de produtos naturais in vitro pelo método do DPPH•: estudo de revisão. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. v. 17, n. 1, p. 36-44, 2015.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; VYVYAN, J. R. **Introdução à espectroscopia**. 4. ed. Cengage Learning, 2010. 692 p.

PIRANI, J. R.; WANDERLEY, M. G. L.; SHEPHERD, G. J.; GIULIETTI, A. M.; MELHEM, T. S. A.; BITTRICH, V.; KAMEYAMA, C. Rutaceae. **Flora fanerogâmica do Estado de São Paulo**. vol. 2, p. 281-308, 2002.

PUTON, B. M. S.; BERNARDI, J. L.; ORO, C. E. D.; BOMBANA, V. B.; DARIFF, A. P.; BECKER, J.; PAROUL, N.; CANSIAN, R. L. Concentração inibitória mínima e atividade antioxidante do extrato de *Plectranthus ornatus* codd. (*lamiaceae*) extraído por diferentes solvents. **Perspectiva**. v. 42, n. 159, p. 109-118, 2018.

REGENTE, M.; TAVEIRA, G. B.; PINEDO, M.; ELIZALDE, M. M.; TICCHI, A. J.; DIZ, M. S. S.; CARVALHO, A. O.; DE LA CANAL, L.; GOMES, V. M. A sunflower lectin with antifungal properties and putative medical mycology applications. **Current Microbiology**. v. 69, p. 88–95, 2014.

RHEE, I. K.; VAN DE MEENT, M.; INGKANINAN, K.; VERPOORTE, R. Screening for acetylcholinesterase inhibitors from Amaryllidaceae using silica gel thin-layer chromatography in combination with bioactivity staining. **Journal of Chromatography**. v. 915, p. 217-23, 2001.

RIAZ, T.; ABBASI, M.A.; SHAHZADI, T.; KHAN, K. M.; ASHRAF, M.; EJAZ, S.A. Synthesis of Some 4'-O Substituted Derivatives of Natural Naringin and Their Biological

Screening. **Asian Journal of Chemistry**. v. 25, n. 4, p. 1927-1933, 2013.

SAKAGUCHI, R. L.; POWERS, J.M. **Craig's restorative dental materials**. 13. ed. Filadélfia; Editora Elsevier Mosby, 2012. 416 p.

SÁNCHEZ MORENO, C. Review: Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. **Food Science and Technology International**. v. 8, n. 3, p.121-137, 2002.

SILVA, F. F. M. D. **Processos biocatalíticos utilizando a casca da laranja da terra (Citrus aurantium L.)**. 2012. Dissertação (Mestrado em Química (Química Orgânica)). Universidade Federal do Ceará, Ceará, 2012.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 7. ed. Rio de Janeiro, Editora LTC, 2007. 490 p.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMAN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTEZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2007. 1102 p.

Sociedade brasileira de dermatologia (SBD). Doenças e problemas (Mioses). Disponível em: <https://www.sbd.org.br/dermatologia/pele/doencas-e-problemas/mCIose/14/>. Acessado em: 17 de set. de 2021.

SOMANATHAN, K. R.; SUKHDEO, S. V.; MADHUGIRI, L. S.; MYSURU N. S. Efficacy of Citrus maxima fruit segment supplemented paranthas in STZ induced diabetic rats. **Journal of Food Science**. v. 86, n.5, p. 2091-2102, 2021.

SUCUPIRA, N. R.; DA SILVA, A. B.; PEREIRA, G. e DA COSTA, J. N. Métodos para determinação da atividade antioxidante de frutos. **Journal of Health Sciences**. v. 14, n. 4, p. 263-269, 2012.

SUNTAR, I.; KHAN, H.; PATEL, S.; CELANO, R.; RASTRELLI, L. An overview on Citrus aurantium L.: Its functions as food ingredient and therapeutic agente. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**. v. 2018, 2018. 12 p.

TEIXEIRA, A. C. C. **Efeitos Monoterpenóides Limoneno, Carveol e Álcool Perílico no Musculo Liso Vascular**. 2013. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Ciências Fisiológicas) - Universidade Estadual do Ceará, 2013.

USDA/FAS (Foreign Agricultural Services). Citrus: World markets and trade. Disponível em: <https://apps.fas.usda.gov/PSDOnline/CircularDownloader.ashx?year=2021&month=02&commodity=Citr us>. Acessado em: 27 Fev. 2021.

USDA/FAS (Foreign Agricultural Services). Citrus: World markets and trade. Disponível em: <https://apps.fas.usda.gov/PSDOnline/CircularDownloader.ashx?year=2019&month=12&commodity=Citr us>. Acessado em: 26 Fev. 2021.

WANG, K.; JIA, F.; DANG, W.; ZHAO, Y.; ZHU, R.; SUN, M.; QIU, S.; AN, X.; MA, Z.;

ZHU, Y.; YAN, J.; Antifungal effect and action mechanism of antimicrobial peptide polybia-CP. **Journal of Peptide Science**. v. 22, n. 1, p.28-35, 2016.

World Health Organization, (WHO). **Health topCIs (Cancer)**. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>>. Acessado em: 19 Jul. 2021.

World Health Organization, (WHO). **Health topics (Dementia)**. Disponível em: <https://www.who.int/health-topCIs/dementia#tab=tab_1>. Acessado em 30 Jul. 2021.

YU, L.; CHEN, M.; LIU, J.; HUANG, X.; HE, W.; QING, Z.; ZENG, J. Systematics detection and identification of bioactive ingredients from *Citrus aurantium* L. var. amara using HPLC-Q-TOF-MS combined with a screening Method. **Molecules**. v. 25, n. 2, p. 357, 2020.

ZHOU, J.; XIA, L.; ZHANG, Y. Naringin inhibits thyroid cancer cell proliferation and induces cell apoptosis through repressing PI3K/AKT pathway. **Pathology Research and Practice**, v. 215, n. 12, p. 152707, 2019.