

CURSO DE FARMÁCIA

Lecticia Machado

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA *IN VITRO* DO ÓLEO ESSENCIAL DE
BERGAMOTA (*Citrus reticulata* Blanco) E DE SUAS FRAÇÕES**

Santa Cruz do Sul

2016

Lecticia Machado

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA *IN VITRO* DO ÓLEO ESSENCIAL DE BERGAMOTA (*Citrus reticulata* Blanco) E DE SUAS FRAÇÕES

Trabalho de Curso apresentado ao Curso de Farmácia da Universidade de Santa Cruz do Sul, como requisito parcial para obtenção do grau de Bacharel em Farmácia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Chana de Medeiros da Silva.

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Lisianne Brittes Benitez.

Santa Cruz do Sul

2016

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, por toda a paciência e palavras de apoio durante todo o processo de desenvolvimento do trabalho. Agradeço ainda aos demais familiares e amigos por terem tolerado minha ausência em diversas situações ao longo do último ano.

Agradeço à Deus (ou qualquer outra força superior) por guiar meus passos, me iluminar e me manter confiante até o fim.

Agradeço imensamente à minha orientadora Chana de Medeiros da Silva por todos os ensinamentos, pela disponibilidade de tempo dedicada ao trabalho, por não ter medido esforços em me auxiliar em todos os momentos em que precisei, por todas as palavras de apoio que me mantiveram firme na execução da pesquisa e, principalmente, por toda a confiança depositada em mim para a realização deste trabalho.

Agradeço à minha coorientadora Lisianne Brittes Benitez por ter aceitado auxiliar no trabalho e por sanar muitas das minhas dúvidas no decorrer do estudo.

Agradeço aos colegas do curso de Farmácia pelo apoio, em especial aos amigos Caroline Godois, Douglas Elesbão, Jéssica Weizemann e Rafaela Borges que estiveram presentes nos piores e melhores momentos.

Agradeço aos amigos do Bloco 55 que auxiliaram para que tudo saísse conforme esperado, agradeço especialmente à Valéria Leal que fez todo o possível para colaborar com o trabalho. Agradeço ainda aos funcionários e bolsistas dos blocos 20 e 35 que foram de grande importância durante a execução das práticas, mostrando-se sempre dispostos a colaborar.

Agradeço ao pessoal da Farmácia-Escola que gentilmente ofereceram o que estava ao seu alcance para colaborar com o trabalho.

Agradeço ao professor Valeriano e ao pessoal do Laboratório de Micologia Aplicada da Faculdade de Farmácia da UFRGS por terem cedido as cepas fúngicas utilizadas no estudo.

Agradeço à Michele do Laboratório de Cromatografia por ter sido incansável na realização das análises necessárias.

Agradeço aos citricultores que doaram as bergamotas usadas na pesquisa e, agradeço às bolsistas Débora, Karina e Jéssica pelo auxílio na extração do óleo essencial.

RESUMO

A ação antifúngica do óleo essencial de bergamota (*Citrus reticulata*) vem se destacando por terem sido verificados resultados muito promissores para diversas espécies de fungos. A onicomicose é uma doença de etiologia fúngica que afeta as unhas, seu tratamento costuma ser bastante prolongado, em muitos casos é ineficiente e muito oneroso. Dessa forma, o objetivo do presente estudo foi realizar uma avaliação da atividade antifúngica *in vitro* do óleo essencial bruto de *Citrus reticulata* e de suas frações frente à fungos causadores de onicomicoses. O óleo essencial foi extraído por hidrodestilação. O fracionamento do óleo foi realizado por cromatografia em coluna aberta e a análise da composição do óleo essencial e das frações foi feita por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM). Foi realizada a avaliação da atividade antifúngica do óleo essencial e de algumas frações selecionadas (B1, B6 e B11) frente ao fungo dermatófito *Microsporum canis* e às leveduras *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida glabrata* e *Candida tropicalis*. O óleo essencial na concentração de 20 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ provocou inibição de 93,07% do crescimento micelial de *Microsporum canis*. As frações B1, B6 e B11 na concentração de 20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ inibiram o crescimento micelial de *M. canis* em 18,84%, 25,53% e 25,16%, respectivamente. A Concentração Inibitória Mínima (CIM) do óleo essencial bruto para *M. canis* foi de 25 $\mu\text{L.mL}^{-1}$, para frações B6 e B11 a CIM foi de 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e da fração B1 foi $>200 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Os resultados demonstram que o óleo essencial de bergamota apresenta excelente ação antifúngica frente ao fungo causador de onicomicose *Microsporum canis*. Pode-se sugerir que a ação antifúngica frente ao fungo *M. canis* se deu por ação sinérgica dos constituintes do óleo essencial de bergamota, visto que a atividade do óleo bruto foi superior a apresentada por suas frações. Nas concentrações testadas o óleo bruto e suas frações não apresentaram efeito antifúngico frente às leveduras do gênero *Candida*.

Palavras-chave: *Citrus reticulata*, óleo essencial, atividade antifúngica, onicomicose.

ABSTRACT

The antifungal activity of the essential oil of bergamot (*Citrus reticulata*) has stood out for having been checked very promising results for several species of fungi. Onychomycosis is a fungal etiology of disease that affects the nails, their treatment is often very long in many cases is very costly and inefficient. Thus, the objective of this study was to evaluate the antifungal activity *in vitro* of the crude essential oil of *Citrus reticulata* and its fractions forward to fungi that cause onychomycosis. The essential oil was extracted by hydrodistillation. The fractionation of the oil was performed by open column chromatography and analysis of the composition of the oil and fractions was performed by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). It performed the evaluation of the antifungal activity of the essential oil and some selected fractions (B1, B6 and B11) against the dermatophyte *Microsporum canis* fungus and the yeast *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida glabrata* and *Candida tropicalis*. The essential oil in the concentration of 20 $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ caused inhibition of 93,07% of mycelial growth of *Microsporum canis*. The fractions B1, B6 and B11 in a concentration of 20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ inhibited mycelial growth of *M. canis* 18,84%, 25,53% and 25,16%, respectively. The Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of essential crude oil for *M. canis* was 25 $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ for fractions B6 and B11 MIC was 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ and fraction B1 was $>200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. The results demonstrate that the essential oil of bergamot has excellent antifungal action against fungi causing onychomycosis *Microsporum canis*. It can be inferred that the action antifungal front of the kennels *M. canis* fungus given by synergic action of the constituents of the essential oil of bergamot, since crude oil activity was over by its fractions. At the concentrations tested the crude oil and its fractions showed no effect antifungal front of the yeast of the genus *Candida*.

Keywords: *Citrus reticulata*, essential oil, antifungal activity, onychomycosis.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	6
2 OBJETIVOS	8
2.1 Objetivo geral	8
2.2 Objetivos específicos	8
3 REFERENCIAL TEÓRICO	9
3.1 Gênero <i>Citrus</i>	9
3.2 <i>Citrus reticulata</i> Blanco	10
3.2.1 Dados botânicos e fenológicos	10
3.2.2 Atividades biológicas e farmacológicas	15
3.2.3 Óleo essencial	17
3.2.4 Métodos de extração de óleos essenciais	28
3.3 Onicomicose	30
3.3.1 Microrganismos na Onicomicose	32
4 MATERIAIS E MÉTODOS	34
4.1 Tipo de estudo	34
4.2 Local de estudo	34
4.3 Material Vegetal	34
4.4 Extração do óleo essencial	34
4.5 Isolamento dos compostos majoritários do óleo essencial	35
4.6 Análise da composição do óleo essencial e de suas frações	35
4.7 Ensaio <i>in vitro</i> da atividade antifúngica	36
4.7.1 Microrganismos indicadores	36
4.7.2 Manutenção dos microrganismos	36
4.7.3 Atividade antifúngica do óleo essencial e de suas frações	37
4.7.4 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)	38
5 ARTIGO	40
6 CONCLUSÃO	61
REFERÊNCIAS	62
ANEXOS	72
ANEXO A- Normas de publicação para a Revista Brasileira de Plantas Mediciniais	72

1 INTRODUÇÃO

O uso de plantas para o tratamento e prevenção de doenças é uma prática considerada milenar. Com o passar dos anos, fez-se necessário a realização de pesquisas aprofundadas em relação às atividades terapêuticas de uma gama de materiais vegetais, colaborando assim, para o descobrimento de uma variedade de substâncias ativas, as quais foram usadas no desenvolvimento de muitos fármacos (SIMÕES et al., 2002; TÔRRES et al., 2005; SOUSA et al., 2015). Apesar do avanço da ciência na busca pela melhor compreensão das atividades exercidas pelas plantas em diversas patologias, ainda há espaço para mais estudos, pois muitas atividades ainda não estão bem esclarecidas. Além disso, há uma variedade imensa de vegetais que ainda não foram estudados (BIASI; DESCHAMPS, 2009; FADLI et al., 2012).

Dentre as plantas com variadas atividades biológicas e farmacológicas, pode-se citar as espécies do gênero *Citrus*, o qual inclui espécies como *Citrus sinensis*, *Citrus reticulata*, *Citrus limon* e *Citrus aurantium* (KOLLER, 1994). Além de serem importantes no âmbito nutricional, essas espécies vêm sendo estudadas por suas aplicações no tratamento da esquistossomose, ação antimicrobiana, atividade antioxidante, efeito contra insônia e epilepsia. Ainda que tenham sido observados bons resultados, muitos desses estudos ainda se encontram em fase inicial e mais pesquisas se fazem necessárias para elucidá-los (CHOI et al., 2000; HAMED; HETTA, 2005; VIUDA-MARTOS et al., 2008; TOUNSI et al., 2011).

No Brasil, a espécie *Citrus reticulata* Blanco é conhecida popularmente como bergamota (KOLLER, 1994). Está entre as espécies vegetais incluídas em variados estudos que visam a identificação de potenciais alternativas farmacológicas para tratamento e prevenção de diversas doenças. A bergamota é reconhecida por apresentar substâncias com prováveis ações farmacológicas em seu óleo, extrato e suco, sendo estes largamente estudados em diversas pesquisas. *C. reticulata* já foi relacionada com efeito antioxidante, inibitório da fibrose pulmonar, ação antifúngica, antibacteriana, antiviral, anticancerígena e anti-inflamatória (HO; LIN, 2008; CHUTIA et al., 2009; DU; CHEN, 2010; ESPINA et al., 2011; ADEMOSUN; OBOH, 2012; ZHOU et al., 2013; XU et al., 2014; ZHANG et al., 2014).

Um dos principais produtos obtidos a partir da bergamota é o óleo essencial, o qual é extraído de suas cascas e possui importante destaque socioeconômico (BIZZO; HOVELL; REZENDE, 2009). O óleo essencial de *C. reticulata* é levantado de forma

bastante ampla em diversas pesquisas como opção para tratamento de algumas patologias. O óleo já foi estudado por sua atividade antidiabética, antioxidante, antibacteriana e antifúngica, tendo apresentado excelentes resultados e, dessa forma, instigado a continuação das investigações (SHAHZAD et al., 2009; SULTANA; ALI; PANDA, 2012; MEHMOOD et al., 2013).

A ação antifúngica do óleo essencial de bergamota tem recebido destaque em alguns trabalhos publicados, por terem sido verificados resultados muito promissores para uso do óleo tanto em alimentos como conservante, quanto no tratamento de doenças de etiologia fúngica (VIUDA-MARTOS et al., 2008; SHAHZAD et al., 2009). Sabe-se que o óleo é rico em compostos terpenóides do tipo monoterpenos e sesquiterpenos e o interesse na pesquisa desse óleo essencial está, em partes, em elucidar os mecanismos envolvidos em sua ação antifúngica, buscando esclarecer se a atividade se dá pela presença de algum constituinte químico em especial, ou se a ação conjunta dos componentes do óleo é que desencadeia tal efeito (BIASI; DESCHAMPS, 2009; CHUTIA et al., 2009; TAO; JIA; ZHOU, 2014).

A onicomicose é uma doença que afeta as unhas, é provocada por fungos dermatófitos, não dermatófitos ou leveduras, e é bastante comum na população, em especial no sexo feminino (ELEWSKI, 1998; MARTINS et al., 2007). O tratamento para tal patologia costuma ser demasiadamente prolongado e, além disso, por diversas vezes é ineficiente e bastante oneroso. Assim, a busca por uma nova alternativa de tratamento para a onicomicose vem sendo muito estudada (ARENAS; RUIZ-ESMENJAUD, 2004; SIU et al., 2013; ROSSO, 2014). O presente estudo teve como objetivo realizar uma avaliação da atividade antifúngica *in vitro* do óleo essencial bruto de *Citrus reticulata* e de suas frações frente à espécies fúngicas causadoras de onicomicoses.

REFERÊNCIAS

- ABRANTES, Maiza Rocha de et al. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre leveduras *Candida não albicans*. *Revista Brasileira de Farmácia*, v. 94, n. 3, p. 227 – 233, 2013.
- ADEMOSUN, A. O.; OBOH, G. Inhibition of Acetylcholinesterase Activity and Fe²⁺-Induced Lipid Peroxidation in Rat Brain In Vitro by Some *Citrus* Fruit Juices. *Journal of Medicinal Food*, v. 15, n. 5, p. 428–434, 2012.
- ALMEIDA, Livia Maria Martins de et al. Resposta *in vitro* de fungos agentes de micoses cutâneas frente aos antifúngicos sistêmicos mais utilizados na dermatologia. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, v. 84, n. 3, p. 249-55, 2009.
- AMARAL, Flavia M. M. et al. Plants and chemical constituents with giardicidal activity. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 16, s. n., p. 696-720, 2006.
- ANDRADE, Milene Aparecida et al. Óleos essenciais de *Cymbopogon nardus*, *Cinnamomum zeylanicum* e *Zingiber officinale*: composição, atividades antioxidante e antibacteriana. *Revista Ciência Agronômica*, v. 43, n. 2, p. 399-408, 2012.
- ARAÚJO, J. G. et al. Ocorrência de onicomicose em pacientes atendidos em consultórios dermatológicos da cidade do Rio de Janeiro, Brasil. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, v. 78, n. 3, p. 299-308, 2003.
- ARAÚJO, Pedro. **Análise do padrão de expressão dos genes da família MADS-BOX durante o desenvolvimento do fruto de *Citrus sinensis***. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal- Mestrado) -Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2010.
- ARENAS, R.; RUIZ-ESMENJAUD, J. Onicomicose na infância: uma perspectiva atual com ênfase na revisão do tratamento. *Anais brasileiros de Dermatologia*, v. 79, n. 2, p. 225-232, 2004.
- ARRUDA, Thúlio A. et al. Preliminary study of the antimicrobial activity of *Mentha x villosa* Hudson essential oil, rotundifolone and its analogues. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 16, n. 3, p. 307-311, 2006.
- AVNER, S. et al. Two novel itraconazole pulse therapies for onychomycosis: a 2-year follow-up. *The Journal of Dermatological Treatment*, v.7, s. n., p. 117-120, 2006.
- AZAMBUJA, C. V. A et al. Onychomycosis: clinical, mycological and in vitro susceptibility testing of isolates of *Trichophyton rubrum*. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, v. 89, n. 4, p. 581-6, 2014.
- BALLESTÉ, R.; MOUSQUÉS, N.; GEZUELE, E. Onicomicosis. Revisión del tema. *Revista Médica del Uruguay*, v. 19, n. 2, p. 93-106, 2003.

BIASI, Luiz Antonio; DESCHAMPS, Cícero. **Plantas aromáticas: do cultivo à produção de óleo essencial**. Curitiba: Layer Graf, 2009.

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

BORGES, Lílian Estrela. **Caracterização Estrutural da Associação Epifítica e Endofítica entre Microrganismos e Plantas em um Ambiente Agrícola Tropical**. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia-Mestrado), -Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campo dos Goytacazes, 2006.

BURT, Sara. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International Journal of Food Microbiology*, v. 94, s. n., p. 223-253, 2004.

BURZYKOWSKI, T. et al. High prevalence of foot diseases in Europe: results of the Achilles Project. *Mycoses*, v. 46, n. 11-12, p. 496-505, 2003.

BUSATO, N. V. Estratégias de modelagem da extração de óleos essenciais por hidrodestilação e destilação a vapor. *Ciência Rural*, v. 44, n. 9, p. 1574-1582, 2014.

CAMBUIM, Idalina Inês Fonsêca et al. Avaliação clínica e micológica de onicomicose em pacientes brasileiros com HIV/AIDS. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 44, n. 1, p. 40-42, 2011.

CARSON, C. F.; MEE, B. J.; RILEY, T. V. Mechanism of Action of *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) Oil on *Staphylococcus aureus* Determined by Time-Kill, Lysis, Leakage, and Salt Tolerance Assays and Electron Microscopy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 46, n. 6, p. 1914-1920, 2002.

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

CASSEL, E. et al. Steam distillation modeling for essential oil extraction process. *Industrial Crops and Products*, v.29, s. n., p.171-176, 2009.

CHIACCHIO, Nilton Di et al. An observational and descriptive study of the epidemiology of and therapeutic approach to onychomycosis in dermatology offices in Brazil. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, v. 88, n. 1, Supl. 1, p. 1-12, 2013.

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

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

CLEMENTE, Edmar et al. Características da Farinha de Resíduos do Processamento de Laranja. *Revista Ciências Exatas e Naturais*, v.14, n. 2, p. 257-269, 2012.

COELHO, Ruimário Inácio et al. Caracterização morfológica da planta, frutos, sementes e plântulas de tangerina (*Citrus Reticulata* L.) de ocorrência natural no sul do estado do Espírito Santo. *Revista Brasileira de Sementes*, v. 23, n. 2, p. 294-301, 2001.

CRUZ, Maria do Céu Monteiro da et al. Avaliação do potencial hídrico foliar, umidade do solo e temperatura do ar no período pré- florescimento dos citros. *Ciência e Agrotecnologia*, v. 31, n. 5, p. 1291-1296, 2007.

CTENAS, Maria Luiza de Brito; CTENAS, André Constantin; QUAST, Dietrich. **Frutas das terras brasileiras**. São Paulo: C², 2000.

DEGENHARDT, J. et al. Attracting friends to feast on foes: engineering terpene emission to make crop plants more attractive to herbivore enemies. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 14, s. n., p. 169-176, 2003.

DETONI, Alessandra Maria et al. Influência do sol nas características físicas e químicas da tangerina 'Ponkan' cultivada no Oeste do Paraná. *Ciência e Agrotecnologia*, v. 33, n. 2, p. 624-628, 2009.

DOLABELA, Maria Fâni et al. In vitro antiplasmodial activity of extract and constituents from *Esenbeckia febrifuga*, a plant traditionally used to treat malaria in the Brazilian Amazon. *Phytomedicine*, v. 15, s. n., p. 367–372, 2008.

DU, Q.; CHEN, H. The methoxyflavones in *Citrus reticulata* Blanco cv. Ponkan and their antiproliferative activity against cancer cells. *Food Chemistry*, v. 119, s. n., p. 567-572, 2010.

ELEWSKI, Boni E. Onychomycosis. Pathogenesis, diagnosis and management. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 11, n. 3, p. 415-429, 1998.

ESPINA, Laura et al. Chemical composition of commercial citrus fruit essential oils and evaluation of their antimicrobial activity acting alone or in combined processes. *Food Control*, v. 22, s. n., p. 896-902, 2011.

ESPOSTI, M. D. D.; SIQUEIRA, D. L.; CECON, P. R. Crescimento de frutos da tangerineira 'poncã' (*Citrus reticulata* Blanco). *Revista Brasileira de Fruticultura*, v. 30, n. 3, p. 657-661, 2008.

FADLI, Mariam et al. Antibacterial activity of *Thymus maroccanus* and *Thymus broussonetii* essential oils against nosocomial infection – bacteria and their synergistic potential with antibiotics. *Phytomedicine*, v. 19, s. n., p. 464– 471, 2012.

FERESIN, G. E. et al. Antimicrobial activity of plants used in traditional medicine of San Juan province, Argentina. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 78, n. 1, p. 103-107, 2001.

FERNANDES, J. B. et al. Extrações de óleos de sementes de citros e suas atividades sobre a formiga cortadeira *Atta sexdens* e seu fungo simbionte. *Química Nova*, v. 25, n. 6b, p. 1091-1095, 2002.

FIGUEIREDO, Isis M. et al. Synthesis and antiproliferative activity of novel limonene derivatives with a substituted thiourea moiety. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 17, n. 5, p. 954-960, 2006.

FILHO, José M. Barbosa et al. Natural products inhibitors of the enzyme acetylcholinesterase. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 16, n. 2, p. 258-285, 2006.

FISHER, K.; PHILLIPS, C. A. The effect of lemon, orange and bergamot essential oils and their components on the survival of *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* O157, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus* in vitro and in food systems. *Journal of Applied Microbiology*, v. 101, s. n., p. 1232-1240, 2006.

GHANNOUM, M. et al. Activity of TDT 067 (Terbinafine in Transfersome) against Agents of Onychomycosis, as Determined by Minimum Inhibitory and Fungicidal Concentrations. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 49, n. 5, p. 1716–1720, 2011.

GHANNOUM, M.; ISHAM, N.; CATALANO, V. A second look at efficacy criteria for onychomycosis: clinical and mycological cure. *British Journal of Dermatology*, v. 170, s. n., p. 182–187, 2014.

GLAMOCLIJA, Jasmina et al. Chemical characterization of *Lippia Alba* essential oil: An alternative to Control green molds. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 42, s. n., p.1537-1546, 2011.

GROSSER, J. W.; OLLITRAULT, P.; OLIVARES-FUSTER, O. Somatic hybridization in citrus: an effective tool to facilitate variety improvement. *In vitro Cellular & Developmental Biology*, v. 36, s. n., p. 434-449, 2000.

HAMED, M. A.; HETTA, M. H. Efficacy of *Citrus reticulata* and Mirazid in treatment of *Schistosoma mansoni*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 100, n. 7, p. 771-778, 2005.

HO, S. C.; LIN, C. C. Investigation of Heat Treating Conditions for Enhancing the Anti-Inflammatory Activity of Citrus Fruit (*Citrus reticulata*) Peels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 56, n. 17, p. 7976-7982, 2008.

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

JASSIM, S. A. A.; NAJI, M. A. A. Review: Novel antiviral agents: a medicinal plant preservative. *Journal of Applied Microbiology*, v. 95, n.3, p. 412-427, 2003.

JAYAPRAKASHA, G. K. et al. Limonoids from *Citrus reticulata* and their moult inhibiting activity in mosquito *Culex quinquefasciatus* larvae. *Phytochemistry*, v. 44, n. 5, p. 843-846, 1997.

JOHNSON, O. O.; AYOOLA, G. A.; ADENIPEKUN, T. Antimicrobial Activity and the Chemical Composition of the Volatile Oil Blend from *Allium sativum* (Garlic Clove) and *Citrus reticulata* (Tangerine Fruit). *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research*, v. 5, n. 4, p.187-193, 2013.

JOLY, A. B. **Botânica - introdução à taxonomia vegetal**. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 1985.

KAWAHATA, Ichiro et al. Potent activity of nobiletin-rich *Citrus reticulata* peel extract to facilitate cAMP/PKA/ERK/CREB signaling associated with learning and memory in cultured hippocampal neurons: identification of the substances responsible for the pharmacological action. *Journal of Neural Transmission*, v. 120, s. n., p. 1397–1409, 2013.

KENDER, Walter J. *Citrus*. *HortScience*, v. 38, n. 5, p. 1043-1047, 2003.

KHAN, Amber et al. *Ocimum sanctum* essential oil and its active principles exert their antifungal activity by disrupting ergosterol biosynthesis and membrane integrity. *Research in Microbiology*, v. 161, s. n., p. 816-823, 2010.

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

LANCIOTTI, R. et al. Use of natural aroma compounds to improve shelflife and safety of minimally processed fruits. *Trends in Food Science & Technology*, v. 15, s. n., p. 201-208, 2004.

LELIS, F. M. V.; SIQUEIRA, D. L. de; SANTOS, D. dos. Florescimento de tangerineiras 'Ponkan' (*Citrus reticulata* Blanco) submetidas a diferentes períodos de temperatura invernal. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v. 30, n. 3, p. 818-821, 2008.

LI, Yang et al. In vitro anti-*Helicobacter pylori* action of 30 Chinese herbal medicines used to treat ulcer diseases. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 98, s. n., p. 329–333, 2005.

LIAPI, C. et al. Antinociceptive properties of 1,8-Cineole and beta-pinene, from the essential oil of *Eucalyptus camaldulensis* leaves, in rodents. *Planta Medica*, v. 73, n. 12, p. 1247-54, 2007.

LIU, Li et al. Structure–Activity Relationship of Citrus Polymethoxylated Flavones and Their Inhibitory Effects on *Aspergillus niger*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 60, s. n., p. 4336–4341, 2012.

LÓPEZ, M. A.; STASHENKO, E. E.; FUENTES, J. L. Chemical composition and antigenotoxic properties of *Lippia alba* essential oils. *Genetics and Molecular Biology*, v. 34, n. 3, p. 479-488, 2011.

LORENZETTI, B. B. et al. Myrcene mimics the peripheral analgesic activity of lemongrass tea. *Journal Ethnopharmacology*, v. 34, s. n., p. 43-48, 1991.

LOTA, Marie-Laure et al. Chemical variability of peel and leaf essential oils of mandarins from *Citrus reticulata* Blanco. *Biochemical Systematics and Ecology*, v. 28, s. n., p. 61-78, 2000.

LU, Hai-Yan et al. Washing effects of limonene on pesticide residues in green peppers. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 93, s. n., p. 2917–2921, 2013.

MAFEZOLI, Jair et al. In vitro activity of Rutaceae species against the trypomastigote form of *Trypanosoma cruzi*. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 73, s. n., p. 335–340, 2000.

MAK, N. K. Isolation of anti-leukemia compounds from *Citrus reticulata*. *Life Sciences*, v. 58, n. 15, p. 1265-1276, 1996.

MARTINS, Ana Paula et al. Requisitos de qualidade em óleos essenciais: a importância das monografias da Farmacopeia Europeia e das normas ISO. *Revista de Fitoterapia*, v. 11, n. 2, p. 133-145, 2011.

MARTINS, Edna Alves et al. Onicomicose: estudo clínico, epidemiológico e micológico no município de São José do Rio Preto. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 40, n. 5, p. 596-598, 2007.

MEHMOOD, Ferhat et al. A comparative study of *in vitro* total antioxidant, *in vivo* antidiabetic and antimicrobial activities of essential oils from leaves and rind of *Citrus reticulata* Blanco cv. Murcot (Honey). *Pakistan Journal of Botany*, v. 45, n. 5, p. 1571-1576, 2013.

MINH TU, N. T. et al. Volatile constituents of Vietnamese pummelo, orange, tangerine and lime peel oils. *Flavour and Fragrance Journal*, v. 17, s. n., p. 169-174, 2002.

MIRON, Diogo et al. Antifungal activity and mechanism of action of monoterpenes against dermatophytes and yeasts. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 24, s. n., p.660-667, 2014.

MORAIS, J. W.; FIGUEIRA, J. A. M.; SAMPAIO, P. de T. B. Eficiência de Inseticidas no Controle de Pragas em Sementes e Mudas de Pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke), em Viveiros, Manaus, Amazonas. *Acta Amazonica*, v. 39, n. 3, p. 533 – 538, 2009.

MOSHI, M. J.; KAGASHE, G. A. A.; MBWAMBO, Z. H. Plants used to treat epilepsy by Tanzanian traditional healers. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 97, s. n., p. 327–336, 2005.

NANNAPANENI, R. et al. *Campylobacter* and *Arcobacter* species sensitivity to commercial orange oil fractions. *International Journal of Food Microbiology*, v. 129, n. 1, p. 43-49, 2009.

NJOROGE, S. M. et al. Volatile constituents of mandarin *Citrus reticulata* Blanco peel oil from Burundi. *Journal of Essential Oil Research*, v. 18, s. n., p. 659-662, 2006.

OLIVEIRA, Roberto Pedroso de et al. Melhoramento genético de plantas cítricas. *Informe Agropecuário*, v. 35, n. 281, p. 22-29, 2014.

OSÓRIO, G. T.; OLIVEIRA, B. S.; DI PIERO, R. M. Efeito de agentes fumigantes sobre o bolor azul e o mofo cinzento em frutos de maçã. *Tropical Plant Pathology*, v. 38, n. 1, p. 063-067, 2013.

PIO, R. M. et al. Características da variedade Fremont quando comparadas com as das tangerinas 'Ponkan' e 'Clementina Nules'. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v. 28, n. 2, p. 36-38, 2006.

PIO, R. M.; MINAMI, K.; FIGUEIREDO, J. O. de. Características do fruto da variedade Span Americana (*Citrus reticulata* Blanco): uma tangerina do tipo 'Poncã' de maturação precoce. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v. 23, n. 2, p. 325-329, 2001.

PIRES, T. C.; PICCOLI, R. H. Efeito inibitório de óleos essenciais do gênero *Citrus* sobre o crescimento de micro-organismos. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, v. 71, n. 2, p. 378-385, 2012.

PONCE, A. G.; VALLE, C. E. del; ROURA, S. I. Natural essential oils as reducing agents of peroxidase activity in leafy vegetables. *LWT-Food Science and Technology*, v. 37, n. 2, p. 199-204, 2004.

RIYAZI, A. et al. The effect of the volatile oil from ginger rhizomes (*Zingiber officinale*), its fractions and isolated compounds on the 5-HT₃ receptor complex and the serotonergic system of the rat ileum. *Planta Medica*, v. 73, n. 4, p. 355-362, 2007.

ROSSO, James Q. Del. The Role of Topical Antifungal Therapy for Onychomycosis and the Emergence of Newer Agents. *The Journal of Clinical and Aesthetic Dermatology*, v. 7, n. 7, p. 10-18, 2014.

SANTOS, Aline Alves Oliveira et al. Elaboração de biscoitos de chocolate com substituição parcial da farinha de trigo por polvilho azedo e farinha de albedo de laranja. *Ciência Rural*, v.41, n.3, p.531-536, 2011.

SCHIEBER, A.; STINTZING, F. C.; CARLE, R. By-products of plant food processing as a source of functional compounds- recent developments. *Trends in Food Science & Technology*, v. 12, s. n., p. 401-413, 2001.

SHAHZAD, Khurram et al. Evaluation of antibacterial, antifungal and antioxidant activity of essential oil of *Citrus reticulata* fruit (Tangerine fruit peel). *Pharmacologyonline*, v. 3, s. n., p. 614-622, 2009.

SHEMER, A. et al. Onychomycosis: Rationalization of Topical Treatment. *Israel Medical Association Journal*, v. 10, s. n., p. 415-416, 2008.

SILVA, Chana Medeiros da. **Sesquiterpenóides de *Senecio bonariensis* Hook. Et arrn.** Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas-Mestrado) –Universidade Federal de Santa Maria Santa Maria, Santa Maria, 2006.

SILVA, Silvestre; TASSARA, Helena. **Frutas Brasil frutas.** São Paulo: Empresa das Artes, 2005.

SIMÕES, Cláudia Maria Oliveira et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** 4. ed. Porto Alegre: Ed. da UFSC, 2002.

SINGH, Priyanka et al. Effect of *Citrus reticulata* and *Cymbopogon citratus* Essential Oils on *Aspergillus flavus* Growth and Aflatoxin Production on *Asparagus racemosus*. *Mycopathologia*, v. 170, s. n., p. 195-202, 2010a.

_____. Chemical profile, antifungal, antiaflatoxic and antioxidant activity of *Citrus maxima* Burm. and *Citrus sinensis* (L.) Osbeck essential oils and their cyclic monoterpene, DL-limonene. *Food and Chemical Toxicology*, v. 48, s. n., p. 1734-1740, 2010b.

SIU, W. J. J. et al. Comparison of *In Vitro* Antifungal Activities of Efinaconazole and Currently Available Antifungal Agents against a Variety of Pathogenic Fungi Associated with Onychomycosis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 57, n. 4, p. 1610–1616, 2013.

SKANDAMIS, P. et al. Inhibition of oregano essential oil and EDTA on *Escherichia coli* O157:H7. *Italian Journal of Food Science*, v. 13, n. 1, p. 65-75, 2001.

SOKOVIC, M.; GRIENSVEN, L. J. L. D. Antimicrobial activity of essential oils and their components against the three major pathogens of cultivated button mushroom *Agaricus bisporus*. *European Journal of Plant Pathology*, v. 116, s. n., p. 211–224, 2006.

SOUSA, D. G. et al. Essential oil of *Lippia alba* and its main constituent citral block the excitability of rat sciatic nerves. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 48, n. 8, p. 697-702, 2015.

SOUZA, Eliane Alves de Freitas et al. Frequência de onicomicoses por leveduras em Maringá, Paraná, Brasil. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, v. 82, n. 2, p. 151-6, 2007.

SULTANA, H. S.; ALI, M.; PANDA, B. P. Influence of volatile constituents of fruit peels of *Citrus reticulata* Blanco on clinically isolated pathogenic microorganisms under *in vitro*. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, v. 2, n. 3, p. 1299-1302, 2012.

SUN, J. D-Limonene: safety and clinical applications. *Alternative Medicine Review*, v. 12, n. 3, p. 259-264, 2007.

TAKEHARA, K. et al. Factors associated with presence and severity of toenail onychomycosis in patients with diabetes: A cross-sectional study. *International Journal of Nursing Studies*, v. 48, s. n., p. 1101–1108, 2011.

TAO, N.; JIA, L.; ZHOU, H. Anti-fungal activity of *Citrus reticulata* Blanco essential oil against *Penicillium italicum* and *Penicillium digitatum*. *Food Chemistry*, v. 153, s. n., p. 265-271, China, 2014.

TEPE, B. et al. Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oils and various extracts of *Salvia tomentosa* Miller (Lamiaceae). *Food Chemistry*, v. 90, s. n., p. 333-340, 2005.

TÔRRES, A. R. et al. Estudo sobre o uso de plantas medicinais em crianças hospitalizadas da cidade de João Pessoa: riscos e benefícios. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 15, n. 4, p. 373-380, 2005.

TOUNSI, Moufida Saidani et al. Changes in Lipid Composition and Antioxidant Capacity of Bitter Orange (*Citrus aurantium*. L) and Mandarin (*Citrus reticulata*. Blanco) Oilseeds on Different Stages of Maturity. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v. 88, n. 961, p. 961-966, 2011.

UMLAUF, D. et al. Biosynthesis of the irregular monoterpene artemisia ketone, the sesquiterpene germacrene D and other isoprenoids in *Tanacetum vulgare* L. (Asteraceae). *Phytochemistry*, v. 65, s. n., p. 2463-2470, 2004.

VASCONCELLOS, Cidia et al. Identification of fungi species in the onychomycosis of institutionalized elderly. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, v. 88, n. 3, p. 377-80, 2013.

VÁZQUEZ, Beatriz I. et al., Inhibitory effects of eugenol and thymol on *Penicillium citrinum* strains in culture media and cheese. *International Journal of Food Microbiology*, v. 67, s. n., p. 157-163, 2001.

VENDRUSCOLO, G. S.; MENTZ, L. A. Levantamento etnobotânico das plantas utilizadas como medicinais por moradores do bairro Ponta Grossa, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. *Iheringia*, v. 61, n. 1-2, p. 83-103, 2006.

VENTUROSOS, L. R. et al. Inibição do crescimento *in vitro* de fitopatógenos sob diferentes concentrações de extratos de plantas medicinais. *Arquivos do Instituto Biológico*, v. 78, n. 1, p. 89-95, 2011.

VIUDA-MARTOS, M. et al. Antibacterial activity of lemon (*Citrus lemon* L.), mandarin (*Citrus reticulata* L.), grapefruit (*Citrus paradisi* L.) and orange (*Citrus sinensis* L.) essential oils. *Journal of Food Safety*, v. 28, s. n., p. 567-576, 2007.

_____. Antifungal activity of lemon (*Citrus lemon* L.), mandarin (*Citrus reticulata* L.), grapefruit (*Citrus paradisi* L.) and orange (*Citrus sinensis* L.) essential oils. *Food Control*, v. 19, s. n., p. 1130-1138, 2008.

WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas**. 2nd ed. Berlin: Springer, 1996.

WU, Ting et al. Antifungal action and inhibitory mechanism of polymethoxylated flavones from *Citrus reticulata* Blanco peel against *Aspergillus niger*. *Food control*, v. 35, s. n., p. 354-359, 2014.

XU, Jiao-Jiao et al. Antiviral Activity of Polymethoxylated Flavones from “Guangchenpi”, the Edible and Medicinal Pericarps of *Citrus reticulata* ‘Chachi’. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 62, s. n., p. 2182–2189, 2014.

ZANARDI, Daniela et al. Avaliação dos métodos diagnósticos para onicomicose. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, v. 83, n. 2, p.119-24, 2008.

ZHANG, Y. et al. Phenolic compositions and antioxidant capacities of Chinese wild mandarin (*Citrus reticulata* Blanco) fruits. *Food Chemistry*, v. 145, s. n., p. 674-680, 2014.

ZHOU, X. M. et al. Inhibitory effects of alkaline extract of *Citrus reticulata* on pulmonary fibrosis. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 146, s. n., p. 372-378, 2013.