

ESTUDO QUÍMICO COMPARATIVO DO OLÉO ESSENCIAL DE FOLHAS DE *CITRUS* sp. SOB EFEITO SAZONAL E ESTRESSE BIOTICO

Adrielle M. C. De Mesquita¹; André L. X. Do Nascimento²; Joseilson A. De Paiva³

¹Universidade Federal do Norte do Tocantins (UFNT) adrielle.mesquita@ufnt.edu.br

²Universidade Federal do Norte do Tocantins (UFNT)

³Universidade Federal do Norte do Tocantins (UFNT)

Palavras-Chave: Defesa vegetal, Metabólitos secundários, GC/MS.

Introdução

As plantas sintetizam uma diversidade notável de compostos, tradicionalmente agrupados em metabólitos primários e secundários. Os metabólitos primários são produzidos por todas as plantas e participam diretamente do crescimento e do desenvolvimento, abrangendo açúcares, aminoácidos, ácidos graxos, lipídios e nucleotídeos, bem como macromoléculas derivadas, como proteínas, polissacarídeos, membranas, DNA e RNA (Taiz, Zeiger e Møller, 2017). Em contraste, os metabólitos secundários apresentam forte especificidade de espécie e são distribuídos majoritariamente em três classes: terpenos, compostos fenólicos e alcaloides. Dentro desse conjunto, os óleos essenciais se destacam por serem misturas complexas formadas principalmente por compostos terpênicos — como monoterpenos, sesquiterpenos e diterpenos — além de fenilpropanoides (Solórzano-Santos e Miranda-Novales, 2012).

Biossintetizados e secretados por tricomas glandulares e outros tecidos secretores especializados, os óleos essenciais ficam difundidos na superfície de órgãos vegetais, especialmente flores e folhas. Sua composição química é intrinsecamente complexa e variável, tanto entre espécies quanto entre diferentes órgãos de um mesmo indivíduo, refletindo a interação entre o genoma e fatores externos, como localização geográfica, clima, tipo de solo, estado nutricional, manejo com fertilizantes e estresses ao longo do crescimento (Miranda et al., 2016; Estevam, 2017). Em termos composicionais, esses óleos podem conter de 10 a 60 constituintes principais, geralmente organizados em duas séries de acordo com a origem biossintética: a série aromática, composta por fenilpropanoides, e a série terpênic (Bakkali et al., 2008).

O interesse industrial por óleos essenciais tem crescido, impulsionado pela substituição de aditivos sintéticos por alternativas naturais nos setores de alimentos e bebidas. Entre os produtos mais comercializados, o óleo essencial de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck ocupa posição de destaque, dada sua ampla aplicação em diversos segmentos industriais (Bizzo e Rezende, 2022). O gênero *Citrus*, nativo do sudeste asiático, distribui-se amplamente por regiões tropicais e subtropicais; no Brasil, as espécies nativas concentram-se no Cerrado e na Mata Atlântica (Passos et al., 2013). Em particular, os cerrados goiano e tocantinense abrigam um mosaico de *Citrus* nativos ainda pouco explorados quanto às suas propriedades e aplicações potenciais, com grande variabilidade morfológica e genética que engloba frutos amplamente conhecidos, como laranjas, limões e limas (Oliveira, 2020).

Caracterizam-se os óleos essenciais como líquidos voláteis, lipofílicos e odoríferos, compostos majoritariamente por terpenos oriundos do metabolismo secundário vegetal. Suas propriedades físico-químicas, produção e rendimento são influenciadas por fatores genéticos e ambientais, bem como por parâmetros tecnológicos, incluindo método e tempo de seleção. Diante desse contexto, o presente trabalho teve por objetivo observar variações sazonais nos constituintes do óleo essencial de folhas saudáveis e com infecção fúngica de uma espécie de limão (*Citrus* sp.).

O objetivo do presente trabalho é coletar as folhas de espécie de *Citrus* sp, sendo elas saudáveis e fungadas, obter o óleo essencial através do procedimento de destilação por arraste

a vapor de água em sistema Clevenger, analisár e caracterizar o OE obtido por meio de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC/MS), verificar possível variação sazonal dos constituintes do óleo obtido das folhas saudáveis e fungadas

Material e Métodos

Material vegetal

A parte experimental foi conduzida nos Laboratórios de Química Orgânica e no Laboratório Central de Analítica da UFNT (campus de Ciências Integradas, Araguaína-TO), entre abril e outubro de 2024. Folhas maduras de *Citrus sp.* foram coletadas manualmente de um indivíduo localizado no campus (7,18199° S; 48,19620° O), sob duas condições: saudável e com sintomas de infecção fúngica. Ao todo, realizaram-se 10 coletas. O material foi selecionado e pesado em balança semi-analítica.

Figura 1: Limoeiro



Fonte: Autora, 2024.

Figura 2: folhas saudáveis



Figura 3: folhas doentes/fungadas



Fonte: Autora, 2024

Extração do óleo essencial

As extrações por arraste a vapor de água foram realizadas em sistema Clevenger considerando um período de extração de tres horas. A metodlogia neste processo para obtenção dos componentes do OE seguiu medotodologia adaparada de Santos (2020), o óleo era então condensado e capturado por afinidade de polaridade pois utilizou-se hexano (C₆H₁₂) no sistema

Clevenger, o solvente foi utilizado para separar água do óleo, onde a solução hexânica contendo o óleo foi recolhida em um béquer de 50 mL. Em seguida, fez-se o tratamento da solução com sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4) para a retirada de traços de água, filtragem em papel filtro para outro béquer de 50 mL, para assim retirar o sulfato de sódio da solução.

Em sequência, a solução foi submetida a manipulação manual em manta aquecedora dentro da capela, a fim de evaporar o solvente e manter o óleo essencial, já que ambos possuem diferentes pontos de ebulição, o tratamento da amostra durava em média 40 min a 50 min. As amostras foram transferidas para frascos devidamente vedados, rotulados e armazenadas sob refrigeração até a análise em CG/MS.

Análise e Identificação

Com uma micropipeta, (20-200 μL) foi adicionada, no vial âmbar (tipo Aijiren HPLC Sample), (figura 8), uma pequena alíquota do óleo essencial de *Citrus sp* diluída em Hexano grau HPLC. O cromatógrafo utilizado da marca Agilent Technologies (modelo 7890B), com detector Agilent Technologies (modelo 5977B MSD) e coluna Agilent HP – 5MS, instalado no Laboratório de cromatografia da UFNT.

A avaliação qualitativa do óleo essencial ocorreu por cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas. As condições de injeção da amostra foram determinadas nas seguintes características, hélio como gás de arraste sob pressão da coluna de 80,0 psi. O volume de 0,1 μL da solução de óleo essencial em hexano HPLC foi injetado com temperatura do injetor de 210 °C.

As condições de rampa de aquecimento, temperatura inicial do forno 50 °C durante 1 minuto, após, elevação de 50 °C para 210 °C sendo 3°/min de aquecimento, tempo total de 58 minutos de corrida e, todas foram injetadas através do modo automático do próprio aparelho. A identificação dos constituintes químicos foi realizada comparando-se à biblioteca do aparelho (Agilent Technologies).

Resultados e Discussão

As composições químicas dos óleos essenciais têm como característica uma alta concentração de monoterpenos, que são responsáveis pelo aroma específico do gênero *Citrus*, e geralmente conferem propriedades anti-inflamatórias (Amorim *et. al.*, 2016). Propriedades larvicidas contra *Aedes aegypti*, anti-Leishmanicida contra *Leishmania amazonensis*. e atividade antifúngica com alta inibição do crescimento mycelial (Oliveira, 2020).

As classes químicas identificadas no óleo essencial são: Terpenos (Monoterpenos); Álcoois (Monoterpenos); Éteres (Monoterpenos); Epóxidos (Monoterpenos); Aldeídos (Monoterpenos); Ésteres (Monoterpenos); Terpenos (Sesquiterpenos).

No presente estudo, realizado ao longo de seis meses (abril a outubro de 2024) foram realizadas 10 coletas nas seguintes datas e condições climáticas (Tabela 1 e 2), do OE obtido de folhas saudáveis e fungadas de espécie nativa de *Citrus sp* cultivado na região norte do Tocantins das diversas coletas, foram detectados um total de 25 compostos que forma identificados por EM (espectrometria de massas), predominam monoterpenos (11) e, em menor quantidade, sesquiterpenos (2) e compostos C12 (3).

Tabela 1 - Dados climáticos das coletas de folhas saudáveis.

	1ª coleta	2ª coleta	3ª coleta	4ª coleta	5ª coleta
Data	10/04/2024	15/05/2024	04/07/2024	23/08/2024	23/09/2024
Hora	7:50	7:35	7:40	7:47	7:45



Temperatura	27°	28°	26°	28°	30°
Umidade relativa	82%	66%	48%	43%	54%
Vel. do vento	7 km/h	7 km/h	9 km/h	16 km/h	12 km/h
Clima	Nublado	Parcialmente Nublado	Ensolarado	Ensolarado	Predominante mente ensolarado

Fonte: Weather, 2024.

Tabela 2 - Dados climáticos das coletas de folhas doentes/fungadas.

	1ª coleta	2ª coleta	3ª coleta	4ª coleta	5ª coleta
Data	17/04/2024	22/05/2024	05/07/2024	27/08/2024	01/10/24
Hora	7:50	7:35	7:40	7:47	7:45
Temperatura	27°	28°	26°	28°	30°
Umidade relativa	82%	66%	48%	43%	54%
Vel. do vento	7 km/h	7 km/h	9 km/h	16 km/h	12 km/h
Clima	Nublado	Parcialment e Nublado	Ensolarado	Ensolarado	Predominant emente ensolarado

Fonte: Weather, 2024.

Verificaram-se alterações significativas no perfil químico das folhas saudáveis analisadas. A comparação entre folhas saudáveis e fungadas revelou a presença de compostos comuns, porém com variações na concentração destes constituintes. Houve diferença na composição das substâncias encontradas nas folhas saudáveis e fungadas. A tabela 3 detalha a presença (+) ou ausência (-) de cada composto nas análises realizadas por CG/EM.

Tabela 3 – Resultado da análise do OE de *Citrus sp* por GC/MS. A – substâncias; B – Nomenclatura; C - CTempo de retenção em minutos; D – Constituintes do OE das folhas saudáveis; E - Constituintes do OE das folhas fungadas.

A	B	C	D	E
1	α -Pino	07.869	+	+
2	Sabineno	09.603	+	+
3	Pino	09.705	+	+
4	β -Mirceno	10.495	+	+
5	D-Limoneno	12.351	+	+
6	Eucaliptol	12.474	+	+
7	E- β -Ocimeno	13.008	+	+
8	Z- β -Ocimeno	13.541	-	+
9	γ -Terpineno	14.064	-	+
10	Linalool	16.556	-	+
11	Óxido de limoneno, cis	18.464	+	-

12	Óxido de limoneno, trans	18.761	+	-
13	Citronelal	19.879	+	+
14	Terpinen-4-ol	21.182	+	+
15	α -Terpineo	22.064	-	+
16	Citronelol	24.710	+	+
17	α -Citral	25.397	+	-
18	2,6-Dimetil-hept-5-en-1-ol	26.361	+	-
19	Óxido de epóxi-linalol	26.567	+	-
20	Citral	27.336	+	-
21	Citronelol acetato	32.710	-	+
22	(R)-acetato de lavandulila	33.408	-	+
23	3,7-Dimetil-octa-2,6-dien-1-ol	34.618	-	+
24	Cariofileno	36.279	-	+
25	Óxido de cariofileno	43.767	+	-

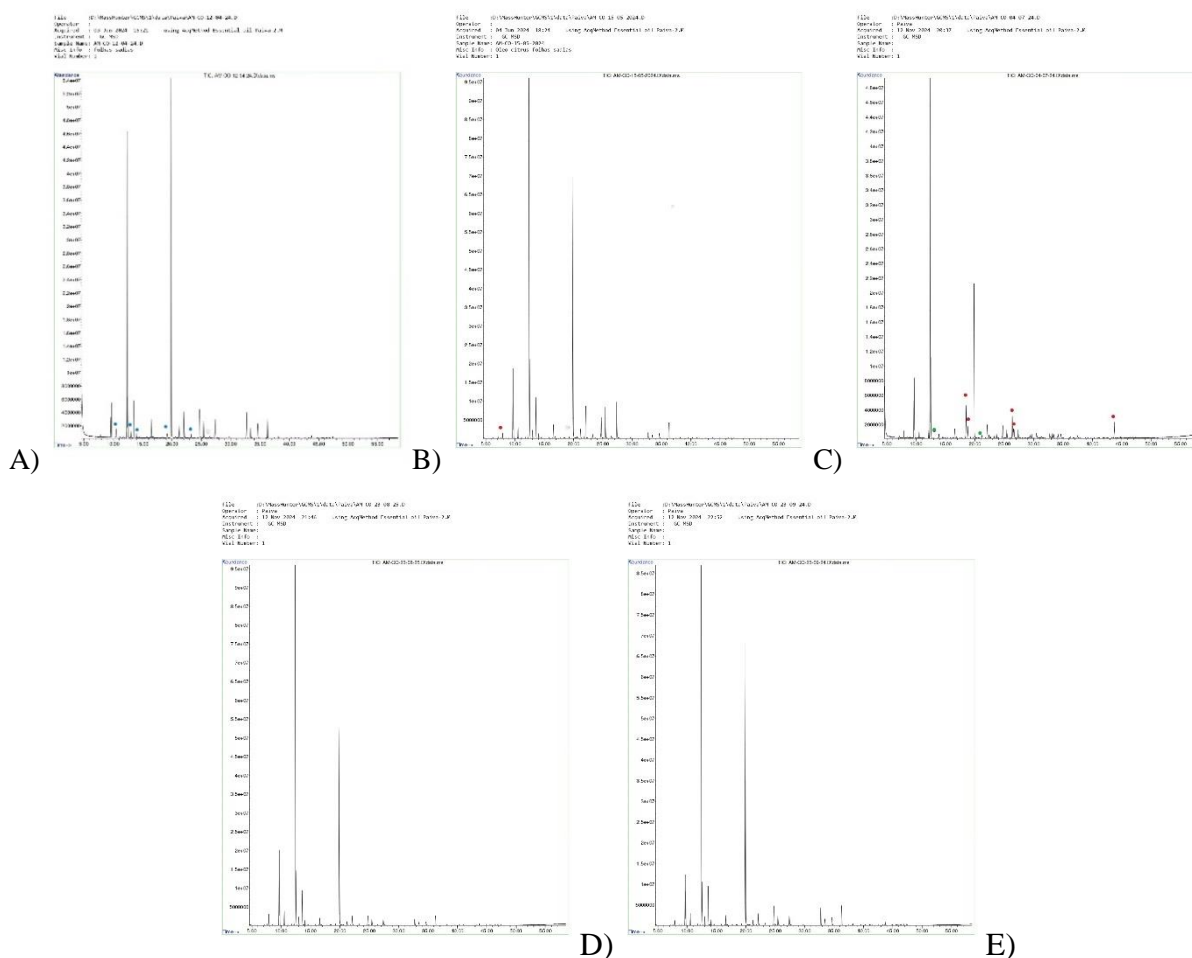
Fonte: Autora, 2024.

Segundo (Thiesen, 2019) A sazonalidade pode ser definida como um conjunto de variações ambientais regulares, que influenciam sobre crescimento e desenvolvimento das plantas, modificando as suas características inclusive a sua composição química. Considerando que os metabólitos secundários representam uma interface química entre a planta e o ambiente, estímulos sazonais são capazes de redirecionar fluxos metabólicos e, consequentemente, alterar a biossíntese de compostos específicos (Morais, 2009).

Esse efeito integra-se a um arcabouço multifatorial no qual interações bióticas (com microrganismos, insetos e outras plantas), variáveis abióticas (luminosidade, temperatura, disponibilidade hídrica e estado nutricional) e aspectos operacionais (época/horário de coleta e práticas de pós-colheita) exercem influência decisiva sobre a produção e a acumulação de metabólitos secundários. (Morais, 2009)

Os resultados obtidos neste estudo feito no período de 6 meses entre os meses de abril a outubro indicam que a sazonalidade induziu alterações significativas no perfil químico das folhas saudáveis analisadas. Dentre os compostos identificados, o D-limoneno e o citronelal se destacaram como os majoritários. No entanto, observou-se uma maior variabilidade na concentração relativa do citronelal ao longo dos diferentes meses do ano. A análise dos cromatogramas evidencia essa flutuação, com o citronelal apresentando pico máximo datas de coleta 12/04/2024 (Figura 4A), seguido de uma redução em 15/05/2024 (Figura 4B) 04/07/2024 (Figura 4C) e 23/08/2024 (Figura 4D). A partir 23/09/2024 (Figura 4E), houve um aumento na concentração desse composto. Tais oscilações são compatíveis com a plasticidade metabólica causada por variações sazonais, de acordo com a literatura (Morais, 2009).

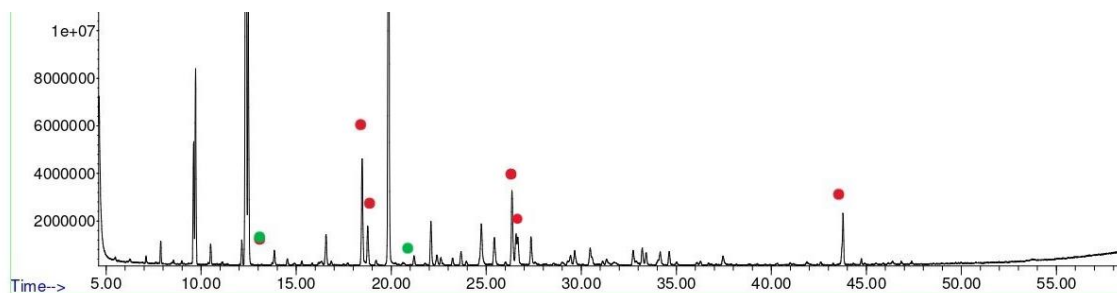
Figura 4 :Cromatogramas de folhas saudáveis A) Cromatograma da amostra do dia 12/04/24; B) Cromatograma da amostra do dia 15/05/24; C) Cromatograma da amostra do dia 04/07/24; D) Cromatograma da amostra do dia 23/08/24; E) Cromatograma da amostra do dia 23/09/24.



Fonte: Autora, 2024.

A amostra de folhas saudáveis do dia 04/072024 (Figura 17), apresentou variação na composição do óleo essencial, apresentando 5 novos compostos (identificados em pontos vermelhos.), os compostos identificados na análise são eles, Óxido de limoneno, cis; Óxido de limoneno, trans; 2,6-Dimetil-hept-5-en-1-ol; Óxido de epóxi-linalol; Óxido de cariofileno. Isto nos traz uma variação de composição destes monoterpenos caracterizando uma variação sazonal dos constituintes.

Figura 5: Recorte do cromatograma do dia 04/07 (Figura 17)

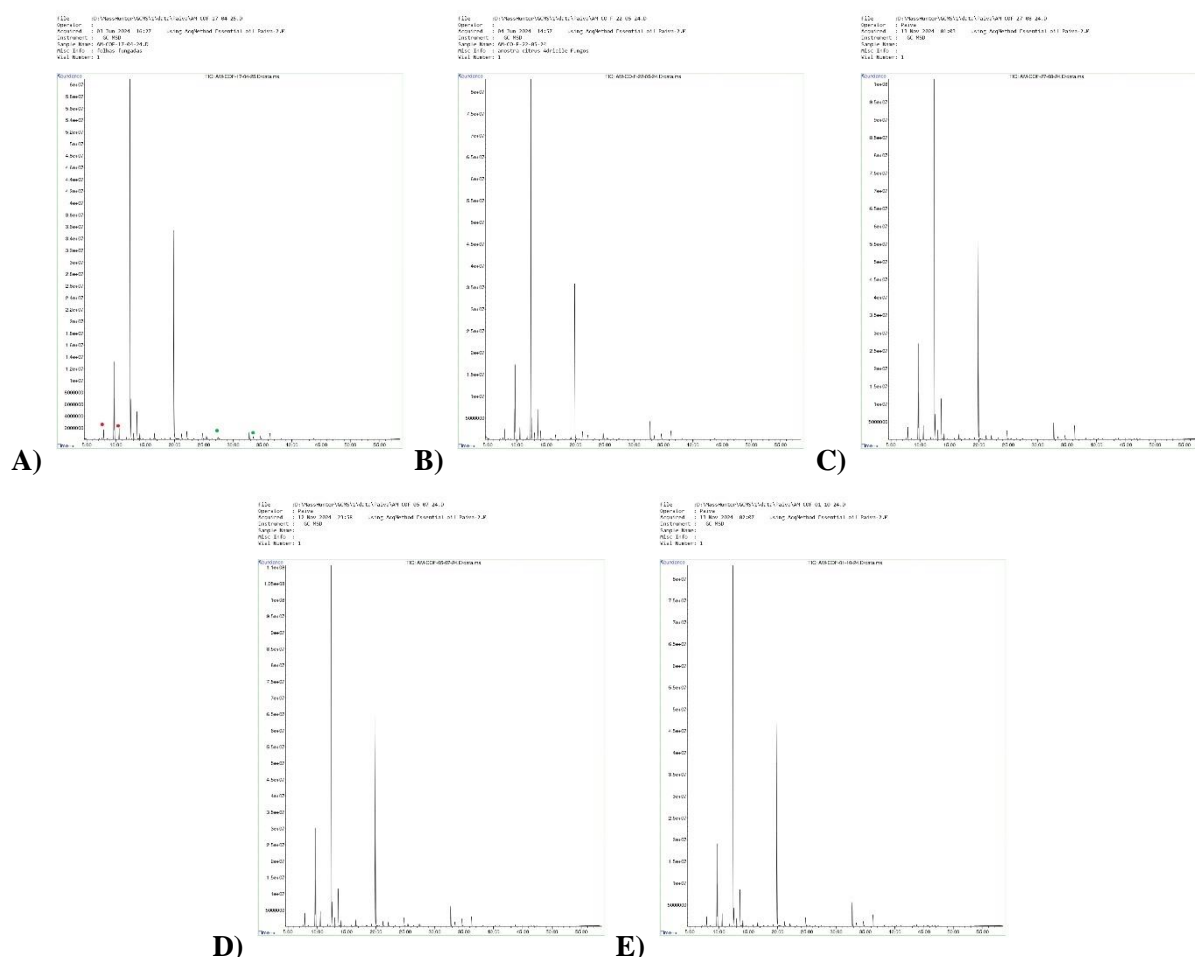


Fonte: Autora, 2024.

Além dos compostos inéditos na Figura (14) acima, os pontos em verde são compostos que não foram encontrados nesta amostra, que são eles: E- β -Ocimene, Z- β -Ocimene, γ -Terpinene Terpinen-4-ol. Em análise nas folhas com infecção fúngica observou-se que não houve alterações significativas nas composições relativas aos voláteis em comparação as

coletas realizadas. Essa estabilidade composicional é compatível com a manutenção de um aparelho defensivo químico basal ou facilmente induzível, conferindo proteção contínua frente ao estresse biótico.

Figura 6: Cromatogramas de folhas Fungadas A) Cromatograma da amostra do dia 17/04/24; B) Cromatograma da amostra do dia 25/05/24; C) Cromatograma da amostra do dia 05/07/24; D) Cromatograma da amostra do dia 27/08/24; E) Cromatograma da amostra do dia 01/10/24.



Fonte: Autora, 2024.

Essa interpretação é congruente com evidências de que, sob condições de estresse, as plantas podem manter ou elevar os teores de óleos essenciais com papel defensivo (Manukyan, 2011), embora, no cenário avaliado, tenha prevalecido a constância relativa.

Conclusões

A análise sazonal indicou que as condições climáticas podem influenciar a produção e a composição dos óleos essenciais, especialmente nas folhas saudáveis. Essa variação sazonal pode ser explicada pela influência de fatores abióticos e bióticos.

A técnica de CG/MS proporcionou a identificação de 25 componentes presente nas folhas de *Citrus sp.* A análise sazonal A partir dos espectros de massas obtidos propôs-se fragmentação para o β -Mirreno (Pico molecular $m/z = 69$, pico $m/z = 93$); Citronelal (Pico molecular $m/z = 69$); E - β -Ocimeno e Z - β -Ocimeno (Pico molecular $m/z = 93$).

Agradecimentos



Pós-graduação em Ensino de Ciências e Matemática (PPGecim), Curso de Licenciatura em Química da Universidade Federal do Norte do Tocantins, CNPq.

Referências

- AMORIM, J. L. et al. Propriedades anti-inflamatórias e caracterização química dos óleos essenciais de quatro espécies cítricas. **PLoS ONE**, v. 11, n. 4, p. e0153643, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0153643>.
- BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils-a review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 2, p. 446-475, 2008.
- BIZZO, H.; REZENDE, C. O mercado de óleos essenciais no Brasil e no mundo na última década. **Química Nova**, 2022. Disponível em: http://quimicanova.sbq.org.br/audiencia_pdf.asp?aid2=9443&nomeArquivo=RV2022-0027.pdf. Acesso em: 29 jul. 2024.
- ESTEVAM, E. B. B. et al. **Composição química e atividades biológicas do óleo essencial das folhas de Citrus limonia e Citrus latifolia e dos frutos verdes e folhas de Protium ovatum**. 2017.
- MANUKYAN, A. Effect of growing factors on productivity and quality of lemon catmint, lemon balm and sage under soilless greenhouse production: I. drought stress. **Medicinal and Aromatic Plant Science and Biotechnology**, v. 5, n. 2, p. 119-125, 2011.
- MIRANDA, C. A. S. F. et al. Essential oils from leaves of various species: antioxidant and antibacterial properties on growth in pathogenic species. **Revista Ciência Agronômica**, v. 47, n. 1, 2016. Disponível em: <http://www.gnresearch.org/doi/10.5935/1806-6690.20160025>. Acesso em: 10 jul. 2024.
- MORAIS, L. A. S. Influência dos fatores abióticos na composição química dos óleos essenciais. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 27, n. 2, p. S4050-S4063, 2009.
- OLIVEIRA, A. et al. **Caracterização química e atividades biológicas do óleo essencial da casca da fruta Citrus reticulata**. 2020.
- PASSOS, O. S.; SOARES FILHO, W. D. S.; CUNHA SOBRINHO, A. P. D. Origem, classificação botânica e distribuição geográfica. **Cultura do Citros**, v. 1, p. 15-23, 2013.
- SOLÓRZANO-SANTOS, F.; MIRANDA-NOVALES, M. G. Essential oils from aromatic herbs as antimicrobial agents. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 23, n. 2, p. 136-141, 2012.
- TAIZ, L. et al. **Fisiologia e desenvolvimento vegetal**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.
- THIESEN, L. A. **Disponibilidade hídrica e sazonalidade sobre a fitomassa, anatomia foliar e produção de óleo essencial de cidrô**. 2019. 98 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal de Santa Maria, Frederico Westphalen, 2019.