



## EXTRAÇÃO E COMPOSIÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE CASCAS DE CITRUS DE DIFERENTES ESTÁDIOS DE MATURAÇÃO.

M. F. F Siqueira<sup>1</sup>, T. J. Siebeneichler<sup>1</sup>, R. P. Oliveira<sup>2</sup>, C. E. S Cruzen<sup>1</sup>, W. P Silva<sup>1</sup>, A. M. Fiorentini<sup>1</sup>

- 1- Programa de pós graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos – Universidade Federal Pelotas, Departamento de ciência e Tecnologia Agroindustrial – CEP:96010-900 – Pelotas – RS – Brasil, Telefone: +55 (53)32757284– e-mail: [secretaria.ppgcta@gmail.com](mailto:secretaria.ppgcta@gmail.com)).
- 2- Embrapa Clima Temperado- – CEP: 96010-971 – Pelotas –RS – Brasil Telefone: +55(53) 98116 5272 – e-mail: [roberto.pedroso@embrapa.br](mailto:roberto.pedroso@embrapa.br)

**RESUMO** – Os óleos essenciais (OE) são constituídos principalemnte por monoterpenos, sintetizados pelo metabolismo secundário vegetal, que pode ser influenciado por diversos fatores como a espécie, clima, localização geográfica, sendo assim, conseqüentemente, o tipo de metabólito e a sua concentração também é influenciada. O objetivo do presente estudo foi verificar a influência do estágio de maturação na concentração de alguns componentes dos OE de frutas cítricas. Os OE foram extraídos pelo método de hidrodestilação e caracterizados através da cromatografia gasosa. No caso da Laranja Valência (*Citrus sinensis* Osbeck) 80% dos compostos majoritários dentre eles o D-limoneno e o  $\alpha$ -Pineno apresentaram diferença em suas concentrações conforme o estágio de maturação. Para a Mandarina (*Citrus reticulata* Blanco) 40% dos compostos majoritários sendo eles o D-limoneno e o  $\gamma$ -Terpineno apresentam diferenças em suas concentrações, ficando assim evidente que o estágio de maturação da fruta tem influencia nas proporções dos componentes do OE.

**ABSTRACT** – Essential oils (EO) are mainly composed of monoterpenes, synthesized by secondary plant metabolism, which can be influenced by several factors such as species, climate, geographic location, thus, consequently, the type of metabolite and its concentration is also influenced. The objective of the present study was to verify the influence of the stage of maturation on the concentration of some components of the EO of citrus fruits. The EO were extracted by the hydrodistillation method and characterized by gas chromatography. In the case of Orange Valencia (*Citrus sinensis* Osbeck), 80% of the major compounds, including D-limonene and  $\alpha$ -Pinene, showed differences in their concentrations according to the stage of maturation. For Mandarin (*Citrus reticulata* Blanco) 40% of the major compounds, being them D-limonene and  $\gamma$ -Terpinene have differences in their concentrations, thus making it evident that the maturation stage of the fruit has an influence on the proportions of the EO components.

**PALAVRAS-CHAVE:** cromatografia gasosa, Laranja Valência, Mandarina,

**KEYWORDS:** gas chromatography, Valencia Orange, Mandarin orange,

### 1. INTRODUÇÃO

Os óleos essenciais (OE) são constituídos por substâncias voláteis terpenóides e componentes alifáticos e aromáticos Tariq et al. (2019). São produzidos pelo metabolismo secundário vegetal e podem exercer diversas funções metabólicas dentre elas a defesa contra patógenos, também podem proporcionar a sobrevivência a situações como o estresse hídrico e falta de nutrientes, além disso, os seus compostos voláteis acabam por atrair agentes polinizadores (Andrade et al., 2014).

A sintetização dos OE está diretamente relacionada com fatores e condições ambientais, como: clima, espécie vegetal, parte da planta (folha caule, raiz), altitude, tempo de coleta e fase de crescimento, sendo assim, a composição e concentração dos componentes dos OE é variada. Conseqüentemente, um OE proveniente de uma mesma espécie, ou até mesmo de um mesmo exemplar, mas em estações e/ou safras diferentes pode apresentar diferenças quantitativas e qualitativas em sua composição (Bakkall et al, 2008; Kavoosi et al., 2013).

Os OE podem ser constituídos por até 60 compostos presentes em diferentes concentrações, entretanto geralmente são caracterizados por dois ou três compostos principais considerados compostos majoritários (presentes em concentrações elevadas). Os componentes dos OE são extremamente sensíveis à presença de oxigênio e também são termossensíveis. Algumas plantas como citronela, lavanda, hortelã, tomilho, pinho, e também algumas frutas cítricas como limão laranja e bergamota, contém alguns monoterpenos como o Limoneno  $\alpha$ -terpineno  $\beta$ -mirceno e canfeno (Jurado, et al, 2019).

Sendo assim, o objetivo do presente estudo, foi verificar a influência do estágio de maturação na concentração de alguns componentes de óleos essenciais extraídos da casca de frutas de Laranja valência (*Citrus sinensis* Osbeck) e Mandarina (*Citrus reticulata* Blanco).

## 2. MATERIAL E METÓDOS

### 2.1. Extração Do Óleo Essencial

No presente estudo foram utilizadas cascas de Laranja Valência (*Citrus sinensis* Osbeck) e Mandarina (*Citrus reticulata* Blanco) da fruta verde e da fruta madura, oriundas da região de Montenegro – RS. As frutas foram descascadas, e suas cascas congeladas a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , até o momento de extração. A extração do OE foi realizada pelo método de hidrodestilação com *Clevenger* como descrito por Dannenberg et al (2017). Para a extração 300g de cascas foram trituradas com 1L de água destilada. A mistura foi transferida para um balão de fundo redondo de 2 L e aquecida a  $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ , por aproximadamente três horas. O, óleo essencial de laranja madura (OELM), óleo essencial de laranja verde (OELV), o óleo essencial de mandarina madura (OEMM) e o óleo essencial de mandarina verde (OEMV) foram mantidos a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  e armazenados em frasco âmbar, até o momento da análise.

### 2.2. Caracterização Do Óleo Essencial

A caracterização dos óleos essenciais obtidos foi feita por cromatografia gasosa acoplada ao espectrofotômetro de massas. Para o preparo da amostra dez microlitros do óleo essencial foram misturados com  $490\text{ }\mu\text{L}$  de hexano, esta preparação foi realizada em triplicata. A injeção da amostra foi feita no modo *split* na proporção de 1:25, sendo injetado um microlitro de amostra, com a temperatura do injetor a  $200\text{ }^{\circ}\text{C}$ . O Gás hélio foi usado como gás de arraste, com um fluxo de  $2,91\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$  e a velocidade linear como um modo de controle de fluxo. A coluna capilar utilizada foi o Rxi-1MS ( $30\text{ m} \times 0,32\text{ mm} \times 0,25\text{ }\mu\text{m}$ ), com programação isotérmica por 1 minuto a  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ , e uma rampa de temperatura de  $5\text{ }^{\circ}\text{C}$  por minuto até a temperatura final de  $180\text{ }^{\circ}\text{C}$ , que foi mantida por 1 minuto. A identificação dos compostos foi baseada no espectro de massa (em comparação com a biblioteca espectral NIST), e as concentrações apresentadas como porcentagens relativas da área de cada pico sobre a área total. Para a análise foi utilizado um GC-MS Shimadzu QP2010 Ultra com auto-injetor AOC-20i e biblioteca de espectro de massa NIST 2011. Os parâmetros de injeção, cromatografia e espectrometria de massa foram configurados de acordo com Juliani & Simon (2008).

### 2.3. Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas no programa Graphpad Prism® 6.0, por meio dos teste o *One-way* Anova, para analisar a concentração de compostos em cada estágio de maturação nas diferentes frutas, com

o pós-teste de Tukey para correlação de variância entre as frutas e, Teste t para análise da concentração em diferentes estádios de maturação para cada fruta, considerando o nível de significância de 5%.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram identificados 31 compostos no OELM e 32 componentes para o OELV dentre eles destacam-se monoterpenos como o D-Limoneno,  $\beta$ -Mirceno,  $\beta$ -Phellandreno, Linalool,  $\alpha$ -Pinenos como componentes majoritários em ambos OE, suas concentrações podem ser observadas na Tabela 1.

Tabela 1 - Caracterização química dos Óleos essenciais de Laranja valência (*Citrus sinensis* Osbeck), de cascas de frutas verde e madura

Composto	OELV		OELM	
	TR (min)	Área (%)	TR (min)	Área (%)
$\alpha$ -Pinenos	3,200	1,33 <sup>a</sup>	3,200	1,28 <sup>b</sup>
$\beta$ -Phellandreno	3,758	2,55 <sup>a</sup>	3,758	1,97 <sup>b</sup>
$\beta$ -Mirceno	4,085	3,82 <sup>a</sup>	4,083	3,81 <sup>a</sup>
D-Limoneno	4,858	85,36 <sup>a</sup>	4,858	87,10 <sup>b</sup>
Linalool	6,183	2,39 <sup>a</sup>	6,192	1,77 <sup>b</sup>

OELM: óleo essencial de laranja madura, OELV: óleo essencial de laranja verde, TR: tempo de retenção a, b-diferentes sobrescritos em cada linha indicam diferença significativa entre as concentrações encontradas de acordo com o teste One-way ANOVA ( $p < 0,0001$ ). a, b- sobrescritos iguais na mesma linha - não houve diferença significativa entre as concentrações encontradas de acordo com o teste One-way ANOVA ( $p < 0,0001$ ).

Pode-se observar que somente o composto  $\beta$ -Mirceno não apresentou diferença significativa em sua concentração em ambos óleos essenciais. Segundo um levantamento realizado por Dosoky e Setze (2018) a concentração de D-Limoneno em *Citrus sinensis* L pode variar de 83,9% a 95,9%, já o  $\alpha$ -Pinenos pode variar de 0,6% a 1,0%, para o  $\beta$ -Mirceno a variação ocorre entre 1,3% a 3,3% e o Linalool pode variar de 0% a 5,6%. Em um estudo realizado por Evangelho et al (2019) o óleo essencial de *Citrus sinensis* (Valencia) apresentou para o  $\alpha$ -Pinenos uma concentração de 0,53%, para o  $\beta$ -Mirceno 2,35% e para o D-Limoneno 95,96%. Essa pequena variação encontrada entre as concentrações segundo Dosoky e Setzer (2018) se justifica pela diferença na origem geográfica das frutas, genética, clima, idade, estágio de maturação e até mesmo o método de extração do OE.

Percebe-se que de modo geral houve uma queda na concentração dos compostos majoritários quando comparamos o OELM com o OELV, esse fato pode ser justificado segundo Sousa e Sousa (2017) pois os terpenos de modo geral quando se trata do metabolismo secundário atuam como toxinas e inibidores do forrageio, defendendo a planta de insetos e outros animais, algo de extrema importância durante o desenvolvimento da fruta.

Para o OELM foram identificados 27 compostos e para o OELV foram identificados 24 compostos dentre eles destacam-se como componentes majoritários de ambos os OE o  $\alpha$ -Pinenos,  $\beta$ -Mirceno, o-Cimeno, D-Limoneno e  $\gamma$ -Terpineno, suas concentrações podem ser observadas na Tabela 2.

Tabela 2 - Caracterização química dos Óleos essenciais de Mandarina (*Citrus reticulata* Blanco), de cascas de frutas verde e madura

<i>Composto</i>	<i>OEMV</i>		<i>OEMM</i>	
	<i>TR (min)</i>	<i>Área (%)</i>	<i>TR (min)</i>	<i>Área (%)</i>
$\alpha$ -Pineno	3,200	3,54 <sup>a</sup>	3,197	3,73 <sup>a</sup>
$\beta$ -Mirceno	4,090	3,36 <sup>a</sup>	4,086	3,16 <sup>a</sup>
o-Cimeno	4,610	2,13 <sup>a</sup>	4,606	4,5 <sup>b</sup>
D-Limoneno	4,856	59,22 <sup>a</sup>	4,855	60,04 <sup>a</sup>
$\gamma$ -Terpineno	5,409	20,79 <sup>a</sup>	5,404	19,09 <sup>b</sup>

OEMM: óleo essencial de mandarina madura, OEMV: óleo essencial de mandarina verde, TR: tempo de retenção a, b- diferentes sobrescritos em cada linha indicam diferença significativa entre as concentrações encontradas de acordo com o teste *One- way* ANOVA ( $p < 0,0001$ ). a, b- sobrescritos iguais na mesma linha - não houve diferença significativa entre as concentrações encontradas de acordo com o teste *One- way* ANOVA ( $p < 0,0001$ ).

Em um estudo realizado por Dosoky e Setzer (2018) foram encontradas concentrações de D-Limoneno em mandarina que variavam de 65,3% a 74,2%, já  $\alpha$ -Pineno variava de 2,0% a 2,7%, e  $\beta$ -Mirceno de 1,5% a 1,8%. Com base nesses dados pode-se dizer que as concentrações encontradas para os compostos majoritários no presente estudo se aproxima a valores encontrados na literatura. No caso da mandarina pode-se observar que somente o-Cimeno e  $\gamma$ -Terpineno apresentaram diferença significativas em suas concentrações conforme o estágio de maturação.

#### 4. CONCLUSÃO

Com base nos resultados apresentados foi possível observar que para a Laranja Valencia quatro dos cinco componentes majoritários, ou seja 80% sofreram alterações em suas concentrações dependendo do estágio de maturação da fruta, dentre eles D-Limoneno foi o composto que apresentou maior variação. Já para a Mandarina foi observado que dois dos cinco compostos majoritários, ou seja, 40% apresentaram diferença significativa em suas concentrações, dentre eles o  $\gamma$ -Terpineno foi o composto que apresentou uma maior variação na sua concentração. Dessa forma ficou evidente que o estágio de maturação das frutas acaba influenciando a concentração de determinadas substâncias no óleo essencial, sendo esse um fator a ser levado em consideração no momento de extração.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Andrade, B. F. M., Barbosa, L. N., Probst, I. S., Junior, A. F. Antimicrobial activity of essential oils, JEOR, 26, 34-40, 2014. <https://doi.org/10.1080/10412905.2013.860409>.

Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Idaomar, M. Biological effects of essential oils-a review. Food and Chemical Toxicology, n. 46, p. 446-475, 2008.

Dannenberg, G. S., Funck, G. D., Cruxen, C. E., Marques, J. L., Silva, W. P.S., Fiorentini, A. M. Essential oil from pink pepper as an antimicrobial component in cellulose acetate film: Potential for application as active packaging for sliced cheese, *LWT - Food Sci Technol*, V. 81 p.314-318, 2017



27 A 29 DE OUTUBRO DE 2020

ON LINE

7º Simpósio de  
Segurança Alimentar

Inovação com sustentabilidade

- Dosoky, N. S., Setzer, W. N. (2018). Biological Activities and safety of *Citrus* spp. Essential Oils, *International Journal of Molecular Sciences*, V. 19 (7). Disponível em <https://doi.org/10.3390/ijms19071966>
- Evangelho, J. A., Dannenberg, G.S., Biduski, B., Halal, S. L. M., Kringel, D.H., Gularte, M. A., Fiorentini, A. M., Zavareze, E. R. (2018). Antibacterial activity, optical, mechanical, and barrier properties of corn starch films containing orange essential oil. *Carbohydrate polymers*, v.222.
- Galvão, J. G., Silva, V. F., Ferreira, S. G., França, F. R. M., Santos, D. A., Freitas, L. S., Alves, P. B., Araújo, A. A. S., Cavalcanti, S. C. H., & Nunes, R. S. (2015).  $\beta$ -cyclodextrin inclusion complexes containing *Citrus sinensis* (L.) Osbeck essential oil: An alternative to control *Aedes aegypti* larvae. *Thermochimica Acta*, v.608, p.14–19.
- Juliani, H. R.; Simon, J. E.. (2008). Chemical Diversity of *Lippia multiflora* Essential Oils from West Africa. *J. Essent. Oil.*,v.20,p. 49-55
- Jurado., F. R., Cruz, A. .R. N., Ochoavelasco,C. E., Malo, A. L., Sosa, R. A. (2019). Essential oils in vapor phase as alternative antimicrobials: A review, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. Disponível em <https://doi.org/1080/10408398.2019.1586641>
- Kavoosi, G., Rowshan, V. (2013). Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of essential oil obtained from *Ferula assa-foetida* oleo-gum-resin: Effect of collection time. *Food Chemistry*, n. 138, p. 2180-2187.
- Lou, Z.; Chen, J.; Yu, F.; Wang, H.; Kou, X.; Ma, C.; Zhu, S. (2017).The antioxidant, antibacterial, antibiofilm activity of essential oil from *Citrus medica* L. var. *sarcodactylis* and its nanoemulsion, *LWT - Food Science and Technology*. Disponível em <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.02.037>.
- Sousa, R. F., Sousa, J. A. (2017). Metabólitos secundários associados a estresse hídrico e suas funções nos tecidos vegetais. *Revista Brasileira de Gestão Ambiental*, v.11
- Tariq, S., Wani, S., Rasool, W., Shafi, K., Bhat, M. A., Prabhakar, A., Shalla, A. H., Rather, M. A.(2019). A comprehensive review of the antibacterial, antifungal and antiviral potential of essential oils and their chemical constituents against drugresistant microbial pathogens:*Microbial Pathogenesis*, v. 134. Disponível em <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103580>

REALIZAÇÃO



ORGANIZAÇÃO



[www.officeeventos.com.br](http://www.officeeventos.com.br)