

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE AGRONOMIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA

INFLUÊNCIA DE DIFERENTES GENÓTIPOS E MÉTODOS DE EXTRAÇÃO  
SOBRE O RENDIMENTO E COMPOSIÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE  
TANGERINEIRAS

Manuela Sulzbach Rodrigues  
Engenheira Agrônoma/UFRGS  
Mestra em Fitotecnia/UFRGS

Tese apresentada como um dos requisitos  
à obtenção do Grau de Doutora em Fitotecnia  
Área de Concentração Sistemas de Produção Vegetal

Porto Alegre (RS), Brasil  
Abril de 2020

#### CIP - Catalogação na Publicação

Sulzbach Rodrigues, Manuela  
Influência de diferentes genótipos e métodos de  
extração sobre o rendimento e composição dos óleos  
essenciais de tangerineiras / Manuela Sulzbach  
Rodrigues. -- 2020.  
115 f.

Orientador: Sergio Francisco Schwarz.

Coorientador: Gabriel Fernandes Pauletti.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio  
Grande do Sul, Faculdade de Agronomia, Programa de  
Pós-Graduação em Fitotecnia, Porto Alegre, BR-RS,  
2020.

1. Citrus deliciosa. 2. Hidrodestilação. 3. Arraste  
a vapor. 4. Escarificação. 5. Petitgrain. I. Schwarz,  
Sergio Francisco, orient. II. Fernandes Pauletti,  
Gabriel, coorient. III. Título.

MANUELA SULZBACH RODRIGUES  
Engenheira Agrônoma - UFRGS  
Mestre em Fitotecnia - UFRGS

## **TESE**

Submetida como parte dos requisitos  
para obtenção do Grau de

### **DOUTORA EM FITOTECNIA**

Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia  
Faculdade de Agronomia  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Porto Alegre (RS), Brasil

Aprovado em: 29.04.2020  
Pela Banca Examinadora

Homologado em: 25.05.2020  
Por

SÉRGIO FRANCISCO SCHWARZ  
Orientador - PPG Fitotecnia  
UFRGS

CHRISTIAN BREDEMEIER  
Coordenador do Programa de  
Pós-Graduação em Fitotecnia

GABRIEL FERNANDES PAULETTI  
Coorientador  
UCS

MAGNÓLIA APARECIDA SILVA DA SILVA  
PPG Fitotecnia/UFRGS

MÁRCIA ORTIZ MAYO MARQUES  
IAC/SP

MATEUS PEREIRA GONZATTO  
UFV

CARLOS ALBERTO BISSANI  
Diretor da Faculdade de  
Agronomia

## AGRADECIMENTOS

A Deus por sempre iluminar meus caminhos, me amparar nos momentos de dificuldades e pelas oportunidades que me foram concedidas.

Aos meus pais, Marli Teresinha Porn e Arnildo Sulzbach por permitirem que eu me dedicasse integralmente aos estudos, pelo incentivo e apoio em todos os momentos.

Ao meu esposo, Carlos Henrique Brites Rodrigues pelo amor e companheirismo durante os últimos sete anos.

Aos demais familiares e amigos pela torcida e por compreenderem tantas ausências em virtude dos estudos.

Ao meu orientador Sergio Francisco Schwarz pelos ensinamentos, conselhos, estímulo, exemplo e por todo o auxílio durante os seis anos de pós-graduação.

Ao meu coorientador Gabriel Fernandes Pauletti pela parceria neste estudo, amizade, bem como pelas análises dos óleos essenciais.

À professora Magnólia Aparecida Silva da Silva pelo carinho, ensinamentos, fé em mim e por tornar esse período de tantas angústias mais fácil de ser superado.

Ao professor Mateus Pereira Gonzatto pelo auxílio desde os delineamentos até as coletas e análises estatísticas, e por participar ativamente deste estudo.

À pesquisadora Marcia Ortiz Mayo Marques pela disponibilidade e generosidade em partilhar conhecimento, por toda a atenção e carinho, assim como pelas análises e identificação dos óleos essenciais.

Aos laboratórios de análises da UCS e IAC, à Fazenda Panoramas, à Ecocitrus, à Família Böettcher e à Novo Citros pela parceria nos experimentos e análises.

Aos colegas do grupo: Gerson Nestor Böettcher, Leonardo André Schneider, Sabrina Raquel Griebeler, Priscila Rollo, Vinícius Jardim, Eduarda Dorigatti Gargioni, Bruno Munhoz, Rodrigo Areze, Thauhana Kuhn e Estéfani Sulzbach pelo auxílio nas coletas, avaliações dos frutos e/ou extrações e digitação dos dados.

Aos colegas de pós-graduação, especialmente: Francisco Marodin, Leonardo Guasso, Taís Altmann, Marina Back, Samanta Campos, Vanessa Braga e Daiane Lattuada pelo apoio e amizade.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) pelo ensino público, gratuito e de excelente qualidade.

Aos professores da Faculdade de Agronomia da UFRGS, principalmente aos do Departamento de Horticultura e Silvicultura (DHS), pela dedicação e ensinamentos.

Aos funcionários e colaboradores do DHS: Ernani, Idenir, Detamar e Vinícius por me acompanharem em diversas idas a campo.

Ao Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia e CNPq pela concessão da bolsa que garantiu que eu tivesse condições de realizar este curso de pós-graduação.

# INFLUÊNCIA DE DIFERENTES GENÓTIPOS E MÉTODOS DE EXTRAÇÃO SOBRE O RENDIMENTO E A COMPOSIÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE TANGERINEIRAS<sup>1</sup>

Autora: Manuela Sulzbach Rodrigues

Orientador: Sergio Francisco Schwarz

Coorientador: Gabriel Fernandes Pauletti

## RESUMO

O Brasil situa-se como o segundo maior produtor mundial de citros, sendo os óleos essenciais um importante subproduto da indústria citrícola, contribuindo para a nossa primeira colocação em volume de óleo essencial exportado. No Rio Grande do Sul, a extração a nível industrial é realizada principalmente a partir de frutos imaturos de tangerineiras retirados durante a prática do raleio manual, operação de manejo indispensável para obtenção de frutos de qualidade em *Citrus deliciosa*. Sabe-se que inúmeros fatores podem interferir na síntese de metabólitos secundários, dentre eles o genótipo, o ambiente, o método de extração, bem como o estágio de desenvolvimento dos frutos. Há ainda variação na composição e teores de acordo com o órgão empregado na extração, embora haja presença de óleos essenciais não apenas na casca dos frutos, mas nas folhas e flores. Deste modo, este estudo objetivou: (a) avaliar a influência de seis diferentes porta-enxertos no teor e composição dos óleos essenciais durante o desenvolvimento dos frutos de duas tangerineiras: ‘Montenegrina’ e ‘Oneco’; (b) determinar o rendimento e composição dos óleos essenciais de frutos imaturos de *C. deliciosa* a partir de métodos industrial (escarificação) e laboratorial (hidrodestilação); (c) caracterizar a composição do óleo essencial extraído de folhas de tangerineiras e tangores pelos métodos de arraste a vapor e hidrodestilação. Os experimentos foram desenvolvidos em propriedades situadas na Depressão Central do Rio Grande do Sul, apresentando delineamento inteiramente casualizado nos diferentes pomares. Os resultados obtidos indicam que porta-enxertos avaliados não promoveram alterações significativas na composição dos óleos essenciais, enquanto que a tangerineira ‘Oneco’ demonstrou teores médios superiores à ‘Montenegrina’. Em ambas, os compostos majoritários variaram durante o desenvolvimento dos frutos. O método laboratorial de extração propiciou maior diversidade de substâncias no óleo essencial de frutos imaturos de *C. deliciosa*, embora tenha apresentado rendimento bastante inferior ao industrial. A extração do óleo essencial de folhas de tangerineiras e tangores por arraste a vapor e hidrodestilação proporcionaram diferentes teores de compostos majoritários, sendo a heterogeneidade de compostos atribuída às influências de fatores genéticos inerentes às espécies e cultivares.

---

<sup>1</sup> Tese de Doutorado em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (115f.) Abril, 2020.

# INFLUENCE OF DIFFERENT GENOTYPES AND EXTRACTION METHODS ON THE YIELD AND COMPOSITION OF ESSENTIAL OILS FROM MANDARIN TREES<sup>1</sup>

Author: Manuela Sulzbach Rodrigues

Adviser: Sergio Francisco Schwarz

Co-Adviser: Gabriel Fernandes Pauletti

## ABSTRACT

Brazil is the world's second largest citrus producer, and essential oils are an important by-product of the citrus industry, contributing to the country being placed in the ranking of volume of essential exported. In Rio Grande do Sul, the extraction at industrial level is carried out mainly from immature mandarin fruits removed during the practice of manual thinning, an operation that is essential for obtaining quality fruits in *Citrus deliciosa*. It is known that numerous factors can interfere in the synthesis of secondary metabolites, among them the genotype, the environment, the extraction method, as well as the stage of fruit development. There is also variation in composition and contents according to the part of the plant used in the extraction, although there is the presence of essential oils not only in the skin of the fruits, but also in the leaves and flowers. Thus, this study aimed to: (a) evaluate the influence of six different rootstocks on the content and composition of essential oils during the development of the fruits of two mandarin trees: 'Montenegrina' and 'Oneco'; (b) determine the yield and composition of the essential oils of immature fruits of *C. deliciosa* using industrial (scarification) and laboratory (hydrodistillation) methods; (c) to characterize the composition of the essential oil extracted from leaves of mandarin and tangor trees by the methods of steam distillation and hydrodistillation. The experiments were carried out in areas located in the Central Depression of Rio Grande do Sul, with a completely randomized design in the different orchards. The results obtained indicate that the rootstocks evaluated did not promote significant changes in the composition of essential oils, while the mandarin tree 'Oneco' showed average levels higher than those of the 'Montenegrina' one. In both, the majority compounds varied during fruit development. The laboratory method of extraction provided a greater diversity of substances in the essential oil of immature fruits of *C. deliciosa*, although it presented a yield significantly lower than the industrial one. The extraction of essential oil from mandarin and tangor leaves by steam distillation and hydrodistillation provided different contents of major compounds, and the heterogeneity of compounds was attributed to the influences of genetic factors inherent to species and cultivars.

---

<sup>1</sup> Doctoral Thesis in Plant Science, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (115p.) April, 2020.

## SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO BIBLIOGRAFICA.....	3
2.1 Importância econômica dos Citros.....	3
2.2 Óleos Essenciais.....	6
2.3 Óleos Essenciais de Citros.....	8
2.3.1 Mercado de óleos essenciais.....	8
2.3.2 Métodos de extração.....	10
2.3.3 Composição dos óleos essenciais.....	14
2.3.4 Fatores que influenciam a composição dos óleos essenciais.....	20
2.3.5 Principais usos dos óleos essenciais.....	21
2.4 Referências.....	24
3 ARTIGO 1 - Caracterização dos óleos essenciais durante o desenvolvimento dos frutos das tangerineiras ‘Montenegrina’ e ‘Oneco’ sobre seis diferentes porta-enxertos.....	31
4 ARTIGO 2 - Caracterização do óleo essencial da casca de tangerineiras verdes extraído pelos métodos laboratorial e industrial.....	59
5 ARTIGO 3 - Composição do óleo essencial de folhas de tangerineiras e tangores obtido por arraste a vapor e hidrodestilação.....	77
6 CONCLUSÕES.....	97
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	99
8 APÊNDICES.....	101

## RELAÇÃO DE TABELAS

### REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

	Página
1. Condensação de unidades de isopreno na formação de terpenóides. <i>Fonte: Simões &amp; Spitzer, 2001</i> .....	7
2. Os principais óleos essenciais no mercado mundial. <i>Fonte: Bizzo et al., 2009</i> .....	9
3. Os maiores exportadores mundiais de óleos essenciais em quantidade de óleo essencial (t) e valor obtido com as exportações (US\$). <i>Fonte: FAO, 2020</i> .....	9

### ARTIGO 1

1. Compostos identificados (%) no óleo essencial dos frutos de tangerineira ‘Montenegrina’ enxertada sobre seis diferentes porta-enxertos. Butiá-RS, julho de 2016.....	46
2. Compostos identificados (%) no óleo essencial dos frutos de tangerineira ‘Oneco’ enxertada sobre seis diferentes porta-enxertos. Butiá-RS, julho de 2016.....	50

## ARTIGO 2

	Página
1. Teores dos compostos identificados por data amostral e método, probabilidades de significância da análise de variância (teste F) para tempo ( $P_t$ ), método ( $P_m$ ) e para a interação ( $P_{t*m}$ ), e coeficientes decorrelação de Pearson. Montenegro – RS, abril de 2017.....	69
2. Composição média (%) dos óleos essenciais extraídos pelos métodos industrial (escarificação) e laboratorial (Clevenger) por classe química. Montenegro-RS, abril de 2017.....	70

## ARTIGO 3

1. Rendimento médio de extração (% m/m) de <i>petitgrain</i> pelos métodos de arraste a vapor (A) e hidrodestilação (H) nas sete cultivares de citros avaliadas. Porto Alegre (RS), 2019.....	84
2. Composição química (% m/m) dos óleos essenciais das folhas ( <i>petitgrain</i> ) de cultivares de <i>C. deliciosa</i> , extraídos pelos métodos de arraste a vapor e hidrodestilação, Porto Alegre, 2019.....	86
3. Composição química (% m/m) dos óleos essenciais das folhas ( <i>petitgrain</i> ) de <i>C. reticulata</i> e tangores, extraídos pelos métodos de arraste a vapor e hidrodestilação, Porto Alegre, 2019.....	87

## RELAÇÃO DE FIGURAS

### REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

	Página
1. Ilustração de destilador a vapor. <i>Fonte:</i> Oliveira & Jose, 2007.....	11
2. Ilustração de aparelho Clevenger. <i>Fonte:</i> Núcleo de Estudos e Pesquisas com Plantas Medicinai, 2016.....	12
3. Etapa inicial do processo de extração industrial: emulsão rica em óleo essencial de laranja. <i>Fonte:</i> Ecocitrus, 2020.....	13
4. Etapas do processo de extração de óleo de mandarina verde. <i>Fonte:</i> Ecocitrus, 2020.....	14
5. Ciclo biossintético dos metabólitos secundários. <i>Fonte:</i> Dewick, 2009....	15
6. Estrutura molecular de alguns constituintes dos óleos essenciais de citros. <i>Fonte:</i> Pauletti & Silvestre, 2018.....	17

## ARTIGO 1

	Página
1. Teor de óleo essencial em frutos de tangerineira ‘Montenegrina’ ( <i>C. deliciosa</i> ) enxertada sobre diferentes porta-enxertos ao longo do desenvolvimento dos frutos, expresso em Dias Após a Plena Floração (DAPF). Butiá-RS, 2016.....	40
2. Comportamento do teor de óleo essencial ( $\text{g. kg}^{-1}$ ) em relação a diferentes parâmetros de desenvolvimento dos frutos de ‘Montenegrina’: massa (g) (A), diâmetro (mm) (B) e índice de coloração da casca (C). Butiá-RS, 2016.....	41
3. Comportamento do teor de óleo essencial ( $\text{g. kg}^{-1}$ ) em frutos ‘Montenegrina’ em relação: a área superficial ( $\text{mm}^2$ ) (A); a área superficial específica ( $\text{mm}^2.\text{g}^{-1}$ ) (B). Butiá-RS, 2016.....	42
4. Teor de óleo essencial em frutos de tangerineira ‘Oneco’ ( <i>C. reticulata</i> ) enxertada sobre diferentes porta-enxertos ao longo do desenvolvimento dos frutos, expresso em Dias Após a Plena Floração (DAPF). Butiá-RS, 2016.....	43
5. Comportamento do teor de óleo essencial ( $\text{g. kg}^{-1}$ ) em relação à diferentes parâmetros de desenvolvimento dos frutos de ‘Oneco’: massa (g) (A), diâmetro (mm) (B) e índice de coloração da casca (C). Butiá-RS, 2016.....	44
6. Comportamento do teor de óleo essencial ( $\text{g. kg}^{-1}$ ) em frutos ‘Oneco’ em relação: a área superficial ( $\text{mm}^2$ ) (A); a área superficial específica ( $\text{mm}^2.\text{g}^{-1}$ ) (B). Butiá-RS, 2016.....	45

## ARTIGO 1

	Página
7. Composição dos teores de $\gamma$ -terpineno (A), $\alpha$ -pineno (B) e $\alpha$ -terpineno (C) e o desenvolvimento dos frutos de ‘Montenegrina’, representado pelo número de dias após a plena floração (DAPF). Butiá-RS, julho de 2016.....	48
8. Análises de regressão entre os teores de limoneno (A), $\gamma$ -terpineno (B), linalol (C), e $\alpha$ -terpineol (D) e o desenvolvimento dos frutos de ‘Oneco’, representado pelo número de dias após a plena floração (DAPF). Butiá-RS, julho de 2016.....	52
9 Análise de correlação para as características dos frutos de ‘Montenegrina’: massa média (MM), diâmetro médio (DM), índice de coloração da casca (ICC), teor de óleo essencial e compostos majoritários presentes no óleo essencial. Butiá-RS, julho de 2016. Coeficientes hachurados com $\times$ possuem $p > 0,01$ e são considerados não significativos.....	53
10 Análise de correlação para as características dos frutos de ‘Oneco’: massa média (MM), diâmetro médio (DM), índice de coloração da casca (ICC), teor de óleo essencial e compostos majoritários presentes no óleo essencial. Butiá-RS, julho de 2016. Coeficientes hachurados com $\times$ possuem $p > 0,01$ e são considerados não significativos.....	55

## ARTIGO 2

	Página
1. Análise de regressão para avaliando o rendimento de óleo essencial obtido para os métodos de extração por escarificação (A) e hidrodestilação em Clevenger (B) de acordo com a data de amostragem (dias julianos). Montenegro - RS, abril de 2017.....	66
2. Análise correlação entre o rendimento de óleo essencial obtido por escarificação e hidrodestilação em Clevenger. Montenegro - RS, abril de 2017.....	67
3. Análises de correlação significativas entre os teores dos compostos $\gamma$ -terpineno (A) e $\alpha$ -pineno (B) em função dos métodos de extração utilizados: escarificação e hidrodestilação em Clevenger. Montenegro - RS, abril de 2017.....	71

## ARTIGO 3

1. Dendrograma dos óleos essenciais das folhas ( <i>petitgrain</i> ) de sete cultivares do gênero <i>Citrus</i> , extraído através de arraste a vapor (A) e hidrodestilação (B). Agrupamento em função da composição química utilizando distância Euclidiana. Porto Alegre, 2019.....	90
2. Análise de componentes principais (PCA) agrupando o óleo essencial das folhas ( <i>petitgrain</i> ) de sete cultivares de citros, avaliadas em função da composição química. Porto Alegre, 2019.....	91

## 1 INTRODUÇÃO

Os óleos essenciais são utilizados desde a antiguidade, mas acredita-se que a exploração dos óleos essenciais teve início no Oriente, ainda antes de Cristo, sendo os principais centros de produção a Índia, Pérsia e Egito (Ootani *et al.*, 2013). Os estudos a respeito dessas substâncias iniciaram no século XIX e início do século XX, visando investigar sua importância como drogas medicinais, venenos, aromatizantes, dentre outras (Taiz & Zeiger, 2004; Souza *et al.*, 2010).

A extração dos óleos essenciais de citros se dá através do emprego de técnicas como o arraste a vapor – uma das técnicas de extração mais utilizadas, e também pela prensagem do pericarpo de frutos - que predomina no mercado brasileiro (Bizzo *et al.*, 2009). No Rio Grande do Sul a técnica comumente empregada para a extração de óleo essencial de frutos imaturos de citros difere da usual no país: os frutos de tangerineiras são submetidos a um processo de “ralagem” ou escarificação do epicarpo, originando o denominado “óleo de mandarina verde”, bastante valorizado no mercado internacional (Frizzo *et al.*, 2004; Ecocitrus, 2020). A extração do óleo essencial dos frutos verdes ou imaturos ocorre a partir de frutos retirados por meio do raleio manual, uma prática de manejo usual em tangerineiras visando reduzir problemas de alternância de produção, além de melhorar características como o tamanho e qualidade organoléptica dos frutos comercializados *in natura* (Rodrigues *et al.*, 1998; Köller, 2009).

A comercialização dos frutos do raleio para a extração de óleos essenciais tem adquirido importância devido à possibilidade de retorno econômico para os citricultores,

compensando os custos da mão de obra necessária para a realização desta prática (Ecocitrus, 2020).

Sabe-se que os óleos essenciais de citros possuem mais de 200 substâncias em sua composição, sendo a fração volátil composta basicamente por terpenos (monoterpenos e sesquiterpenos), seus derivados oxigenados e também alcoóis alifáticos, ésteres e aldeídos, cujos teores são variáveis conforme a espécie e até mesmo entre cultivares de uma mesma espécie, atribuindo a eles diferentes propriedades e possibilidades de utilização (Mehl *et al.*, 2014; Simas *et al.*, 2015). Também é de conhecimento que várias características das plantas cítricas podem ser afetadas pelos porta-enxertos empregados, compreendendo atributos quantitativos e qualitativos de frutos, bem como a composição dos óleos essenciais (Castle, 1987; 2010, Verzera *et al.*, 2003). Ademais, a composição química e os teores de óleos essenciais além de sofrerem alterações durante a maturação dos frutos, também podem variar consideravelmente conforme o método de extração utilizado (Cassel *et al.*, 2009; Bourgou *et al.*, 2012). Além de presentes na casca dos frutos, os óleos essenciais podem ser encontrados em folhas e estruturas florais dos citros, sendo os aspectos físico-químicos e de aroma distintos conforme o órgão da planta (Simões & Spitzer, 2001).

Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivos caracterizar os óleos essenciais contidos na casca dos frutos de tangerineiras enxertadas sobre seis diferentes porta-enxertos e verificar os efeitos da sazonalidade no seu teor e composição; assim como verificar as diferenças de rendimento e caracterizar quanto à composição os óleos essenciais de frutos verdes do raleio de tangerineiras obtidos pelos métodos de extração laboratorial (hidrodestilação) e industrial (escarificação); além de analisar a composição dos óleos essenciais de folhas de diferentes genótipos de tangerineiras e tangores (*petitgrain*) extraídos através dos métodos de arraste a vapor e hidrodestilação.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Importância econômica dos Citros

As plantas cítricas apresentam centro de origem no Sudeste do Continente Asiático, com ramos filogenéticos distribuídos em toda a região das monções, desde o oeste do Paquistão até as regiões centro-norte e sul da China, Nova Guiné, arquipélago de Bismarck, nordeste da Austrália, Nova Caledônia, Melanésia e ilhas da Polinésia Ocidental (Swingle & Reece, 1967; Soost & Cameron, 1975; Donadio *et al.*, 2005; Wu *et al.*, 2018). No Brasil, os citros encontraram melhores condições de desenvolvimento do que nas próprias regiões de origem, expandindo-se por todo o país (Donadio *et al.*, 2005). Segundo Donadio *et al.* (2005), a citricultura inicialmente se desenvolveu mais nos estados de São Paulo, Rio de Janeiro e Bahia, e no Rio Grande do Sul apenas a partir de 1760, começando no Vale do Rio Taquari e expandindo-se para o Vale do Caí. Ainda de acordo com Donadio *et al.* (2005), na região central, as missões religiosas e os bandeirantes que avançavam pelo interior do país tiveram influência na dispersão dos citros por toda a parte, como às margens de rios no Mato Grosso, em 1867, bem como no Ceará por volta de 1880.

No Rio Grande do Sul os imigrantes açorianos e seus descendentes foram os responsáveis pela introdução dos citros no Vale do Rio Taquari, no final do século XVIII, posteriormente vieram os imigrantes alemães que deram continuidade à atividade, principalmente no Vale do Rio Caí, no início do século XX. A citricultura se

desenvolveu paralelamente nestes dois Vales, mas o Vale do Caí assumiu posição de liderança pela sua maior proximidade em relação à capital (Dornelles, 1978). De acordo com João (2010) e João & Conte (2018), a citricultura apresenta grande importância para o desenvolvimento econômico, social e ambiental de grande número de municípios gaúchos, envolvendo cerca de 12.000 famílias de agricultores, principalmente familiares.

Os citros pertencem à família Rutaceae, subfamília Aurantioideae, tribo Citreae, subtribo Citrinae, englobando vários gêneros, tais como o *Citrus*, *Fortunella* e *Poncirus*, além de híbridos (Swingle; Reece, 1967). Dentre as espécies do gênero *Citrus* destacam-se: laranjeiras-doces (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck), tangerineiras (*C. reticulata* Blanco, *C. deliciosa* Tenore, *C. unshiu* Marcovitch, *C. clementina* Hort. ex Tan.), limoeiros (*C. limon* L. Burm.f.), limeiras ácidas (*C. latifolia* Tanaka e *C. aurantiifolia* (Christm.) Swingle), limeiras-doces (*C. limettioides* Tanaka), pomeleiros (*C. paradisi* Macfadyen), cidreiras (*C. medica* L.), laranjeiras-azedas (*C. aurantium* L.) e toranjeiras (*C. maxima* (Burman) Merri) (Lopes *et al.*, 2011).

Dentro do gênero *Citrus*, as tangerineiras são as de cultivo mais distribuído no mundo, em função de sua maior adaptabilidade a diferentes condições de cultivo, especialmente pela tolerância ao frio (Saunt, 2000; Oliveira *et al.*, 2018). Devido às suas características hortícolas e de seus frutos, as tangerineiras são divididas em cinco grupos: Ponkans (*C. reticulata*), Satsumas (*C. unshiu*), Mexeriqueiras ou Tangerineiras do Mediterrâneo (*C. deliciosa*), Clementinas (*C. Clementina*), e Outros (outras espécies de tangerineiras e híbridos) (Schwarz, 2009).

De acordo com João (2010), as cultivares mais utilizadas no RS são do grupo das mexericas (*C. deliciosa*). Estas somam 61% da área de tangerineiras, composta por ‘Montenegrina’ com 30%, ‘Comum’/‘Caí’ com 25 % e ‘Pareci’ com 6 %. Seguem em

ordem de importância as seguintes cultivares: ‘Ponkan’ (*C. reticulata* Blanco) com 15 %, ‘Murcott’ (*C. sinensis* × *C. reticulata*) com 15% e ‘Okitsu’ (*C. unshiu* Marcovitch) com 5% e por volta de 4% para outras cultivares, tais como: o tangoreiro ‘Ortanique’, o tangeleiro ‘Nova’ e tangerineiras do grupo das clementinas (*C. clementina* Hort. ex Tan.). No Estado de São Paulo, principal produtor brasileiro, destacam-se a tangerineira ‘Ponkan’ juntamente com o tangoreiro ‘Murcott’ (Pio *et al.*, 2005).

A despeito da concentração de cultivo da tangerineira ‘Montenegrina’, é interessante destacar que a diversificação varietal é uma característica dos pomares de citros do RS, sendo um dos estados onde se utiliza o maior número de cultivares (Köller, 2009; Schwarz *et al.*, 2010; Oliveira *et al.*, 2011; Oliveira; Scivittaro, 2014). Há também áreas significativas cultivadas com ‘Caí’, ‘Clemenules’, ‘Pareci’, ‘Ponkan’, ‘Okitsu’ e ‘Rainha’, e com os híbridos ‘Dekopon’, ‘Murcott’, ‘Nadorcott’, ‘Nova’ e ‘Ortanique’ (Oliveira *et al.*, 2018).

De acordo com os dados consolidados da FAO de 2018, o Brasil é o segundo colocado no ranking de produtores de frutas cítricas, com produção de 19,2 milhões de toneladas e lidera o ranking mundial em relação à produção de laranjas (16,7 milhões t), sendo também o maior exportador do seu suco (FAO, 2020). A laranja é a principal fruta produzida no país, seguida pela banana (6,8 milhões t) (IBGE, 2020). O Estado do Rio Grande do Sul (RS) é o quinto colocado em produção citros (531 mil t), entretanto em tangerinas, o RS é o terceiro maior produtor da fruta no país (144,2 mil t) (IBGE, 2020). Dentre as regiões citrícolas do estado, o Vale do Caí destaca-se amplamente na produção de tangerinas destinadas, principalmente, para o consumo *in natura*, além da produção de suco e a industrialização do óleo essencial processado por várias indústrias localizadas na região (João & Conte, 2018).

Dentro do setor citrícola, a extração de óleos essenciais tem adquirido destaque, encontrando-se o Brasil entre os principais fornecedores do produto no mercado mundial, ao lado da Índia, China e Indonésia (Bizzo *et al.*, 2009; Zulian *et al.*, 2013). O óleo essencial de laranja, o limoneno, os terpenos cítricos e o farelo de polpa são subprodutos industriais que têm adquirido importância econômica no setor de exportação citrícola (CITRUSB, 2020).

## 2.2 Óleos Essenciais

Acredita-se que a exploração dos óleos essenciais (OE) teve início no Oriente, ainda antes de Cristo, sendo os principais centros de produção a Índia, Pérsia e Egito (Ootani *et al.*, 2013). O advento da química fina impulsionou a atividade, ampliando a sua utilização e aplicações científicas (De La Rosa *et al.*, 2010; Soraya, 2011; Ootani *et al.*, 2013).

Originadas na chamada revolução industrial do final do século XIX, as indústrias de alimentos, cosméticos, perfumes e produtos de limpeza cresceram em todo o mundo, sendo que a expansão econômica ocorrida na segunda metade do século XX responsável pelo incremento da demanda e importância dos OE (Maia, 2014).

Os OE são misturas complexas de muitos compostos orgânicos, obtidos através da destilação de folhas ou outros órgãos de plantas aromáticas, e condensados à temperatura ambiente (Franz & Novak, 2010; Maia, 2014). Portanto, o termo “óleo essencial” na verdade define o produto obtido por um processo de extração de substâncias voláteis presentes nos tecidos vegetais, e não uma substância específica (Maia, 2014). A ISO (*International Organization for Standardization* – Organização Internacional para Padronização) define OE como sendo os produtos obtidos a partir de partes de plantas via arraste a vapor d'água e raspagem/prensagem dos pericarpos de

frutos cítricos, tratando-se de uma mistura relativamente complexa de substâncias voláteis, lipofílicas e líquidas, com aspecto oleoso à temperatura ambiente, de onde surge a denominação "óleo essencial" (Pauletti & Silvestre, 2018).

O conjunto de substâncias químicas voláteis encontradas nos OE é constituído de classes de ésteres de ácidos graxos, mono e sesquiterpenos, fenilpropanos, aldeídos e, em alguns casos, por hidrocarbonetos alifáticos, entre outros (Santos *et al.*, 2004). Os terpenos são constituídos de duas ou mais unidades isoprênicas, cada molécula de isopreno é formada por cinco átomos de carbono (C5), e conforme o tamanho da molécula os terpenóides recebem denominação diferente: os monoterpênos são formados por duas unidades isoprênicas (C10) (como o mentol, linalol, limoneno e citral, por exemplo); os sesquiterpenos são formados por três unidades isoprênicas (C15) ( $\alpha$ -selineno e  $\beta$ -cariofileno); os diterpenos são formados por quatro unidades isoprênicas (C20), os sesterpenos são formados por cinco unidades isoprênicas (C25) e os triterpenos são formados por seis unidades isoprênicas (C30) (Tabela 1).

TABELA 1. Condensação de unidades de isopreno na formação de terpenóides. *Fonte:* Simões & Spitzer, 2001.

Nº de Unid.	Número de átomos de carbono	Nome ou classe
1	5	isopreno
2	10	monoterpenóides
3	15	sesquiterpenóides
4	20	diterpenóides
5	25	sesterpenos
6	30	triterpenóides
8	40	tetraterpenóides
n	n	polisoprenóides

Os monoterpênos e os sesquiterpenos são frequentemente encontrados na natureza e responsáveis por grande parte das atividades biológicas dos OE. A atividade bioativa e

fungistática dos OE têm sido utilizadas com ação inseticida, antibacteriana, antiséptica e fungicida (Ootani *et al.*, 2013).

Os OE podem estar localizados em estruturas secretoras especiais, como cavidades, canais, pêlos glandulares, células parenquimáticas diferenciadas, assim como também podem ser armazenados em flores, folhas, casca do tronco, madeira, raízes, frutos e sementes, variando quanto à sua composição de acordo com a localização na planta até em uma mesma espécie (Queiroga *et al.*, 1990; Janssen *et al.*, 1987; Coutinho *et al.*, 2006).

## **2.3 Óleos Essenciais de Citros**

### **2.3.1 Mercado de Óleos Essenciais**

Conforme dados da FAO (2020), em 2017 o Brasil situava-se como o maior exportador do mundo em volume de OE (54 mil t), mas ocupava a quarta posição quanto aos valores obtidos com a exportação (US\$ 431 milhões). Segundo Bizzo *et al.* (2009), 91% deste volume total é constituído por OE cítricos, principalmente de laranja (86%), subproduto da indústria de sucos, e de baixa valorização pelo mercado (US\$ 2,18/kg), seguido pelo OE de limão (8%), lima (3%) e outros cítricos, como toranja, cidra, tangerinas (2%) e os de bergamoto e *petit grain* (1%). Aproximadamente 87% da produção brasileira de citros é de laranjas (FAO, 2020) e destas, aproximadamente 70% é destinada a fabricação de sucos, situando-nos como maiores exportadores de suco congelado de frutas cítricas e juntamente ao processo de extração do suco também são extraídos os óleos essenciais da casca destes frutos (Simas *et al.*, 2015).

Segundo o AGROSTAT (2020), em 2019, o Brasil alcançou um volume de exportação superior a 56 mil toneladas de óleos essenciais a partir de plantas cítricas, movimentando cerca de US\$ 301 milhões.

Segundo Bizzo *et al.* (2009) o Brasil produz e exporta por ordem de importância, os óleos de laranja, limão, eucalipto, pau-rosa, lima, capim-limão, entre outros, sendo que os principais óleos comercializados mundialmente até 2009 podem ser observados na Tabela 2. Já na Tabela 3 podem ser observados os principais produtores mundiais em relação à quantidade produzida de OE em 2017 (FAO, 2020).

TABELA 2. Os principais óleos essenciais no mercado mundial. Adaptado de Bizzo *et al.*, 2009.

Óleo essencial	Espécie
Laranja	<i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck
Menta	<i>Mentha arvensis</i> L. f. <i>piperascens</i> Malinv. ex. Holmes
Eucalipto (tipo cineol)	<i>Corymbia globulus</i> Labill., <i>C. polybractea</i> R.T. Baker e <i>Corymbia</i> spp.
Citronela	<i>Cymbopogon winterianus</i> Jowitt e <i>C. nordus</i> (L.) Rendle
Hortelã-pimenta	<i>Mentha x piperita</i> L.
Limão	<i>C. limon</i> (L.) N.L. Burm.
Eucalipto (tipo citronela)	<i>C. citriodora</i> Hook.
Cravo-da-índia	<i>Syzygium aromaticum</i> (L.) Merr. e L. M. Perry
Cedro	<i>Juniperus virginiana</i> L. e <i>J. ashei</i> Buchholz
Lima	<i>C. aurantifolia</i> (Christm. & Panz.) Swingle

TABELA 3. Os maiores exportadores mundiais de óleos essenciais em quantidade de óleo essencial (t) e valor obtido com as exportações (US\$). Fonte: FAO, 2020.

País	Quantidade (t)	Valor (US\$)
<b>Brasil</b>	53.794	431.217.000
<b>EUA</b>	38.729	729.606.000
<b>Índia</b>	29.473	784.705.000
<b>China</b>	23.054	368.941.000
<b>Holanda</b>	11.908	207.624.000
<b>México</b>	10.284	160.897.000
<b>Reino Unido</b>	7.496	272.261.000
<b>Alemanha</b>	7.388	218.918.000
<b>França</b>	6.856	470.252.000
<b>Argentina</b>	6.717	203.718.000
<b>Mundo</b>	264.898	5.498.966.000

A produção nacional de OE é insuficiente para atender a demanda interna, tanto que a indústria nacional importa grande parte da diversidade dos OE demandados pelo mercado nacional, mesmo que o país possua espécies com acentuado aroma, cujo valor ainda permanece desconhecido (IAC, 2005). De acordo com Bizzo (2013), o Brasil tem vantagens na disputa de mercados de OE, pois lideramos a produção de OE cítrico, possuímos uma das maiores biodiversidades do planeta, além de grande diversidade étnica e cultural associada ao uso de plantas bioativas. Deste modo, o setor de produção de OE demonstra potencial de contribuir na geração de divisas neste setor que movimenta cerca de US\$ 15 bilhões/ano (Bizzo, 2013).

As substâncias presentes nos OE possuem diversas aplicações, sendo que o fracionamento e purificação dos diversos componentes presentes no óleo essencial pode ser feito para obter frações concentradas, ampliando a utilização destas substâncias em produtos de maior valor agregado como a química fina e cosmética (Pauletti & Silvestre, 2018).

### **2.3.2 Métodos de Extração de óleos essenciais**

Ao longo do tempo, diversos equipamentos foram desenvolvidos para obtenção de OE, tanto para produção em grande escala nas indústrias quanto para fins de pesquisa científica (Guenther, 1948; Maia, 2014). Podem ser empregados diversos métodos no processo de extração, como: hidrodestilação, arraste a vapor, maceração, extração por solvente, enfleuragem, gases supercríticos e microondas (Santos *et al.*, 2004). Dentre estes métodos, o de maior aplicação tem sido o de hidrodestilação, sendo o sistema proposto por Clevenger em 1928, o mais conhecido e utilizado em escala laboratorial, podendo operar em circuito aberto e fechado, realizando a destilação por arraste a vapor (Santos *et al.*, 2004; Maia, 2014).

No método de arraste a vapor, a matéria prima é colocada sobre uma superfície perfurada, evitando o contato direto com a água em ebulição, ou ainda, é exposta a vapor de água gerado por outras fontes de calor (como caldeiras ou autoclaves, por exemplo), sendo que o vapor de água percorre o material arrastando somente os compostos voláteis (Figura 1) (Oliveira *et al.*, 2012). O método de arraste a vapor é o método mais empregado industrialmente a nível nacional e mundial, tratando-se de um processo em que os voláteis são arrastados do material vegetal pelo vapor de água saturado seco, sendo que a mistura de óleo condensado e água (hidrolato) separa-se em camadas pela diferença de densidade e pela imiscibilidade entre as duas fases (Koketsu & Gonçalves, 1991; Leal, 2008).

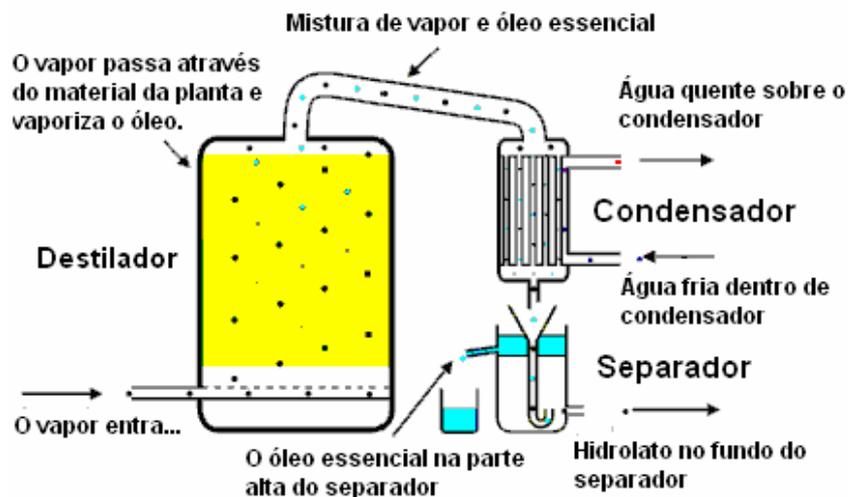


FIGURA 1. Ilustração de destilador a vapor. Fonte: Oliveira & Jose, 2007.

Já no método de hidrodestilação o material a ser destilado permanece em contato direto com a água, e quando esta entra em ebulição (temperatura inferior a 100°C) promove o arraste dos compostos voláteis, formando uma mistura heterogênea de duas fases, devido à diferença de polaridade entre o óleo e a água. Este método utiliza o aparelho Clevenger (Figura 2) (Oliveira *et al.*, 2012). A hidrodestilação é o método mais antigo de extração, dito artesanal, contudo, bastante empregado em escala laboratorial (Silveira *et al.*, 2012). Mostra-se extremamente versátil, podendo ser

utilizado para a extração de OE de diferentes tipos de estruturas vegetais: flores, frutos, folhas, rizomas, raízes, sementes, cascas, castanhas e galhos (Leal, 2008). Contudo, devido às reações de hidrólise, nas quais a água reage com ésteres, formando álcoois e ácidos carboxílicos, sendo responsável por alterações importantes na composição do óleo essencial obtido, o que pode acarretar em redução da qualidade e valor dos óleos essenciais extraídos por esse método (Leal, 2008).

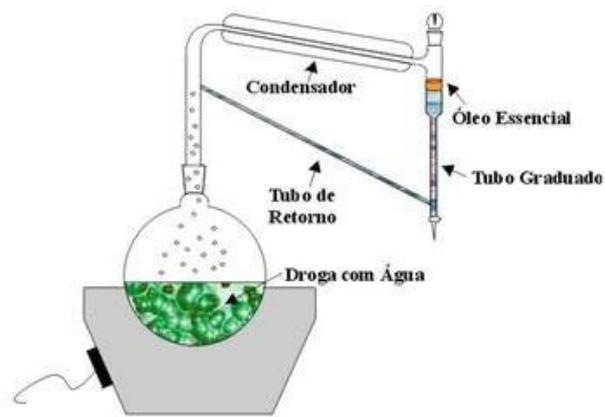


FIGURA 2. Ilustração de aparelho Clevenger *Fonte: NEPLAME, 2020.*

O OE cítrico extraído por prensagem nas indústrias de suco é obtido em dois estágios: esmagamento e ruptura das células oleíferas da superfície dos frutos, sendo este óleo direcionado por jatos de água, evitando que ocorra mistura com o suco do interior do fruto; sedimentação da mistura de água e óleo, havendo a separação da fração de óleo da água (Figura 3). Desta prensagem da casca a indústria produz um terpeno cítrico de boa pureza, comercializado como terpeno cítrico ou limoneno (Lara & Maia, 2014).

A extração por prensagem a frio é o método mais empregado para a extração de OE de frutos cítricos em geral, fazendo uso de uma prensa hidráulica, os frutos sofrem esmagamento que retira o suco e o OE simultaneamente, sendo este separado dos resíduos por uma série de processos de decantação, centrifugação e polimento

(Azambuja, 2016). Nesse processo, durante a compressão da fruta na extratora, o OE é arrastado por jatos de água, sendo a água separada por prensas com peneiras para evitar a extração de pectina e sólidos solúveis. A emulsão resultante, contendo de 1% a 3% de OE, é conduzida a uma separadora centrífuga que o concentra em 70% a 80%. Após a centrifugação, o óleo é conduzido a um tanque inoxidável para a separação das ceras (Rodrigues *et al.*, 1980; Santos, 2013).



FIGURA 3. Etapa inicial do processo de extração industrial: emulsão rica em óleo essencial de laranja  
Fonte: Ecocitrus, 2020.

No Rio Grande do Sul, a técnica comumente empregada para a extração de OE de frutos cítricos difere da usual no Sudeste do país, sendo que os frutos de tangerineiras ainda em estado imaturo (verdes) são submetidos a um processo de “ralagem” ou escarificação do epicarpo (Figura 4). O óleo obtido neste procedimento passa por processos de decantação e centrifugação, originando assim o denominado “óleo de mandarina verde”, bastante valorizado no mercado internacional (Ecocitrus, 2020). A extração do OE de mandarina verde é feita a partir de frutos retirados por meio de uma prática de manejo usual por produtores que visam a comercialização *in natura* de frutos de qualidade, assim como a regularidade da produção em tangerineiras: o raleio manual de frutos (Rodrigues *et al.*, 1998; Koller, 2009). A comercialização dos frutos provenientes do raleio para a extração de OE tem possibilitado o retorno econômico de

parte dos gastos despendidos pelos citricultores em mão de obra para a realização desta operação (Ecocitrus, 2020).

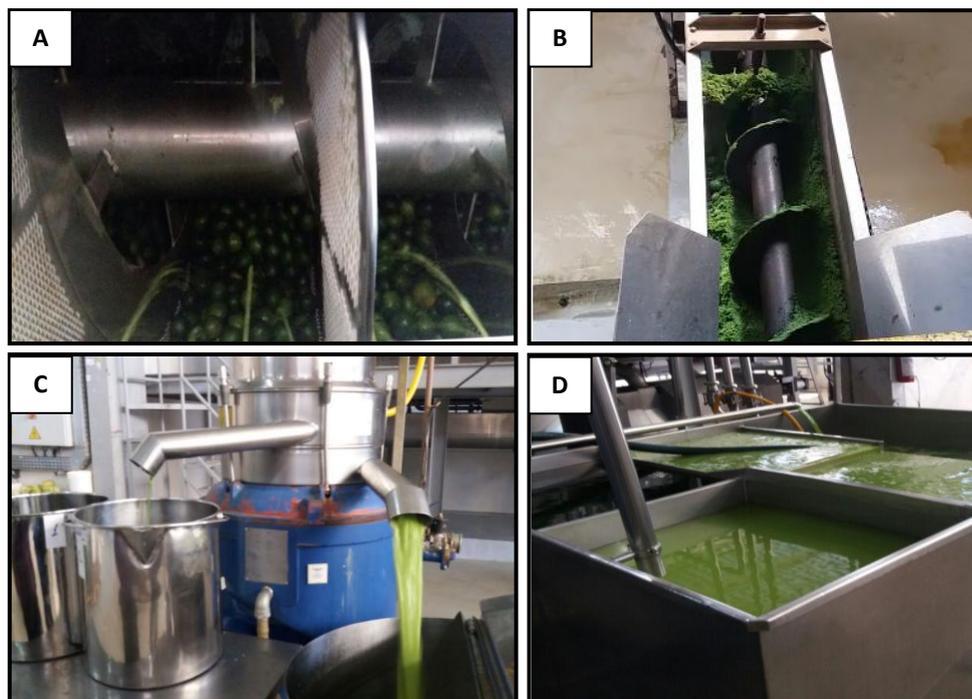


FIGURA 4. Etapas do processo de extração de óleo de mandarina verde: A. Escarificação dos frutos; B. Esmagamento dos pericarpos; C. Mistura contendo óleos essenciais; D. Decantação e centrifugação. *Fonte: ECOCITRUS, 2020.*

### 2.3.3 Composição dos óleos essenciais

Os constituintes químicos produzidos pelos vegetais são classificados em dois grandes grupos: os essenciais à sobrevivência de todas as espécies vegetais (metabólitos primários) e os sintetizados por outras rotas metabólicas e de natureza complexa, de baixo peso molecular e marcantes atividades biológicas (metabólitos secundários) (Poser & Mentz, 2001).

Acreditava-se que os metabólitos secundários seriam apenas subprodutos do metabolismo primário, meros produtos de excreção do vegetal e não aparentavam ter grande utilidade na sobrevivência das plantas (Steffens, 2010). No entanto, o fato de o vegetal utilizar rotas biossintéticas tão elaboradas e que consomem grande quantidade de energia para sintetizar esses compostos embasa a teoria mais aceita atualmente: os vegetais

necessitam desses compostos para a sua sobrevivência e preservação, seja através da defesa proporcionada por toxinas, atração de inimigos naturais ou dispersores de sementes, repelência de herbívoros, alelopatia, proteção contra raios UV, dentre outros (Poser & Mentz, 2001).

A origem de todos os metabólitos ditos secundários pode se dar através de duas vias: mevalonato (MEV), a partir do ácido mevalônico; ou metiletritolfosfato (MEP), a partir do metileritritol fosfato (Figura 5). Segundo Dewick (2009), por muitos anos acreditou-se que partes da via MEV eram comuns a todos os terpenos naturais. Entretanto, estudos posteriores comprovaram a existência de uma rota biossintética alternativa, a via MEP, caminho mais amplamente usado na natureza do que a própria MEV.

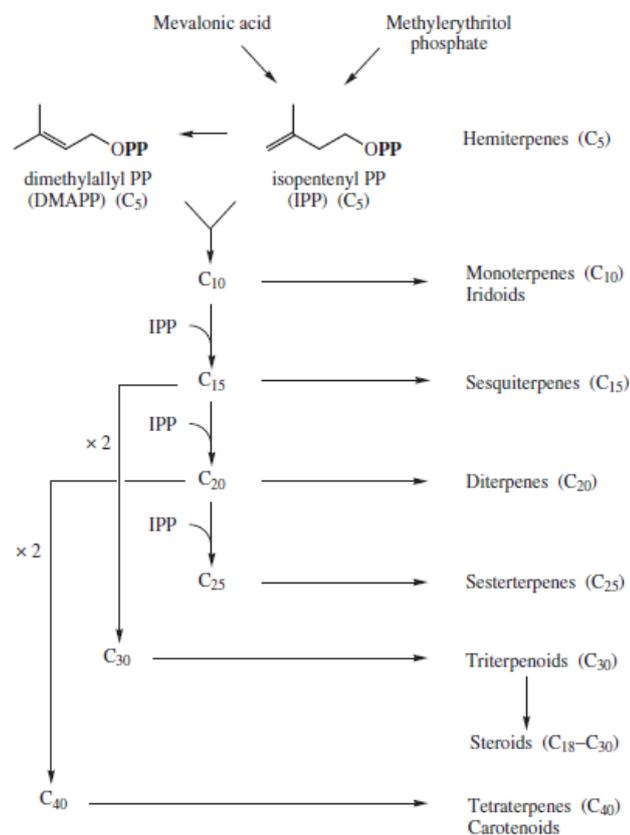


FIGURA 5. Ciclo biossintético dos metabólitos secundários. *Fonte:* Dewick, 2009.

A grande maioria dos OE é constituída de derivados de fenilpropanóides (formados a partir do ácido chiquímico) ou terpenóides (formados de unidades de

isopreno, que por sua vez origina-se do ácido mevalônico e do metileritritolfosfato), sendo que esses últimos são os mais abundantes (Simões & Spitzer, 2001).

Dentre os terpenóides ou terpenos, os mais frequentes nos OE em geral são os monoterpenos (cerca de 90% dos óleos voláteis) e os sesquiterpenos (Simões & Spitzer, 2001). Os monoterpenos podem ser divididos em três subgrupos: acíclicos (mirceno, linalol, geraniol), monocíclicos ( $\alpha$ -terpineol e terpinoleno) e bicíclicos ( $\alpha$ -pineno, tujona, cânfora, fenchona). Em cada um desses subgrupos há outras classificações: hidrocarbonetos insaturados (limoneno), alcoóis (mentol), aldeídos ou cetonas (carvona, mentona), lactonas e tropolonas (Simões & Spitzer, 2001).

Os OE de frutos de citros são constituídos basicamente por monoterpenos e sesquiterpenos (totalizando de 94 a 98% da composição total do óleo) (Simões & Spitzer, 2001). De acordo com Mehl *et al.* (2014), o limoneno é o componente principal dos óleos essenciais de citros (30% a 97% dependendo da espécie), e outros componentes que contribuem para a composição do perfil químico são:  $\alpha$  e  $\beta$ -pineno (~ 0,3% até ~15%),  $\gamma$ -terpineno (~ 10%), mirceno (~ 3%), entre outros (Simas *et al.*, 2014). Os outros compostos, como:  $\gamma$ -terpineno, geraniol, citral, valenceno,  $\alpha$ -pineno, sabineno, mirceno e linalol, estão presentes em quantidades muito variáveis, dependendo da espécie, ambiente, tecnologia produtiva, época de colheita e combinação porta enxerto-variedade copa (Pauletti & Silvestre, 2018). A Figura 6 apresenta as fórmulas estruturais de algumas destas substâncias.

Além dos terpenos existe uma grande diversidade de outros compostos, como os flavonóides e as cumarinas, mas suas concentrações, comparativamente aos terpenos, são muito baixas (traços), e apresentam grande variação conforme as condições ambientais e metabólicas das plantas (Pauletti & Silvestre, 2018).

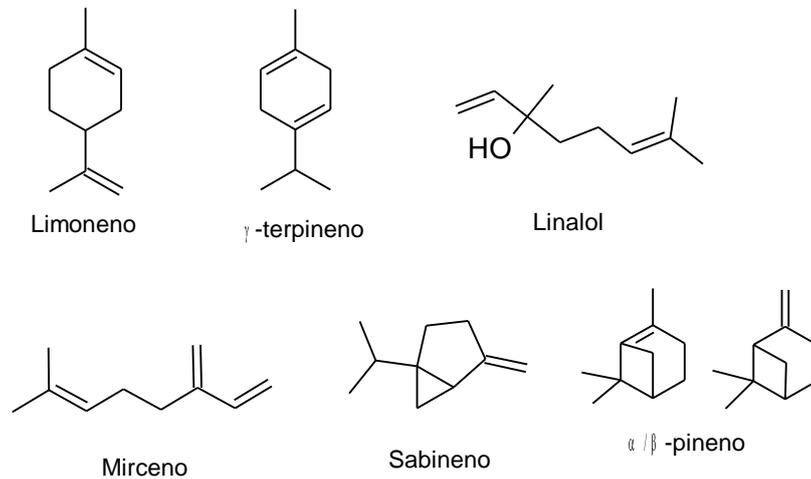


FIGURA 6. Estrutura molecular de alguns constituintes dos óleos essenciais de citros. *Fonte:* Pauletti & Silvestre, 2018.

Conforme Simas *et al.* (2015), o teor e composição dos OE varia entre as diferentes espécies e até mesmo entre as cultivares de uma mesma espécie de citros, conferindo variadas composições e possibilidades de utilização de cada cultivar. Bourgou *et al.* (2012) em experimento realizado na Tunísia, demonstrou que a composição química, a atividade antibacteriana e os teores de OE de *C. aurantium*, *C. limon*, *C. sinensis* e *C. reticulata* também sofrem alterações durante o processo de amadurecimento dos frutos, sendo o nível mais alto de limoneno alcançado no estágio imaturo.

O limoneno é um dos principais componentes dos OE de citros e ele é facilmente isolado, sendo que dependendo do processo utilizado pode atingir altos níveis de pureza e consequentemente adquirindo maior qualidade e remuneração (Lara, 2014). Este composto tem uma ampla gama de aplicações devido às suas características peculiares, que por tratar-se de uma molécula dielétrica, permite seu uso na limpeza industrial de circuitos painéis elétricos em funcionamento, sem danos se usada conforme normas e técnicas específicas; possui ainda potencial para ser usada como solvente orgânico (Lara, 2014).

Quanto à localização, os óleos essenciais podem ocorrer em estruturas secretoras especializadas, como pêlos glandulares (Lamiaceae), células parenquimáticas diferenciadas (Lauraceae, Piperaceae, Poaceae), canais oleíferos (Apiaceae) ou cavidades lisígenas ou esquizo-lisígenas (Pinaceae e Rutaceae). Sendo que podem estar estocados em órgãos como flores (citros), folhas (capim-limão, eucalipto, citros), cascas dos caules (canelas), madeira (sândalo, pau-rosa), raízes (vetiver), rizomas (cúrcuma, gengibre), frutos (funcho, erva-doce, citros) ou sementes (noz-moscada) (Simões & Spitzer, 2001).

Em citros os OE são obtidos principalmente da casca dos frutos, estudos genômicos apontam que genes relevantes para a biossíntese de OE em citros são altamente expressos na casca de frutos de citros quando comparados a outros tecidos e órgãos dessas espécies (Dornelas & Mazzafera, 2007). De acordo com Voo *et al.* (2012), em citros a região pigmentada do epicarpo, chamada de flavedo, contém inúmeras glândulas de óleo, consistindo em cavidades secretoras que são revestidas por várias camadas de células epiteliais especializadas. Conforme Knight *et al.* (2001), o início do desenvolvimento das cavidades ou glândulas secretoras de OE foi restrito aos estádios iniciais do desenvolvimento dos frutos da cultivar Washington Navel (*C. sinensis*), mas todas continuaram aumentando em diâmetro ao longo do crescimento dos frutos. Ainda de acordo com Knight *et al.* (2001), análises de microscopia eletrônica sugerem que as glândulas de *C. sinensis* são anatomicamente semelhantes às de outras espécies de citros.

Também podem ser extraídos OE das folhas de plantas cítricas, sendo que o OE obtido destas recebe a denominação específica de *petitgrain* ('pequeno grão' em francês), assim chamado devido a este tipo de óleo ser extraído originalmente das folhas e botões florais da laranjeira azeda (*C. aurantium*). Contudo, hoje o termo *petitgrain* é

utilizado para OE extraído de folhas de qualquer espécie de *Citrus* (Pauletti & Silvestre, 2018). Além da presença em folhas e na casca dos frutos, as glândulas de óleo essencial estão presentes, também em estruturas florais dos citros (sépalas, pétalas, paredes do ovário) (Teixeira *et al.*, 2014).

Nos citros tanto os frutos quanto folhas e flores são bastante aromáticos, nas folhas os OE permanecem armazenados em glândulas cobertas por uma camada de células epidérmicas, comumente pequenas e com parede espessa que facilitam a secreção do OE a partir do rompimento de células que compõe as glândulas de origem lisígena, geralmente situadas na face adaxial das folhas na região do parênquima paliçádico (Queiroz-Voltan & Blumer, 2005; Almeida, 2013).

De acordo com Frizzo *et al.* (2004), os OE das tangerinas ‘Caí’ e ‘Montenegrina’ possuem características químicas semelhantes às do OE de mandarina italiano, demonstrando potencial de processamento diferenciado destes frutos para obtenção de OE de maior valorização comercial, principalmente no que diz respeito à exportação, permitindo remuneração diferenciada ao citricultor, o que fomenta um nicho de mercado em ascensão, o cultivo de tangerinas destinadas exclusivamente à extração de OE. A maior valorização comercial do OE de *C. deliciosa*, provavelmente pode ser atribuída aos teores elevados de  $\gamma$ -terpineno, característica também observada nas cultivares de mandarina italiana Avana e Tardivo di Ciaculli (*C. deliciosa*). De acordo com Fang *et al.* (2004), o limoneno é relativamente instável quando exposto à altas temperaturas, bem como à luminosidade, não sendo um flavorizante tão importante. O  $\gamma$ -terpineno isolado chega a ser 40% mais valorizado do que o limoneno, sendo comercializado a mais de US\$ 500/L, enquanto o limoneno a pouco mais de US\$ 300/L (True Terpenes, 2020). Estudo de Silvestre *et al.* (2016), evidenciou que o fracionamento do OE de mandarina verde (*C. deliciosa*) extraído em agroindústria

permite aumentos de até 25 vezes na concentração de alguns compostos, constituindo uma alternativa para agregação de valor ao OE.

Devido ao tipo de extração e a parte da planta utilizada (folhas), o *petitgrain* possui composição muito diferente dos OE obtidos da casca de frutas de mesma espécie, apresentando como compostos majoritários aqueles presentes em baixas concentrações ou até mesmo ausentes no OE da casca dos frutos cítricos (Pauletti & Silvestre, 2018). A diversidade de composição confere aromas e nuances que são de interesse da indústria cosmética, farmacêutica, química e de perfumaria, devido às notas mais suaves do aroma em relação ao óleo proveniente da casca da fruta (Pauletti & Silvestre, 2018).

Ainda de acordo com Pauletti & Silvestre (2018), a dificuldade de obtenção contribui para a valorização do *petitgrain*, pois o mesmo necessita de extração em equipamento especializado (extrator a vapor), demanda maior dispêndio de energia, e apresenta menor rendimento de extração, pois o teor de OE nas folhas (0,10 a 0,45%) de plantas cítricas é bastante inferior ao na casca dos frutos (0,25 a 1,29%) (Lota *et al.*, 2000; Teixeira *et al.*, 2014)

#### **2.3.4 Fatores que influenciam a composição dos OE**

A composição química dos OE é determinada geneticamente, contudo, alguns fatores podem acarretar modificações no metabolismo secundário, sendo estes, principalmente: climáticos (temperatura, pluviosidade, intensidade de luz, efeito sazonal) e edáficos (nutrição, disponibilidade hídrica e condições físicas/biológicas do solo) (Morais, 2009).

Ainda de acordo com Morais (2009), os OE representam uma interface química entre as plantas e o meio ambiente, sendo que além dos fatores abióticos já citados, a idade e o estágio de desenvolvimento da planta, a época e horário de coleta, assim como

as técnicas de colheita e pós-colheita, podem exercer influência conjunta até mesmo com os fatores bióticos, redirecionando rotas metabólicas e promovendo a biossíntese de diferentes compostos.

De acordo com Simões & Spitzer (2001), a composição química, os caracteres físico-químicos e o aroma podem ser consideravelmente distintos conforme o órgão da planta utilizada no procedimento de extração. Bem como em função do método de extração utilizado, que influencia na composição e nos teores de OE (Cassel *et al.*, 2009; Bourgou *et al.*, 2012).

Sabe-se que a escolha da cultivar a ser empregada como porta-enxerto também é capaz de influenciar várias características hortícolas e fitopatológicas, sendo tanto a qualidade dos frutos quanto a produtividade relacionada com esta escolha, dentre outros fatores (Schäfer *et al.*, 2001). No que se refere a relação entre a cultivar porta-enxerto e copa, estudos de Verzera *et al.* (2003) tendo o bergamote (*C. bergamia*) como copa, consideraram os porta-enxertos ‘Alemow’ (*C. macrophylla* Wester) e limoeiro ‘Volkameriano’ (*C. volkameriana* Ten. & Pasq.) bons substitutos à laranjeira azeda (*C. aurantium*) como porta-enxerto, em desuso devido a sua suscetibilidade ao Vírus da Tristeza dos Citros (CTV), pois demonstraram produtividade e qualidade de OE semelhantes aos desta, principalmente quanto aos conteúdos de linalol e acetato de linalil, importantes constituintes do OE de frutos do bergamote.

### **2.3.5 Principais usos dos óleos essenciais**

Palazzolo *et al.* (2013) em ampla revisão sobre o uso dos OE de citros, destacam os seus diferentes usos industriais: em alimentos e bebidas como flavorizantes e conservantes, devido ao seu potencial antimicrobiano; em medicamentos, pela ação antitumoral, antiulcerogênica e gastoprotetora, efeito diurético, ansiolítico, bem como

eficiência no combate ao reumatismo e taquicardia; em produtos de limpeza, como sanitizantes e detergentes para a limpeza pesada, consistindo em uma alternativa sustentável aos tradicionais solventes; em cosméticos e perfumes, como agentes aromatizantes e clareadores da pele; em aromaterapia, técnica que faz uso terapêutico dos OE para curar, mitigar ou prevenir doenças, infecções e indisposições por meio da inalação, sendo esta uma das terapias que mais crescem no mundo.

Estevam (2017), avaliando a atividade biológica do OE das folhas de *C. limonia* e *C. latifolia*, relata efeito moderado a satisfatório no controle de *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania amazonensis*. De acordo com Gargano (2007), os compostos constituintes dos óleos essenciais de *C. reticulata*, *C. latifolia*, *C. aurantium* apresentaram atividade sinérgica na atividade sedativa e ansiolítica em testes com roedores, não sendo possível identificar a ação isolada das substâncias. Ainda conforme Vasudeva & Sharma (2012), verificou-se atividade antifúngica do OE extraído por hidrodestilação da casca de frutos maduros de *C. limettioides* sobre dez fungos de origem alimentar e dez cepas bacterianas.

A inibição de patógenos, assim como a ação inseticida e moluscicida também são relatadas por Palazzolo *et al.* (2013). Sobre a inibição de patógenos em alimentos, Mishra & Dubey (1994), avaliando a atividade fungitóxica de óleos essenciais extraídos de *C. aurantifolia* (folha), *C. reticulata* (casca dos frutos), *C. sinensis* (casca dos frutos), por meio de hidrodestilação sobre o crescimento de colônias de *Aspergillus flavus* verificaram a inibição de 40 a 80% deste fungo de produtos armazenados. Já Simas *et al.* (2017), verificaram o efeito inibitório do OE de cascas de frutos de *C. latifolia*, *C. aurantifolia* e *C. limonia* sobre o fungo *Botrytis cinerea* que causa grandes perdas na pós-colheita (armazenamento e transporte) na cultura do morangueiro.

Pires e Piccoli (2012) relatam efeito inibitório significativo promovido pelo uso do OE das folhas de *C. aurantifolia* contra a levedura *Candida utilis*, também constatando efeito fungicida dos OE de folhas de *C. limonia* e *C. aurantifolia* sobre *Penicillium expansum*.

Segundo Ootani *et al.* (2013), as atividades bioativas e fungistáticas dos OE estão associadas aos compostos majoritários como citronelal, citronelol e geraniol entre outros constituintes, denominadas de um modo geral como monoterpenos. Ainda conforme Ootani *et al.* (2013), os OE apresentam-se como ferramentas alternativas de manejo de agentes fitopatogênicos, pragas e plantas infestantes na agricultura.

Os OE podem ser utilizados até mesmo em estudos taxonômicos, aliados à marcadores de DNA e características morfológicas permitem o aprofundamento de pesquisas sobre a taxonomia de plantas (Teixeira *et al.*, 2014).

As importantes propriedades bactericidas, virucidas, fungicidas, medicinais e aromáticas tornam os OE produtos com um grande potencial a ser explorado pelo “consumo verde” que tem estimulado o uso e desenvolvimento de produtos derivados de plantas (Palazzolo *et al.*, 2013). Contudo, ainda de acordo com Palazzolo *et al.* (2013) muitos aspectos precisam ser melhorados em relação ao emprego dos OE de citros, como a padronização da composição para OE comerciais, bem como estudos mais aprofundados sobre os compostos ativos e seus mecanismos de ação.

De acordo com Palazzolo *et al.* (2013), a grande importância dos OE de citros reside no fato de estes apresentarem a maior safra de frutos do mundo, sendo responsáveis pela existência de grande disponibilidade desses OE como subproduto da indústria de processamento de sucos. Aproximadamente 50% do peso do fruto de citros consiste em polpa, sementes e casca, sendo que todos podem ser transformados em subprodutos de valor agregado como o melaço, pectinas, fibras, óleos de sementes,

produtos fermentados e OE (Laufenberg *et al.*, 2003). Devido ao baixo custo e fácil acesso a resíduos de frutas cítricas, poluidores ambientais em potencial, a reciclagem da casca, além de apresentar importância ambiental, pode fornecer fibras dietéticas e polifenóis vantajosos com ação antioxidante para os mais diferentes usos (Rafiq *et al.*, 2016).

## 2.4 Referências

- ALMEIDA, L. A. H. **Caracterização química de óleos essenciais em folhas de laranja azeda e mexeriqueira**. 2013. 67p. Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, 2013.
- AZAMBUJA, W. **Métodos de Extração de Óleos Essenciais**. 2016. Disponível em: <<http://www.oleosessenciais.org/metodos-de-extracao-de-oleos-essenciais/>>. Acesso em: 04 de abr. 2020.
- BIZZO, H. R. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 2, p. 588-594, 2009.
- BIZZO, H. R. Óleos essenciais: uma fonte de divisas a ser mais explorada no Brasil. **A Lavoura**, Rio de Janeiro, n. 699, p. 49-53, 2013. Disponível em: <[https://issuu.com/sociedadenedacionaldeagricultura/docs/a\\_lavoura\\_699](https://issuu.com/sociedadenedacionaldeagricultura/docs/a_lavoura_699)>. Acessado em: 14 de abr. 2020.
- BOURGOU, S. et al. Changes of Peel Essential Oil Composition of Four Tunisian Citrus during Fruit Maturation. **The Scientific World Journal**, London, 10p., 2012.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **AGROSTAT** - Estatísticas de Comércio Exterior do Agronegócio Brasileiro: Exportação. Brasília, 2019. Disponível em: <[www.indicadores.agricultura.gov.br/agrostat/index.htm](http://www.indicadores.agricultura.gov.br/agrostat/index.htm)>. Acesso em: 24 de fev. 2020.
- CANO, A.; BERMEJO, A. Influence of rootstock and cultivar on bioactive compounds in citrus peels. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, n. 91, p. 1702-1711, 2011.
- CASSEL, E. et al. Steam distillation modeling for essential oil extraction process. **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, v. 29, p. 171-176, 2009.
- CASTLE, W.S. *Citrus* rootstocks. In: ROM, R.C.; CARLSON, R.F. (Ed.). **Rootstocks for fruits crops**. New York: John Wiley and Sons, 1987. p.361-399.

CASTLE, W.S. A Career Perspective on Citrus Rootstocks, Their Development, and Commercialization. **Hortscience**, Alexandria, v. 45, p. 11-15, 2010.

COUTINHO, D. F. et al. Morphoanatomical study of the leaves of *Ocotea duckei* Vattimo (Lauraceae Lauroideae). **Revista Brasileira Farmacognosia**, São Paulo, v. 16, p. 537-544, 2006.

DEWICK, P. M. **Medicinal Nactural Products: A Biosyntetic Approach**. 3<sup>rd</sup> ed. New York: John Wiley & Sons, 2009. 546p.

DONADIO, L. C. et al. Centros de origem, distribuição geográfica das plantas cítricas e historic da citricultura no Brasil. In: MATTOS JÚNIOR, D. et al. (Ed.) **Citros**. Campinas: Instituto Agronômico, Fundag, 2005. cap. 1

DORNELAS, M. C; MAZZAFERA, P. A genomic approach to characterization of the Citrus terpene synthase gene family. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v.30, p. 832–840, 2007.

DORNELLES, C. **Citricultura no Rio Grande do Sul**. Porto Alegre, Instituto de Pesquisas Agronômicas, 1978. p. 3-9 (Boletim Técnico, 2).

ECOCITRUS. **Raleio: bergamota verde também é lucro**. 2015. Disponível em: <<http://www.ecocitrus.com.br/index.php/noticia/raleio-bergamota-verde-tambem-e-lucro-40>>. Acessado em: 09 de abr. 2020.

ESTEVAM, E. B. B. **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. 91p. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) – Programa de Pós-Graduação em Agroquímica do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano, Rio Verde, 2017.

FANG, T. et al. Combination of Supercritical CO<sub>2</sub> and Vacuum Distillation for the Fractionation of Bergamot Oil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, n. 52, p. 5162-5167, 2004.

FAO – FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Statistic Division**. 2018. Disponível em: <[faostat.fao.org](http://faostat.fao.org)>. Acesso em: 03 abr. 2020.

FERRAZ, J. B. S. et al. Perfumes da floresta Amazônica: em busca de uma alternativa sustentável. **Ciência e Cultura**, São Paulo, v. 61, n. 3, p. 45-53, 2009.

FRIZZO, C. D.; LORENZO, D.; DELLACASA, E. Composition and Seasonal Variation of the Essential Oils from Two Mandarin Cultivars of Southern Brazil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, n. 52, p. 3036-3041, 2004.

GARGANO, A. C. **Estudo da atividade ansiolítica e sedativa do óleo essencial das cascas de frutos de espécies do gênero *Citrus***. 2007. 79 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2007.

GIL-IZQUIERDO, A. et al. Effect of the Rootstock and Interstock Grafted in Lemon Tree (*Citrus limon* (L.) Burm.) on the Flavonoid Content of Lemon Juice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, n. 52, p. 324-331, 2004.

GONZATTO, M. P. **Desempenho hortícola de tangerineiras e híbridos sobre diferentes porta-enxertos no Rio Grande do Sul**. 2015. 185 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2015.

GUENTHER, E. The production of essential oils: methods of distillations, enfleurage, maceration, and extraction with volatile solvents. In: GUENTHER, E. **The essential oils**. New York, 1948. v. 1, cap. 3, p. 85-226.

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Levantamento Sistemático da Produção Agrícola**. 2018. Disponível em: <ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao\_Agricola/Fasciculo\_Indicadores\_IBGE/estProdAgr\_201802.pdf>. Acesso em: 25 mar. 2020.

JANSSEN, A. M.; SCHEFFER, J. J. C.; SWENDSEN, A. B. Antimicrobial activity of essential oils: A 1976-1986 literature review: Aspects of the tests methods. **Planta Médica**, Stuttgart, v. 53, p.395-398, 1987.

JOÃO, P. L. A citricultura no Rio Grande do Sul. In: **Indicações técnicas para a citricultura do Rio Grande do Sul**. Porto Alegre: Fepagro, 2010. cap. 1, p. 15-16.

JOÃO, P. L.; CONTE, A. A citricultura no Rio Grande do Sul. In: EFROM, C. F. S. (Org.) **Citricultura do Rio Grande do Sul: indicações técnicas**. Porto Alegre: Secretaria da Agricultura, Pecuária e Irrigação - SEAPI; DDPA, 2018. p. 2

KNIGHT, T. G.; KLIEBER, A.; SEDGLEY, M. The relationship between oil gland and fruit development in Washington Navel Orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck). **Annals of Botany**, London, v. 88, p. 1039-1047, 2001.

KOLLER, O. C. **Citricultura**: cultura de tangerineiras - tecnologia de produção, pós-colheita e industrialização. Porto Alegre: Editora Rígel, 2009. 400 p.

KOLLER, O. L. (Org.) **Citricultura catarinense**. Florianópolis: Epagri, 2013. 319p.

KOKETSU, M.; GONÇALVES, S. L. **Óleos essenciais e sua extração por arraste a vapor**. Rio de Janeiro: EMBRAPA – CTAA, 1991. 24p. (Documentos, 8)

LARA, O. H. O mercado de óleos essenciais cítricos. In: MAIA, N. B. **Essential Oils in Citrus Plants**. Holambra, SP: Editora Setembro, 2014. 182 p. p. 24-25.

LARA, O. H.; MAIA, N. B. Etapas da obtenção do óleo essencial de citros. In: MAIA, N. B. **Essential Oils in Citrus Plants**. Holambra, SP: Editora Setembro, 2014. 182 p. p. 53-54.

LAUFENBERG, G.; KUNZ, B.; NYSTROEM, M. Transformation of vegetable waste into added products: (A) the upgrading concept, (B) practical implementations.

**Bioresource Technology**, Barking, v. 87, p. 167-198, 2003.

LEAL, P. F. **Estudo comparativo entre os custos de manufatura e as propriedades funcionais de óleos voláteis obtidos por extração supercrítica e destilação por arraste a vapor**. 2008. 307p. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2008.

LOPES, J. M. S. et al. Importância econômica dos citros no Brasil. **Revista Científica Eletrônica de Agronomia**, Garça, n. 20, 2011.

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

MAIA, N. B. (Ed). **Essential Oils in Citrus Plants**. Holambra, SP: Editora Setembro, 2014, 182 p.

MEHL, F. et al. Differentiation of lemon essential oil based on volatile and nonvolatile fractions with various analytical techniques: a metabolomic approach. **Food Chemistry**, London, v. 143, p. 325-335, 2014.

MISHRA, A. K.; DUBEY, N. K. Evaluation of Some Essential Oils for their Toxicity against Fungi Causing Deterioration of Stored Food Commodities. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 60, n. 4, p. 1101-1105, 1994.

MORAIS, L. A. S. de. Influência dos fatores abióticos na composição química dos óleos essenciais. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 27, p. 4050-4063, 2009.

MORAIS, L. A. S. de. Óleos essenciais no controle fitossanitário. In: BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B. (Ed.), **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectiva**. Jaguariúna: EMBRAPA CNPMA, 2009. p. 139-141.

NEPLAME – NÚCLEO DE ESTUDOS E PESQUISAS DE PLANTAS MEDICINAIS. **Início**. [2020]. Disponível em: <<http://www.neplame.univasf.edu.br/>>. Acessado em: 11 de abr. 2020.

OLIVEIRA, R. P. et al. Cultivares-copa. In: OLIVEIRA, R. P.; SCIVITTARO, W. B. (Ed.). **Cultivo de citros sem sementes**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2011. p. 65-108. (Sistema de Produção, 21).

OLIVEIRA, R. P. et al. **Diferenciação das tangerineiras mais cultivadas no Rio Grande do Sul**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2018. 21p. (Documentos, 453).

OLIVEIRA, S. M. M.; JOSE, V. L. A. **Processos de extração de óleos essenciais: Dossiê Técnico**. Serviço Brasileiro de Respostas Técnicas, ITPR (Instituto Tecnológico do Paraná), 2007. 29p. Disponível em: <<http://www.respostatecnica.org.br/dossie-tecnico/downloadsDT/MTgy>>. Acessado em: 14 mar. 2020.

OLIVEIRA, W. P.; SOUZA, M. E. A. O. Comparação dos métodos de extração de óleo essencial de arraste a vapor e hidrodestilação utilizando casca de manga nos estados de

desidratação e *in natura*. In: CONGRESSO NORTE NORDESTE DE PESQUISA E INOVAÇÃO, 7., 2012, Palmas – TO. [Anais]. Palmas, TO, 2012. 7p.

OLIVEIRA, R. P.; SCIVITTARO, W. B. Cadeia produtiva de citros do Rio Grande do Sul. **Citricultura Atual**, Cordeirópolis, v. 100, p. 4-6, 2014.

OOTANI, M. A. et al. Use of Essential Oils in Agriculture. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, Gurupi, v. 4, n. 2, p. 162-174, 2013.

PALAZZOLO, E.; LAUDICINA, V. A.; GERMANÀ, M. A. Current and Potential Use of *Citrus* Essential Oils. **Current Organic Chemistry**, Hilversum, v.17, p. 3042-3049, 2013.

PAULETTI, G. F.; SILVESTRE, W. P. Óleo Essencial Cítrico: produção, composição e fracionamento. In: EFROM, C. F. S.; SOUZA, P. V. D. (Org.). **Citricultura do Rio Grande do Sul**: indicações técnicas. Porto Alegre: Secretaria da Agricultura, Pecuária e Irrigação – SEAPI; DPPA, 2018. 289 p. Cap. 15, p. 245-268, 2018.

PERINI, J. F. et al. Fractioning of orange (*Citrus sinensis* L.) essential oil using vacuum fractional distillation. **Separation Science and Technology**, New York, v. 52, n. 8, p. 1397-1403, 2017.

PIO, R. M. et al. Variedades copas. In: MATTOS JR, D. et al. (Org.). **Citros**. Campinas, SP: Instituto Agrônômico, 2005. p. 37-60.

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**, São Paulo, v. 71, n. 2, p. 378-385, 2012.

POSER, G. L. V.; MENTZ, L. A. Diversidade biológica e sistemas de classificação. In: **FARMACOGNOSIA**: da planta ao medicamento. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS/Ed. da UFSC, 2001. cap.4, p. 63-74.

QUEIROGA, C. L; FUKAI, A.; MARSAIOLI, A. Composition of the essential oil of vassoura. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, Campinas, v. 1, p. 105-109, 1990.

QUEIROZ-VOLTAN, R. B.; BLUMER, S. Morfologia dos Citros. In: MATTOS JR, D. et al. (Org.). **Citros**. Campinas, SP: Instituto Agrônômico, 2005. p. 105-123.

RAFIQ, S. et al. Citrus peel as a source of functional ingredient: a review. **Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences**, [S.l.], v. 17, n. 4, p. 351-358, 2018.

REVISTA CITRUSBR. [São Paulo], Ano 1, n. 4, 2015 Disponível em: <[http://www.citrusbr.com/revista/fevereiro2015/revista\\_citrus\\_0215.pdf](http://www.citrusbr.com/revista/fevereiro2015/revista_citrus_0215.pdf)>. Acesso em: 06 jan. 2020.

RODRIGUES, L. R. et al. **Raleio manual de frutos em tangerineiras ‘Montenegrina’**. [2020]. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/45103/1/RALEIO-MANUAL-DE-FRUTOS-EM-TANGERINEIRAS.pdf>>. Acessado em: 15 mar. 2020.

- RODRIGUES, O. et al. **Citricultura Brasileira**. 2 ed. Campinas: Fundação Cargill, v. 1, 1991, 492 p.
- SANTOS, A. S. et al. Sesquiterpenes on Amazonian Piper Species. **Acta Amazonica**, Manaus, v. 28, n. 2, p. 127-130, 1998.
- SANTOS, A. S. et al. **Descrição de Sistema e de Métodos de Extração de Óleos Essenciais e Determinação de Umidade de Biomassa em Laboratório**. Belém, PA: Embrapa Amazônia Oriental, 2004. 5p. (Comunicado Técnico, n. 99)
- SANTOS, J. Z. dos. **Caracterização química de óleos essenciais de folhas de tangerineiras e híbridos**. 2013. 160p. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Universidade de Brasília, Brasília, 2013.
- SANTOS, R. I. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: FARMACOGNOSIA: da planta ao medicamento. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS/Ed. da UFSC, 2001. cap. 16, p. 333-364.
- SAUNT, J. **Citrus varieties of the world**. Norwich: Sinclair International Limited, 2000. 156 p.
- SCHÄFER, G.; BASTIANEL, M.; DORNELLES, A. L. C. Porta-enxertos utilizados na citricultura. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 31, n. 4, p. 723-733, 2001.
- SCHWARZ, S.F. Melhoramento genético e variedades. In: KOLLER, O. C. (Coord.). **Citricultura, cultura de tangerineiras: tecnologia de produção, pós-colheita e industrialização**. Porto Alegre: Rígel, 2009. p. 35-48.
- SCHWARZ, S. F.; SOUZA, E. L. S.; OLIVEIRA, R. P. Características das variedades copa. In: SOUZA, P. V. D. et al. (Ed.). **Indicações técnicas para a citricultura do Rio Grande do Sul**. Porto Alegre: FEPAGRO, 2010. p. 31-43.
- SCORA, R.W. On the history and origin of Citrus. Bulletin of the Torrey Botanical Club, New York, v.102. p.369-375, 1975.
- SILVEIRA, J. C. et al. Levantamento e análise de métodos de extração de óleos essenciais. **Enciclopédia Biosfera**, Goiânia, v. 8, n. 15, p. 2052, 2012.
- SILVESTRE, W. P. et al. Fractionating of green mandarin (*Citrus deliciosa* Tenore) essential oil by vacuum fractional distillation. **Journal of Food Engineering**, Essex, v. 178, p. 90-94, 2016.
- SIMAS, D. L. R. et al. Caracterização dos óleos essenciais de frutas cítricas. **Citrus Research & Technology**, Cordeirópolis, v. 36, n. 1, p. 15-26, 2015.
- SIMAS, D. L. R. et al. Citrus species essential oils and their components can inhibit or stimulate fungal growth in fruit. **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, v. 98, p. 108-115, 2017.

- SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. **Óleos voláteis**. In: FARMACOGNOSIA: da planta ao medicamento. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS/Ed. da UFSC, 2001. cap. 18, p. 397-426.
- SOOST, R.K.; CAMERON, J.W. Citrus. In: JANICK, J.; MOORE, J.N. (Ed.) **Advances in fruit breeding**. West Lafayette: Purdue University Press, 1975. p.507-540.
- SOUZA, S. A. M. *et al.* Óleos essenciais: aspectos econômicos e sustentáveis. **Enciclopédia Biosfera**, Goiânia, v. 6, n. 10, 11p., 2010.
- SPIEGEL-ROY, P.; GOLDSCHMIDT, E. E. **Biology of Citrus**. Cambridge: Cambridge University Press, 1996. 230 p.
- STEFFENS, A. H. 2010. **Estudo da composição química dos óleos essenciais obtidos por destilação por arraste a vapor em escala laboratorial e industrial**. 2010. 68p. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Tecnologia de Materiais, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 2010.
- SWINGLE, W. T.; REECE, P. C. The botany of citrus and its wild relatives. In: REUTHER, W. L.; WEBBER, H. J.; BATCHELOR, L. D. (Ed.). **The Citrus Industry**. Berkeley: University of California Press, 1967. v. 1, p. 190-430.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Porto Alegre: Artmed, 2004.
- TEIXEIRA, J. P. F.; MARQUES, M. O. M.; PIO, R. M. Caracterização dos óleos essenciais em frutos de nova genótipos de tangerina. **Citrus Research & Technology**. Cordeirópolis, v. 35, n. 1, 2014. p. 1-10.
- TRUE TERPENES. **Isolates**. Disponível em: <<https://trueterpenes.com/>>. [2020]. Acesso em: 10 de mai. 2020.
- WU, G. A. et al. Genomics of the origin and evolution of *Citrus*. **Nature**, London, v. 554, p. 311-316, 2018.
- VASUDEVA, N.; SHARMA, T. Chemical Composition and Antimicrobial Activity of Essential Oil of *Citrus limettioides* Tanaka. **Journal of Pharmaceutical Technology and Drug Research**, Hyderabad, v.1, 7 p., 2012.
- VERZERA, A. et al. Effects of Rootstock on the Composition of Bergamot (*Citrus bergamia* Risso et Poiteau) Essential Oil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, n. 51, p. 206-210, 2003.
- VOO, S. S.; GRIMES, H. D.; LANGE, B. M. Assessing the Biosynthetic Capabilities of Secretory Glands in Citrus Peel. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 159, p. 81-94, 2012.
- ZULIAN, A.; DORR, A. C.; ALMEIDA, S. C. Citricultura e agronegócio cooperativo no Brasil. **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**, Santa Maria, v. 11, n. 11, p. 2290-2306, 2013.

### **3 ARTIGO 1**

**Caracterização dos óleos essenciais durante o desenvolvimento dos frutos das tangerineiras ‘Montenegrina’ e ‘Oneco’ sobre seis diferentes porta-enxertos\***

\*Artigo formatado conforme as normas da revista Journal of Essential Oil Bearing Plant

## Resumo

A citricultura brasileira destaca-se mundialmente e o estado do Rio Grande do Sul situa-se como terceiro maior produtor nacional de tangerinas. O raleio de frutos é uma prática indispensável para obtenção de frutos de qualidade em tangerineiras, sendo os frutos retirados comercializados para a extração de óleos essenciais. Sabe-se que inúmeros fatores podem interferir nas rotas de síntese de metabólitos secundários, dentre eles a cultivar copa e porta-enxerto. Os óleos essenciais podem apresentar variação nos seus teores e composição não apenas em função do genótipo, ambiente e método de extração, como também do estágio de desenvolvimento dos frutos. Deste modo, este estudo objetivou avaliar a influência de seis diferentes porta-enxertos na composição dos óleos essenciais de duas tangerineiras: ‘Montenegrina’ e ‘Oneco’; além de identificar alterações nos teores dos componentes majoritários ao longo do ciclo de desenvolvimento dos frutos. Os experimentos foram conduzidos em uma fazenda situada no município de Butiá – RS, delineados em blocos ao acaso, sendo amostrados um quilograma (1kg) de amostra de frutos por combinação copa/porta-enxerto, mensalmente, de fevereiro a agosto de 2016. As amostras foram avaliadas quanto à massa, diâmetro e coloração dos frutos e a extração do óleo essencial foi realizada por hidrodestilação em aparelho Clevenger durante 3h. Os componentes foram quantificados e identificados por meio de cromatografia gasosa associada à espectrometria de massas, sendo analisados estatisticamente através de análise de variância, ajustando-se regressões polinomiais e calculando-se os coeficientes lineares entre os compostos. Os teores dos compostos majoritários foram variáveis em decorrência do desenvolvimento dos frutos. Em ‘Montenegrina’ observou-se a redução dos teores de  $\gamma$ -terpineno e  $\alpha$ -terpineol e aumento de  $\alpha$ -pineno ao longo do desenvolvimento dos frutos. Já em ‘Oneco’ ocorreu redução de  $\gamma$ -terpineno, aumento de limoneno e oscilação no teor de linalol. Contudo, não foi possível verificar influência do porta-enxerto na composição dos óleos essenciais.

## Palavras chave

*Citrus deliciosa*; *C. reticulata*; hidrodestilação, terpenos, sazonalidade.

## **Introdução**

O setor de produção de óleos essenciais (OE) tem adquirido destaque no Brasil, principalmente os OE de citros (subproduto da indústria de sucos), sendo que o país situa-se entre os principais fornecedores do produto no mercado mundial ao lado da Índia, China e Indonésia (BIZZO *et al.*, 2009). Em 2019, o Brasil exportou um volume superior a 56 mil toneladas de óleos essenciais a partir de plantas cítricas, movimentando cerca de US\$ 301 milhões (AGROSTAT, 2020).

Os OE no Brasil são um importante subproduto do processamento dos frutos de citros, sendo que o país figura como segundo maior produtor mundial da cultura com 19,3 milhões t produzidas em 2018 (FAO, 2020). Dentre as unidades da federação, o Rio Grande do Sul (530,6 mil t), situa-se como quinto colocado em produção de citros (IBGE, 2020). Contudo, no que tange à produção de tangerinas, apresenta a segunda maior área plantada (12 mil hectares) e apresenta-se como o terceiro maior produtor (144,2 mil t), fornecendo 19% da produção nacional (IBGE, 2020). A produção de tangerinas é desenvolvida em 286 municípios gaúchos e movimentou em 2019 aproximadamente R\$ 124 milhões, sendo a produção comercializada para outros estados e países, como Itália, Malta, Panamá, Libéria e Turquia (SEAPDR, 2019).

As frutas produzidas no RS são destinadas tanto para o consumo *in natura* quanto para a indústria, com predomínio do consumo *in natura* (JOÃO, 2010). Tendo em vista a maior qualidade exigida dos frutos comercializados para este fim, a prática de raleio manual de frutos é comumente realizada pelos citricultores (RODRIGUES *et al.*, 1998). O raleio de frutos visa reduzir a alternância de produção em tangerineiras, assim como melhorar características como o tamanho e qualidade organoléptica dos frutos (RODRIGUES *et al.*, 1998; KOLLER, 2009). Os frutos retirados nessa operação têm sido comercializados para a extração de OE, sendo a remuneração obtida pelos

citricultores, empregada para cobrir os custos com mão de obra decorrentes desta prática (GONZATTO *et al.*, 2015). Os OE de tangerinas figuram entre os principais produtos gerados em sistemas de produção orgânica certificados no RS (SEAPDR, 2019). Em 2015 a caixa contendo 27kg de tangerinas verdes foi comercializada a R\$ 7,00, correspondendo a remuneração de R\$ 0,26 por kg (ECOCITRUS, 2020).

O teor e a composição do OE dos frutos cítricos podem ser afetados por características como espécie, cultivar, estado nutricional, local de cultivo e época de colheita (INTROGLIOLO *et al.*, 1996; GRASSI FILHO *et al.*, 2005; DUGO *et al.*, 2011; TEIXEIRA *et al.*, 2013). Outro fator de ordem genética que pode influenciar tanto o teor quanto a composição do OE de citros é o porta-enxerto utilizado (BITTERS & SCORA, 1970; VERZERA *et al.*, 2003; CANO & BERMEJO, 2011; ZOUAGHI *et al.*, 2019; AGUILAR-HERNÁNDEZ *et al.*, 2020). Os OE são produto do metabolismo secundário das espécies vegetais e expressam a relação entre as plantas e o ambiente (SIMÕES, 2001; TEIXEIRA, 2014). De acordo com Teixeira *et al.* (2014), os estímulos decorrentes do ambiente, no qual as plantas se encontram, podem redirecionar as rotas metabólicas, ocasionando a biossíntese de diferentes compostos. Os fatores genéticos, ambientais, de manejo, bem como fisiológicos, podem apresentar correlações entre si, não atuando isoladamente, podendo exercer influência conjunta no metabolismo secundário (MORAIS, 2009; TEIXEIRA *et al.*, 2014).

No Rio Grande do Sul há predomínio de cultivo da tangerineira ‘Montenegrina’ (*C. deliciosa* Tenore), contudo a diversificação varietal é uma característica marcante nos pomares, sendo um dos estados onde se utiliza o maior número de cultivares (KÖLLER, 2009; SCHWARZ *et al.*, 2010; OLIVEIRA *et al.*, 2011; OLIVEIRA; SCIVITTARO, 2014). Além de ‘Montenegrina’, também há áreas significativas cultivadas com ‘Caí’, ‘Clemenules’, ‘Pareci’, ‘Ponkan’, ‘Okitsu’ e ‘Rainha’, e com os

híbridos tipo tangerina ‘Dekopon’, ‘Murcott’, ‘Nadorcott’, ‘Nova’ e ‘Ortanique’ (OLIVEIRA *et al.*, 2018).

Já a tangerineira ‘Oneco’ (*C. reticulata* Blanco) trata-se de uma seleção da tangerineira ‘Ponkan’, situando-se esta última entre as cultivares de importância no RS e a mais cultivada em São Paulo, o maior produtor nacional de tangerineiras (GONZATTO, 2015). Dentre as tangerineiras do grupo da ‘Ponkan’, a ‘Oneco’ apresenta alta produtividade e longo período de colheita (SARTORI *et al.*, 1998; GONZATTO *et al.*, 2011). Portanto, embora não represente áreas expressivas de cultivo, mostra-se uma alternativa interessante para o RS e as informações obtidas através da avaliação de ‘Oneco’ podem ser extrapoladas para outras cultivares do mesmo grupo.

De acordo com Frizzo *et al.* (2004), o OE da tangerina ‘Montenegrina’ possui características químicas semelhantes às do OE de mandarina italiano, como teores inferiores de limoneno e mais elevados de  $\gamma$ -terpineno, demonstrando potencial de processamento diferenciado destes frutos para obtenção de OE de maior valorização comercial, principalmente no que diz respeito à exportação. Logo, o RS, mais especificamente o Vale do Caí, principal polo citrícola do estado, com predomínio do cultivo desta tangerineira, apresenta grande potencial para produção de OE de qualidade e elevada remuneração, tendo em vista inclusive, a presença de indústrias extratoras na região (João & Conte, 2018).

Logo, este estudo teve como objetivo avaliar a influência de seis diferentes porta-enxertos nos teores de OE e composição de duas tangerineiras: ‘Montenegrina’ e ‘Oneco’. Assim como, verificar as alterações nos teores dos componentes majoritários dos OE destes genótipos ao longo do desenvolvimento dos frutos.

## Material & Métodos

O presente estudo foi realizado na safra 2015/2016, sendo as coletas realizadas em empresa citrícola situada no município de Butiá/RS, em pomar implantado no ano de 1997 (30°07'58" S, 51°51'22" W e altitude de 35 m). O espaçamento empregado foi de 6,0 m entre linhas e 2,5 m entre plantas. O solo do local é classificado como Argissolo Vermelho distrófico típico (Embrapa, 2006) com 19 % de argila. A temperatura média da região foi de 18,8 °C com precipitação média anual de 1445 mm (EEA/UFRGS, 2020).

A coleta de amostras de frutos foi realizada em dois experimentos, um tendo como cultivar copa a tangerineira Montenegrina (*Citrus deliciosa* Tenore) e o outro tendo como cultivar copa a tangerineira Oneco (*C. reticulata* Blanco), ambos experimentos delineados em blocos ao acaso, com árvores enxertadas em seis diferentes porta-enxertos: citrangeiro Troyer (*C. sinensis* Osb. × *Poncirus trifoliata* Raf.), citrumeleiro Swingle (*C. paradisi* Macf. × *P. trifoliata*), Flying Dragon (*P. trifoliata* var. *monstrosa* Swing), laranjeira Caipira (*C. sinensis* (L.) Osbeck), limoeiro Cravo (*C. limonia* Osbeck) e limoeiro Volkameriano (*C. volkameriana* Ten. & Pasq.), com quatro plantas por unidade experimental.

As coletas de amostras iniciaram em fevereiro de 2016 [aos 180 DAPF (dias após a plena floração)], realizando-as mensalmente, até agosto de 2016, onde foram colhidos um quilograma (1kg) de frutos por combinação copa/porta-enxerto. O experimento encontrava-se delineado em quatro blocos, sendo cada um deles composto por quatro plantas de cada combinação copa/porta-enxerto, totalizando 16 plantas de cada combinação copa/porta-enxerto. As amostras foram caracterizadas quanto à massa e número de frutos, sendo realizado o registro da altura e diâmetro de 10 frutos por amostra com auxílio de paquímetro digital. Também foi monitorada a cor da casca dos

frutos com auxílio de colorímetro Konica/Minolta (modelo CR400), avaliando-se cinco frutos por amostra. As amostras permaneceram armazenadas em congelador (a  $-15^{\circ}\text{C}$ ) até a data da avaliação, data esta nunca superior a um mês após a coleta.

Para o cálculo da área superficial dos frutos, considerou-se a forma como um esferoide oblato para a aproximação do cálculo (RASHIDI *et al.*, 2018). A determinação da área superficial específica foi realizada através da razão entre a área superficial e a massa média dos frutos (AS/M), conforme realizado por Beyer (1987). Sendo a fórmula empregada para o cálculo:

$$AS = 2\pi a^2 + \pi \frac{c^2}{e} \ln \left( \frac{1+e}{1-e} \right)$$

Considerando,

AS: área superficial do esferóide oblato;

$a$ : semi-eixo maior do esferóide, referente à metade do diâmetro ( $D/2$ );

$c$ : semi-eixo menor, referente à metade da altura do fruto ( $H/2$ );

$e$ : excentricidade,  $e^2=1-c^2/a^2$

As extrações foram realizadas durante três horas após o início da ebulição (temperatura próxima a  $100^{\circ}\text{C}$ ), utilizando o método de hidrodestilação em aparelho do tipo Clevenger modificado, sendo que previamente à extração, os frutos foram fragmentados em quatro partes e levados aos balões com capacidade de seis litros (6 L), preenchidos com dois litros (2 L) de água destilada.

O OE acumulado na coluna do aparelho foi recolhido e armazenado em vidros âmbar com capacidade para 10 mL. As análises de CG/EM foram realizadas em um cromatógrafo a gás acoplado a um espectrômetro de massas Hewlett Packard 6890/MSD5973, equipado com o software HP-Chemstation e espectroteca Wiley 275 (Hoboken, NJ, USA). Utilizou-se uma coluna capilar de sílica fundida HP-5 ( $30\text{ m} \times 250\text{ }\mu\text{m}$ ) com  $0,50\text{ }\mu\text{m}$  de espessura de filme (Hewlett Packard). A programação de temperatura utilizada foi de  $60$  a  $246^{\circ}\text{C}$  a  $3^{\circ}\text{C}/\text{min}$ , temperatura do injetor de  $250^{\circ}\text{C}$ ,

temperatura da interface de 280 °C; split ratio 1:100; hélio como gás de arraste (56 kPa); vazão de 1,0 mL/min; energia de ionização de 70 eV; volume de amostra injetado de 1 µL, diluída em hexano (1:10). Os componentes foram identificados por comparação de seus respectivos espectros de massa com os da espectroteca Wiley, selecionadas pelo software do sistema pela percentagem de similaridade e por comparação de seus índices de retenção linear (IRL) com os índices reportados por Adams (2017). O IRL dos componentes foi calculado utilizando a equação de Van den Dool e Kratz, utilizando uma solução padrão de alcanos de C7 a C30.

As análises de GC-DIC foram realizadas utilizando um cromatógrafo a gás Hewlett Packard 6890 Series equipado com um processador de dados HP-Chemstation, utilizando uma coluna HP-5 (30 m × 320 µm d. i.) com 0,50 µm de espessura de filme (Hewlett Packard, Palo Alto, CA, USA). Programação de temperatura foi a mesma do GC-MS; temperatura do injetor de 250 °C; split ratio 1:50; temperatura do detector de 250 °C; hidrogênio como gás de arraste (34 kPa); volume de amostra injetado de 1 µL, diluída em hexano (1:10).

Os dados relativos ao teor de OE e componentes majoritários (concentração superior a 1 % do OE na média de todas as avaliações) de cada um dos experimentos foram submetidos à análise de variância, considerando as datas de amostragem como repetições, para determinar o efeito dos diferentes porta-enxertos, por meio da rotina PROC GLM do software SAS 9.4® (Apêndice 1). Para avaliação do comportamento das mesmas variáveis em relação ao tempo ajustou-se, quando possível, regressões polinomiais ou não-lineares utilizando-se o programa SigmaPlot 14.0®. Adicionalmente, calculou-se o coeficiente de correlação linear de Pearson, considerando-se significativos valores com  $p < 0,01$ , entre os componentes do OE de cada cultivar-copa, com o programa RStudio®.

## Resultados e Discussão

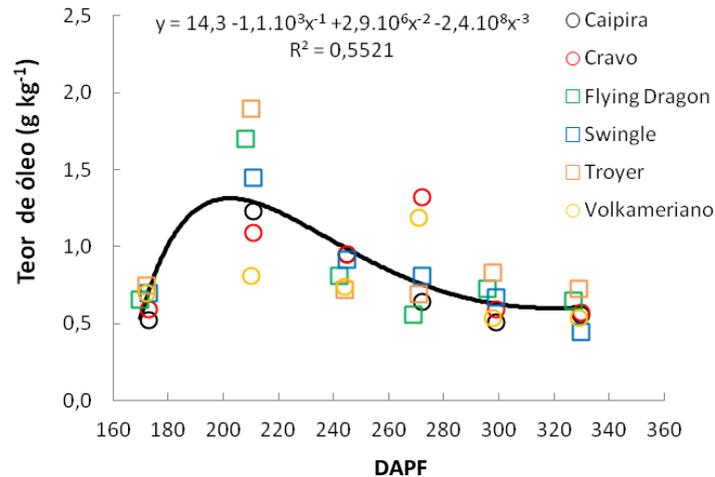
### *Teor de Óleo Essencial: 'Montenegrina'*

O teor de OE na casca dos frutos variou de 0,44 a 1,90 g kg<sup>-1</sup> para tangerineira 'Montenegrina', sendo os menores teores obtidos nas avaliações realizadas com os frutos plenamente desenvolvidos, aos 274 DAPF (época da colheita) e o seu ápice na ocasião da segunda amostragem (210 DAPF), apresentando decréscimo nas avaliações posteriores, conforme o desenvolvimento dos frutos (Figura 1). Entretanto, não foi verificado efeito significativo dos porta-enxertos para esta característica. Resultado semelhante foi obtido por Gonzatto (2015) em experimento avaliando o OE a partir de frutos oriundos do raleio de 'Montenegrina' sobre os mesmos seis porta-enxertos, também não sendo verificadas diferenças significativas quanto à influência do porta-enxerto nos teores de OE.

O teor médio de OE em 'Montenegrina' neste experimento foi de 0,73 g kg<sup>-1</sup> ou 0,073%, valor inferior à média relatada por Simas *et al.* (2015) de 1,99% ao avaliar o OE de frutos de Mexerica do Rio (*C. deliciosa*), extraído por hidrodestilação em aparelho clevenger a partir de amostras oriundas do comércio varejista do Rio de Janeiro. Contudo, estes autores não informaram dados necessários para comparação, como data de amostragem, porta-enxerto e estágio de desenvolvimento dos frutos, pressupondo-se que estivessem em estágio de plena maturação.

O teor médio de OE obtido neste estudo para 'Montenegrina' mostra-se inferior ao relatado por Teixeira *et al.* (2014) para frutos maduros de Mexerica do Rio (*C. deliciosa*) (0,63%) cultivados em Cordeirópolis - São Paulo, entre os meses de dezembro e janeiro cujo óleo foi extraído pelo método de hidrodestilação em aparelho Clevenger. Contudo, os teores obtidos estão próximos aos obtidos por Gonzatto (2015)

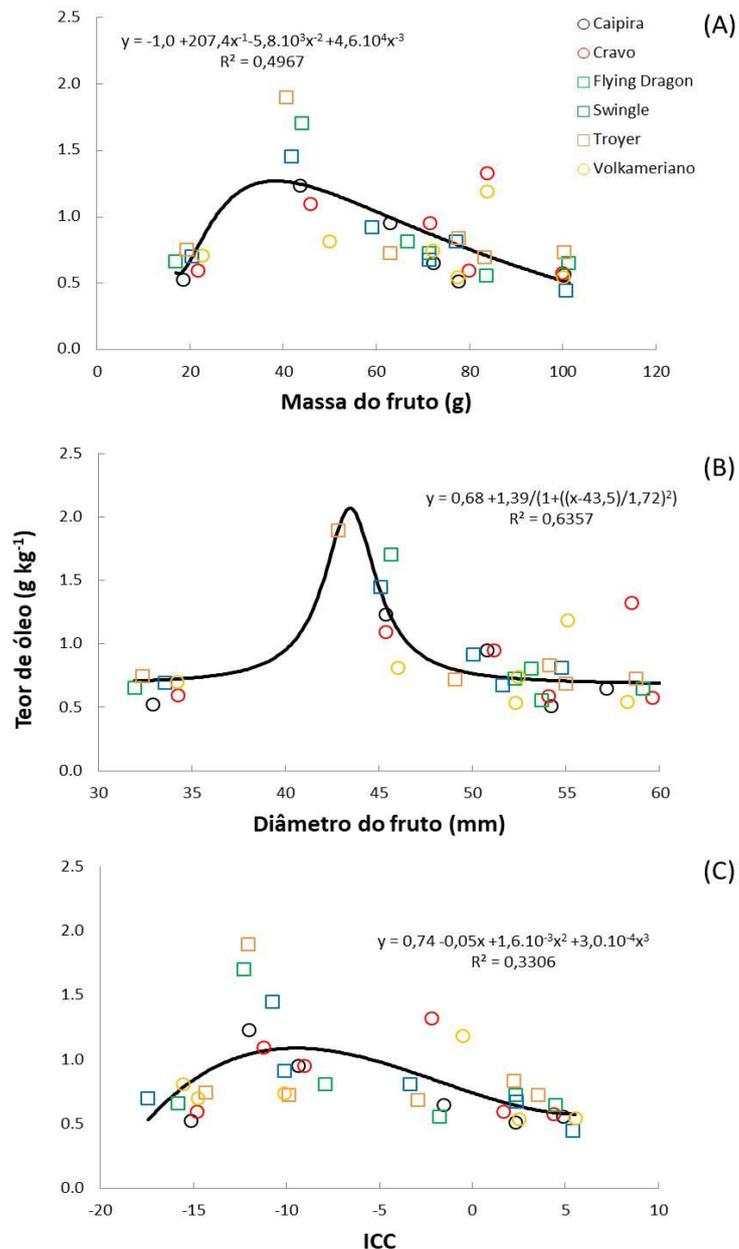
de 0,095% para frutos verdes de ‘Montenegrina’ *C. deliciosa* sobre os mesmos seis porta-enxertos do presente trabalho.



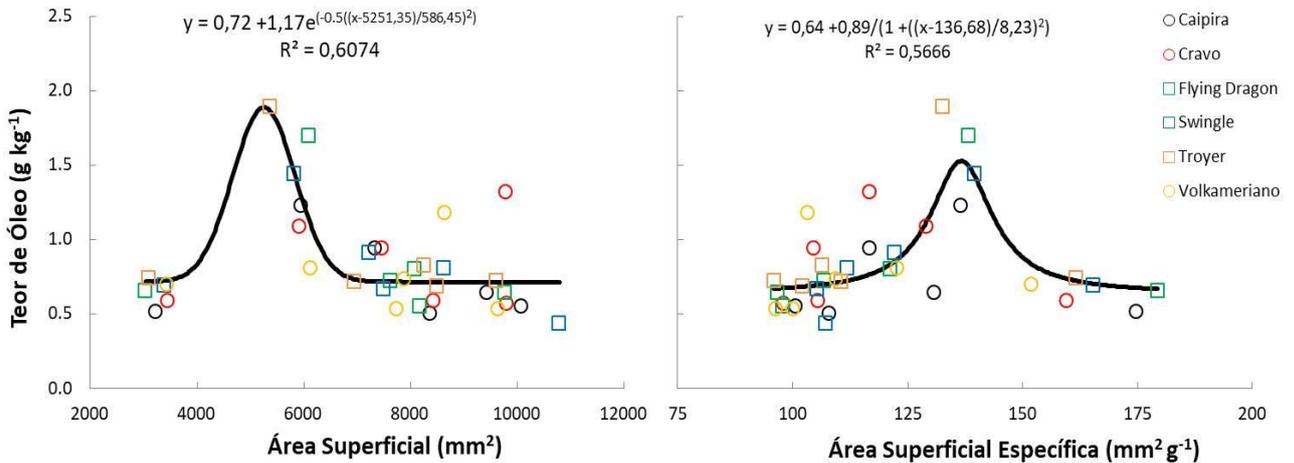
**Figura 1.** Teor de óleo essencial em frutos de tangerineira ‘Montenegrina’ (*C. deliciosa*) enxertada sobre diferentes porta-enxertos ao longo do desenvolvimento dos frutos, expresso em Dias Após a Plena Floração (DAPF). Butiá-RS, 2016.

O baixo teor de OE verificado aos 172 DAPF, provavelmente, pode ser atribuído ao estágio dos frutos desta extração corresponder ao momento de formação inicial e aumento da densidade de cavidades secretoras (glândulas) de OE situadas no flavedo dos frutos. Segundo Knight *et al.* (2001), o aumento do número de glândulas de óleo na cultivar Washington Navel (*C. sinensis*) é limitado aos estágios iniciais de desenvolvimento dos frutos, caracterizado pelos frutos imaturos com em média até 42 mm de diâmetro, sendo que, posteriormente, não surgem novas glândulas, e as que foram formadas até esta fase seguem apenas aumentando seu diâmetro. Aos 210 DAPF foi possível observar um grande incremento no teor de OE extraído, que pode ser decorrente do pleno desenvolvimento dessas estruturas secretoras, bem como maior número de glândulas à época desta avaliação, sendo que neste momento os frutos apresentavam diâmetro médio de 45 mm (Figura 2B). A redução do teor de OE verificada a partir dos 244 DAPF em ‘Montenegrina’ pode estar relacionada à redução da área superficial específica do fruto (crescimento do fruto em diâmetro e massa),

(Figura 2 A e B) que impacta drasticamente o teor de OE em termos de quantidade de óleo (g) por unidade de massa do fruto (g). A relação entre o teor de OE ( $\text{g.kg}^{-1}$ ) e a área superficial ( $\text{mm}^2$ ) pode ser observada na Figura 3A, evidenciando o aumento da área superficial a partir da terceira avaliação, já na Figura 3B, observa-se relação entre o teor de OE e a área superficial específica ( $\text{mm}^2.\text{g}^{-1}$ ), que demonstrou redução também a partir da terceira amostragem, realizada aos 244 DAPF.



**Figura 2.** Comportamento do teor de óleo essencial ( $\text{g.kg}^{-1}$ ) em relação a diferentes parâmetros de desenvolvimento dos frutos de 'Montenegrina': massa (g) (A), diâmetro (mm) (B) e índice de coloração da casca (C). Butiá-RS, 2016.



**Figura 3.** Comportamento do teor de óleo essencial ( $\text{g kg}^{-1}$ ) em frutos ‘Montenegrina’ em relação: a área superficial ( $\text{mm}^2$ ) (A); a área superficial específica ( $\text{mm}^2.\text{g}^{-1}$ ) (B). Butiá-RS, 2016.

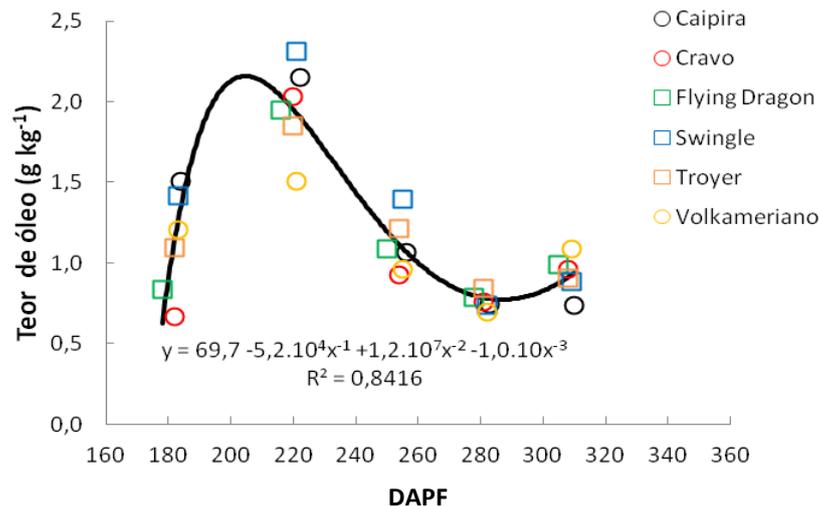
### *Teor de Óleo Essencial: ‘Oneco’*

O teor de OE na casca dos frutos variou de  $0,67$  a  $1,50 \text{ g kg}^{-1}$  para a tangerineira ‘Oneco’, novamente não sendo observado efeito dos porta-enxertos para esta característica. Sendo os teores inferiores obtidos na avaliação realizada com os frutos em pleno desenvolvimento e maturação (colheita) aos 308 DAPF e os teores mais elevados de OE aos 220 DAPF (2ª avaliação), apresentando decréscimo nas amostragens posteriores (Figura 4).

O teor médio de OE em frutos da tangerineira ‘Oneco’ foi de  $1,19 \text{ g.kg}^{-1}$  ou  $0,12\%$ , valor inferior ao relatado por Simas *et al.* (2015) avaliando apenas frutos maduros de *C. reticulata* ‘Ponkan’ ( $1,92\%$ ) a partir de amostras oriundas do comércio varejista no Rio de Janeiro. Já Gonzatto (2015) obteve, em percentual, teor médio de OE em ‘Oneco’ de  $0,13\%$ , avaliando frutos imaturos das mesmas cultivares copa e porta-enxertos, em diferente ano amostral, valores estes muito próximos aos obtidos neste estudo para todo o ciclo de desenvolvimento dos frutos.

Os teores mais elevados de OE obtidos em ‘Oneco’ também foram verificados por Gonzatto (2015) que o atribuiu às diferenças quanto a características de tamanho e densidade das glândulas de óleo em *C. reticulata*, bem como ao tamanho dos frutos no

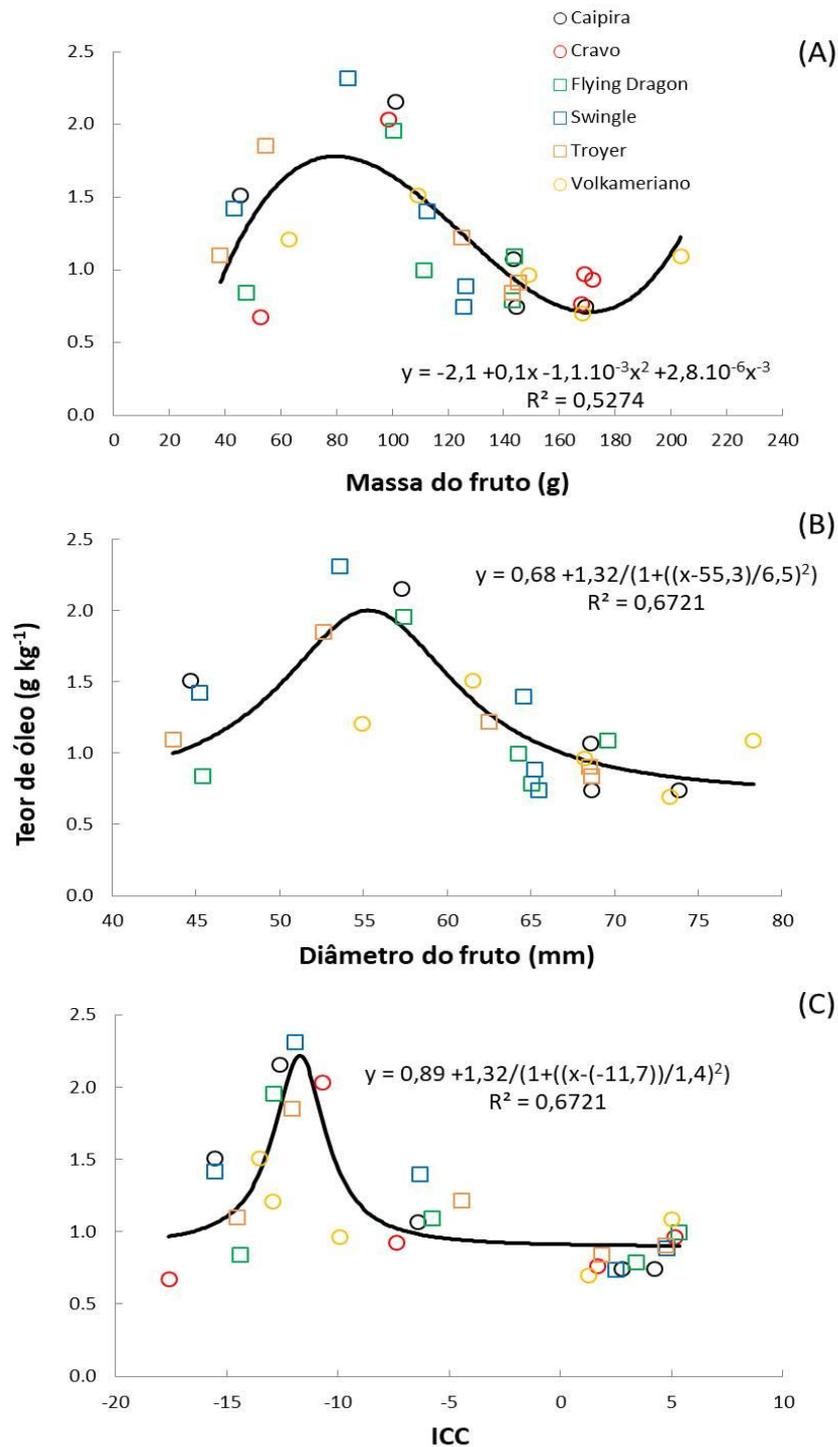
momento da amostragem, já que ‘Oneco’ apresenta ciclo mais precoce em relação à ‘Montenegrina’, de ciclo tardio. Conforme Montero (2010), o número de cavidades (glândulas) de óleo em ‘Ponkan’ é maior por centímetro de casca em comparação à outras espécies de citros, sendo que estas possuem maior volume e situam-se a menores profundidades, apresentando-se mais rasas, favorecendo assim a ruptura e liberando maiores quantidades de OE.



**Figura 4.** Teor de óleo essencial em frutos de tangerineira ‘Oneco’ (*C. reticulata*) enxertada sobre diferentes porta-enxertos ao longo do desenvolvimento dos frutos, expresso em Dias Após a Plena Floração (DAPF). Butiá-RS, 2016.

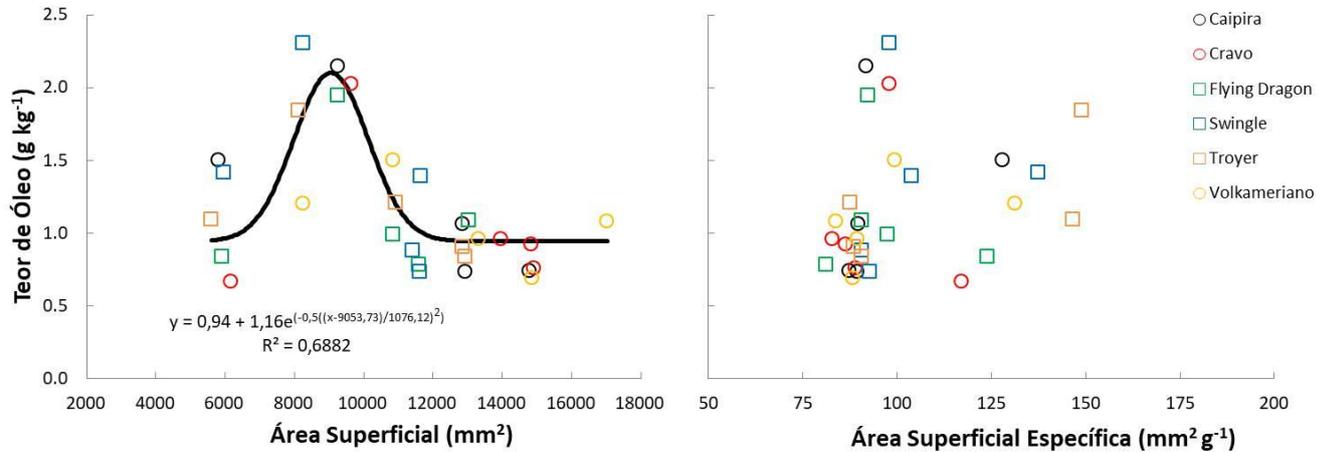
Assim como em ‘Montenegrina’, foi possível observar a redução do teor de OE com o desenvolvimento dos frutos de ‘Oneco’, especialmente em relação ao aumento da massa(g) e diâmetro dos frutos (mm) (Figuras 5 A e B). A relação entre o teor de OE e o desverdecimento dos frutos (ICC), mostrou-se mais acentuada em comparação ao verificado em ‘Montenegrina’, sendo o teor máximo obtido aos 220 DAPF (2ª avaliação) e depois reduzido drasticamente (Figura 5 C). Conforme relatado por Borgou *et al.* (2012) o estágio de amadurecimento dos frutos de citros afeta significativamente o rendimento e a composição dos óleos essenciais, sendo que para tangerinas (*C. reticulata*), o estágio semi-maduro, caracterizado pelo início desverdecimento dos frutos, foi o que apresentou o rendimento máximo em experimento realizado na Tunísia

pelos autores supracitados avaliando frutos em estágio imaturo, semi-maturo e em maturação completa.



**Figura 5.** Comportamento do teor de óleo essencial (g. kg<sup>-1</sup>) em relação à diferentes parâmetros de desenvolvimento dos frutos de ‘Oneco’: massa (g) (A), diâmetro (mm) (B) e índice de coloração da casca (C). Butiá-RS, 2016.

A relação entre o teor de OE ( $\text{g.kg}^{-1}$ ) e a área superficial ( $\text{mm}^2$ ) em ‘Oneco’ pode ser observada na Figura 6A, evidenciando o aumento da área superficial a partir da terceira avaliação (254 DAPF), já na Figura 6B, observa-se a relação entre o teor de OE e a área superficial específica ( $\text{mm}^2.\text{g}^{-1}$ ), que demonstrou redução, embora não tenha havido ajuste à curva.



**Figura 6.** Comportamento do teor de óleo essencial ( $\text{g.kg}^{-1}$ ) em frutos de ‘Oneco’ em relação: a área superficial ( $\text{mm}^2$ ) (A); a área superficial específica ( $\text{mm}^2.\text{g}^{-1}$ ) (B). Butiá-RS, 2016.

### **Composição dos óleos essenciais: ‘Montenegrina’**

Foram identificadas 16 substâncias nos OE de ‘Montenegrina’, não havendo diferenças na composição devido à influência dos porta-enxertos (Tabela 1). As amostras de OE de ‘Montenegrina’ foram preponderantemente constituídas por limoneno (73,00 - 88,96%),  $\gamma$ -terpineno (7,38 - 13,38%),  $\alpha$ -terpineol (1,40 - 4,10%), terpin-4-ol (0,55-3,69%), cis- $\alpha$ -bergamoteno (0,71 - 2,55%),  $\beta$ -pineno (1,28 - 1,64%),  $\alpha$ -pineno (0,71 - 1,49%),  $\alpha$ -terpinoleno (0,80 - 1,45%).

Conforme Teixeira *et al.* (2014) os hidrocarbonetos monoterpênicos limoneno e  $\gamma$ -terpineno representam de 70 a 88% da composição total dos OE nas cultivares de *C. deliciosa*: Mexericas Avana, Céu, do Rio, Israel, Paraguaia, Pernambucana e Umbigo. Neste estudo, juntos, estes compostos corresponderam em média a 88% do total.

**Tabela 1.** Compostos identificados no óleo essencial dos frutos de tangerineira ‘Montenegrina’ enxertada sobre seis diferentes porta-enxertos. Butiá-RS, julho de 2016.

PORTA ENXERTO	DATA	Compostos Identificados (%)																TI* (%)
		$\alpha$ -tuje no	$\alpha$ -pine no	sabine no	$\beta$ -pine no	octanal	$\alpha$ -terpine no	limoneno	$\gamma$ -terpine no	$\alpha$ -terpinoleno	linalol	cis-óxido-limone no	camphor	terpin-4-ol	$\alpha$ -terpine ol	cis- $\alpha$ -bergamote no	$\alpha$ -sine nsal	
CRAVO	22.02.16	0,24	1,22	0,77	1,55	0,91	0,42	73,89	12,50	1,26	0,68	0,26	-	1,05	2,64	0,75	0,07	98,36
VOLK	22.02.16	0,27	1,18	0,77	1,39	1,09	0,37	73,00	12,66	1,09	1,01	-	0,30	1,33	2,67	1,74	0,14	99,01
TROYER	22.02.16	0,25	1,19	0,72	1,44	0,87	0,42	75,10	12,20	1,15	0,89	-	0,30	1,21	2,62	0,91	0,12	99,39
SWINGLE	22.02.16	0,21	1,05	0,64	1,39	1,27	0,53	75,14	13,38	1,45	0,95	-	-	0,89	1,88	0,66	0,09	99,53
CAIPIRA	22.02.16	0,22	1,26	0,72	1,47	0,82	-	83,85	8,93	0,76	0,38	-	-	0,47	0,55	0,14	0,00	99,57
F. DRAGON	22.02.16	0,22	1,08	0,70	1,35	1,10	0,33	72,72	11,45	1,38	1,46	-	-	1,66	3,43	1,49	0,20	98,73
CRAVO	31.03.16	0,21	1,04	0,58	1,40	0,64	0,37	77,50	9,40	1,00	0,86	-	0,39	1,12	3,26	1,15	0,18	99,10
VOLK	31.03.16	0,22	1,06	0,59	1,30	0,86	0,41	74,47	9,56	1,00	1,14	-	0,50	1,36	4,10	1,79	0,17	98,69
TROYER	31.03.16	0,20	1,02	0,56	1,40	0,64	0,47	76,19	10,13	1,06	0,76	-	0,39	1,22	3,62	1,22	0,19	99,07
SWINGLE	31.03.16	0,20	1,03	0,56	1,39	0,71	0,45	77,58	10,77	1,17	0,68	-	0,35	0,90	2,64	0,84	0,00	99,27
CAIPIRA	31.03.16	0,18	0,91	0,51	1,38	0,67	0,39	78,22	9,75	1,05	0,75	-	0,39	1,06	3,15	0,80	0,17	99,38
F. DRAGON	31.03.16	0,23	1,04	0,59	1,38	0,75	0,55	75,27	10,66	1,15	0,87	-	0,41	1,21	3,76	1,08	0,19	99,14
CRAVO	04.05.16	0,21	0,98	0,60	1,38	0,47	-	79,03	8,13	0,82	0,87	-	0,32	1,19	3,18	1,30	0,23	98,71
VOLK	04.05.16	0,27	1,22	0,82	1,31	0,60	-	72,81	10,95	0,88	1,44	-	0,28	1,49	3,50	2,39	0,19	98,35
TROYER	04.05.16	0,22	1,04	0,75	1,41	0,45	-	82,27	7,38	0,80	0,69	0,47	0,39	0,81	-	0,71	0,00	97,39
SWINGLE	04.05.16	0,23	1,06	0,64	1,39	0,59	-	78,74	8,88	0,89	0,90	-	0,33	1,01	2,54	1,25	0,23	98,68
CAIPIRA	04.05.16	0,00	0,71	0,47	1,33	0,46	0,30	78,81	8,80	0,92	0,78	-	0,38	1,17	3,42	1,02	0,21	98,78
F. DRAGON	04.05.16	0,17	0,91	0,53	1,38	0,48	-	78,55	7,94	0,81	0,94	-	0,38	1,29	3,69	1,35	0,22	98,64
CRAVO	31.05.16	-	-	-	-	-	-	88,96	8,23	-	-	-	-	-	2,80	-	0,00	99,99
VOLK	31.05.16	-	-	-	-	-	-	84,78	10,10	-	-	-	-	-	3,06	2,05	0,00	99,99
TROYER	31.05.16	0,25	1,12	0,72	1,42	0,25	0,19	80,32	8,43	0,70	0,72	-	0,24	0,94	2,11	1,03	0,18	98,62
SWINGLE	31.05.16	0,29	1,21	0,80	1,40	0,37	-	79,08	8,94	0,73	1,01	-	-	1,08	2,32	1,34	0,23	98,80
CAIPIRA	31.05.16	0,21	0,99	0,66	1,37	0,42	-	79,35	8,80	0,82	0,84	-	0,28	1,06	2,60	1,21	0,17	98,78
F. DRAGON	31.05.16	0,25	1,16	0,73	1,37	0,48	-	79,67	7,71	0,07	1,06	0,27	-	1,01	2,46	1,03	0,21	97,48
CRAVO	27.06.16	0,23	1,06	0,71	1,37	0,51	0,23	78,85	9,12	0,75	1,00	-	0,23	1,03	2,40	1,09	0,17	98,75
VOLK	27.06.16	0,33	1,33	1,00	1,32	0,53	0,18	74,30	10,66	0,70	1,51	-	-	1,19	2,38	2,55	0,23	98,21
TROYER	27.06.16	0,29	1,20	0,82	1,41	0,34	-	79,33	9,60	0,69	0,89	-	-	0,92	2,03	1,20	0,21	98,93
SWINGLE	27.06.16	0,26	1,07	0,79	1,33	0,49	0,22	77,64	9,92	0,75	1,16	-	-	0,92	1,98	-	0,23	96,76
CAIPIRA	27.06.16	0,23	1,06	0,74	1,34	0,41	-	79,76	8,22	0,33	1,05	0,25	-	1,03	2,32	1,04	0,21	97,99
F. DRAGON	27.06.16	0,25	1,13	0,77	1,40	0,31	0,18	80,51	8,90	0,71	0,89	-	-	0,96	1,92	0,97	0,18	99,08
CRAVO	28.07.16	0,34	1,43	1,03	1,64	0,33	-	77,49	10,28	0,73	0,93	-	0,17	1,03	1,83	1,19	0,00	98,42
VOLK	28.07.16	0,51	1,49	1,32	1,47	0,52	-	70,81	12,27	0,75	1,60	0,15	-	-	1,33	-	0,22	92,44
TROYER	28.07.16	0,32	1,27	0,97	1,43	0,46	-	79,88	9,68	0,63	0,88	0,28	-	0,81	1,40	1,03	0,21	99,25
SWINGLE	28.07.16	0,31	1,23	0,94	1,38	-	-	80,37	8,03	0,55	0,97	-	-	0,95	1,85	1,45	0,21	98,24
CAIPIRA	28.07.16	0,26	1,04	0,84	1,31	0,22	0,11	80,16	7,71	0,55	1,03	0,32	-	1,05	2,09	1,26	0,23	98,18
F. DRAGON	28.07.16	0,29	1,15	0,86	1,38	0,24	-	80,09	8,72	0,58	1,00	-	-	0,96	1,88	1,21	0,23	98,59
<b>IR Calculado</b>		921	929	971	983	998	1014	1028	1053	1082	1093	1130	1142	1180	1186	1412	1756	
<b>IR Literatura</b>		924	932	969	980	1001	1018	1031	1054	1088	1098	1132	1141	1177	1189	1411	1755	

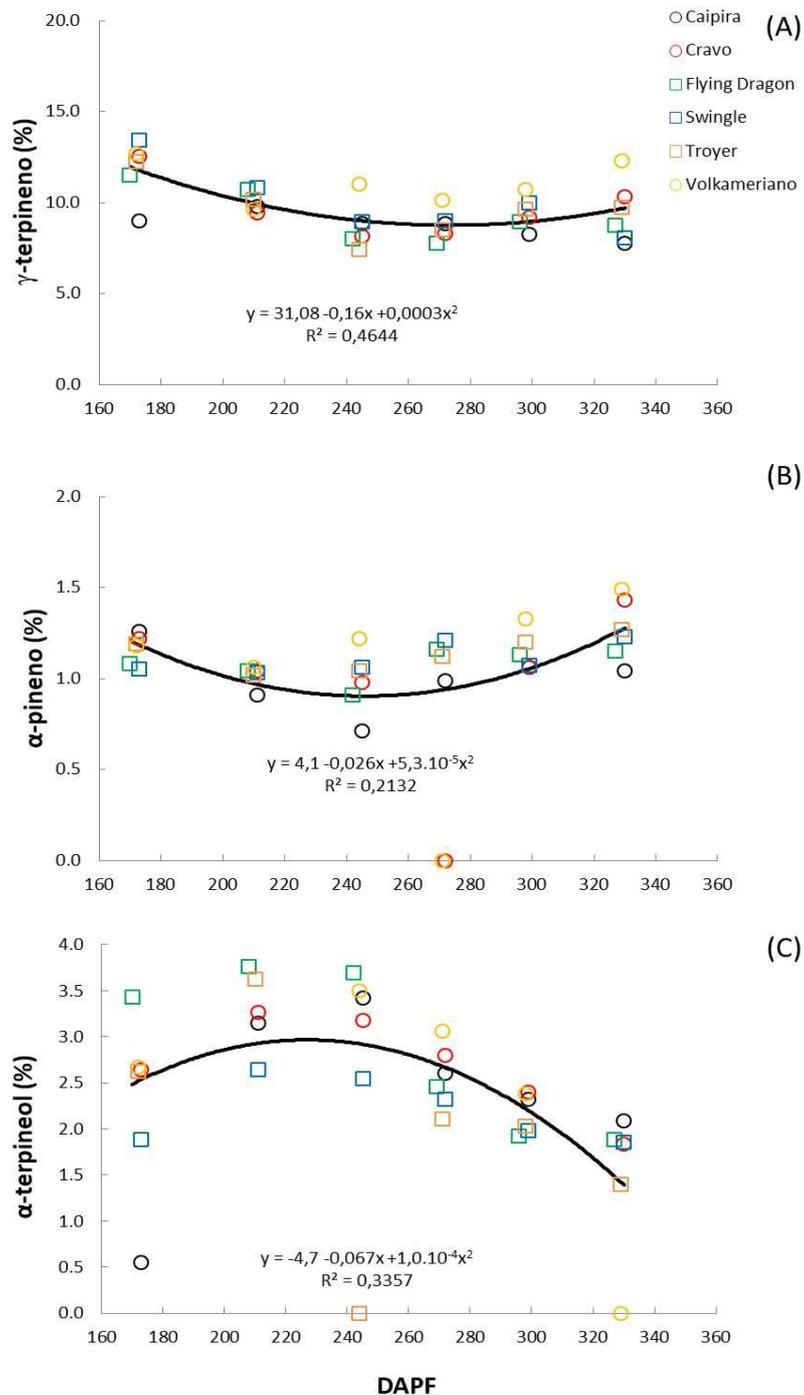
\*TI: Total Identificado

De acordo com Frizzo *et al.* (2004), os compostos majoritários em *C. deliciosa* ‘Caí e ‘Montenegrina’ são o limoneno, o  $\gamma$ -terpineno, o  $\alpha$ -terpineol, o mirceno,  $\alpha$ -pineno, o  $\beta$ -pineno e o N metil antranilato de metila. Dentre os sete principais componentes citados por Frizzo *et al.* (2004), cinco também apresentaram maiores concentrações no presente estudo dentre os componentes majoritários.

No OE de ‘Montenegrina’ observou-se que os teores de  $\gamma$ -terpineno e o  $\alpha$ -pineno apresentaram comportamento quadrático em função do desenvolvimento dos frutos, atingindo valores mínimos em 274 e 246 DAPF (Figura 7 A e B), quando os frutos possuíam massa média de 80,5 e 65,5 g, respectivamente. Já os teores de  $\alpha$ -terpineno também demonstraram um comportamento quadrático, apresentando aumento seguido de redução (Figura 7 C), tendendo inicialmente a um valor máximo aos 227 DAPF, quando os frutos apresentavam massa média de 55 g. Os componentes limoneno,  $\beta$ -pineno e cis- $\alpha$ -bergamoteno não variaram significativamente ao longo do desenvolvimento dos frutos apresentando teores médios de  $78,18 \pm 3,64$  %,  $1,28 \pm 0,40$  % e  $1,12 \pm 0,57$  %, respectivamente. Logo, colheitas visando à obtenção destes compostos poderiam ser realizadas durante todo o ciclo de desenvolvimento dos frutos de ‘Montenegrina’.

Dugo *et al.* (2011) avaliando a variação sazonal do OE de frutos de cultivares de *C. deliciosa* em todo o seu ciclo de desenvolvimento, também relataram alterações significativas nos teores dos compostos majoritários durante o processo produtivo (safra) em função do amadurecimento dos frutos, registrando aumento do conteúdo de limoneno e diminuição de todos os outros componentes majoritários:  $\gamma$ -terpineno,  $\alpha$ -pineno,  $\alpha$ -terpineol, N metil antranilato de metila e  $\alpha$ -sinensal. Contudo, no final da safra, verificaram drástica redução do limoneno e pequeno incremento de outros compostos, como:  $\alpha$ -terpineol,  $\alpha$ -sinensal, antranilato de metila e  $\alpha$ -pineno, concluindo

que as variações no teor de limoneno são compensadas pelos outros componentes e que poderiam ter sido provocadas por variações climáticas, assim como pela possível mistura de frutos de cultivares de ciclo de desenvolvimento tardio (DUGO *et al.*, 2011).



**Figura 7.** Composição dos teores de  $\gamma$ -terpineno (A),  $\alpha$ -pineno (B) e  $\alpha$ -terpineno (C) e o desenvolvimento dos frutos de 'Montenegrina', representado pelo número de dias após a plena floração (DAPF). Butiá-RS, julho de 2016.

### ***Composição do óleo essencial: ‘Oneco’***

Foram identificados 14 diferentes compostos no OE de ‘Oneco’, destes foram identificados como compostos majoritários o limoneno (86,02 – 91,94%), o linalol (1,43 – 4,92%), o  $\gamma$ -terpineno (1,13 – 3,11%),  $\alpha$ -terpineol (0,24 – 4,49%), octanal (0,50 – 1,83%),  $\beta$ -pineno (1,29 – 1,62%). Além disso, não houve efeito dos porta-enxerto sobre a composição do OE, avaliada através da comparação de médias referentes aos teores de cada substância (Tabela 2). Cano & Bermejo (2011) avaliando a influência dos porta-enxertos citrangeiro ‘Troyer’ (*C. sinensis* (L.) Osb. x *P. trifoliata* (L.) Raf.) e tangerineira ‘Cleópatra’ (*C. reshni* Hort. ex Tan.) em cultivares de *C. clementina*, *C. unshiu* e *C. sinensis*, também não verificaram diferenças significativas entre os compostos majoritários presentes nos OE.

Os compostos majoritários identificados neste estudo também foram relatados por Simas *et al.* (2015) como majoritários em *C. reticulata* (‘Ponkan’), onde destacaram-se o limoneno, o  $\gamma$ -terpineno e o  $\beta$ -pineno. Já Borgou *et al.* (2012) avaliando a cultivar Lsen Asfour (*C. reticulata*) obteve como majoritários o limoneno e o  $\gamma$ -terpineno, sendo que também se destacaram o mirceno, o octanol, o sabineno e o borneol, mas obtiveram apenas traços de linalol. Ainda Lota *et al.* (2000) avaliando 41 cultivares de *C. reticulata* enxertadas sobre citrangeiro ‘Troyer’ relatam o limoneno como componente principal, associado ao  $\gamma$ -terpineno,  $\alpha$ -pineno, linalol, mirceno e sabineno em quase todas as amostras.

**Tabela 2.** Compostos identificados (%) no óleo essencial dos frutos de tangerineira ‘Oneco’ enxertada sobre seis diferentes porta-enxertos. Butiá-RS, julho de 2016.

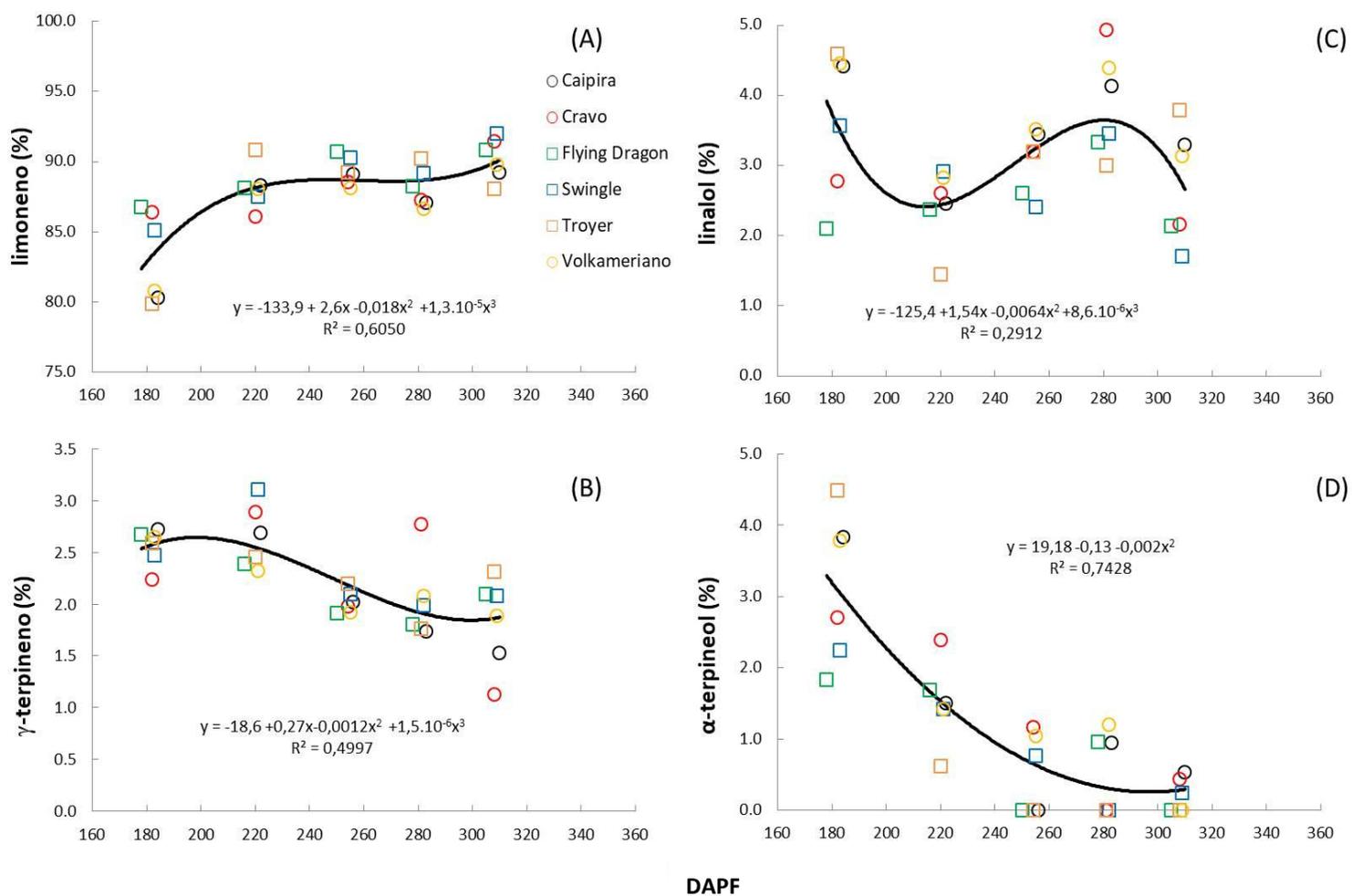
PORTA ENXERTO	DATA	Compostos Identificados (%)														TI* (%)
		$\alpha$ -tujeno	$\alpha$ -pineno	sabineno	$\beta$ -pineno	octanal	$\alpha$ -terpineno	limoneno	$\gamma$ -terpineno	$\alpha$ -terpinoleno	linalol	camphor	terpin-4-ol	$\alpha$ -terpineol	acetato de octila	
CRAVO	22.02.16	-	0,48	0,50	1,48	1,24	0,21	86,32	2,24	0,74	2,77	0,33	0,85	2,70	-	99,86
VOLK	22.02.16	-	0,58	0,52	1,40	1,38	0,29	80,72	2,65	0,55	4,44	0,41	1,68	3,78	0,22	98,62
TROYER	22.02.16	-	0,58	0,50	1,34	1,26	0,29	79,84	2,59	0,57	4,58	0,49	2,04	4,49	0,23	98,80
SWINGLE	22.02.16	-	0,55	0,61	1,44	1,19	0,24	85,07	2,47	0,77	3,56	0,25	0,93	2,25	-	99,33
CAIPIRA	22.02.16	-	0,58	0,53	1,37	1,3	0,34	80,24	2,72	0,66	4,40	0,46	1,91	3,83	0,21	98,67
F. DRAGON	22.02.16	-	0,52	0,64	1,47	1,37	0,32	86,71	2,67	0,88	2,09	0,21	0,77	1,83	-	99,48
CRAVO	31.03.16	-	0,63	0,37	1,29	1,29	0,25	86,02	2,89	0,51	2,59	0,24	0,95	2,39	-	99,42
VOLK	31.03.16	0,65	-	0,44	1,47	1,39	-	87,99	2,32	0,43	2,81	-	0,86	1,42	0,20	99,98
TROYER	31.03.16	-	0,73	0,54	1,51	0,99	-	90,76	2,46	0,42	1,43	-	0,36	0,62	0,17	99,99
SWINGLE	31.03.16	-	0,71	0,51	1,49	0,89	-	87,44	3,11	0,40	2,90	-	0,79	1,42	0,20	99,86
CAIPIRA	31.03.16	-	0,64	0,48	1,50	1,08	0,21	88,24	2,69	0,44	2,44	-	0,76	1,51	-	99,99
F. DRAGON	31.03.16	-	0,62	0,46	1,46	1,23	0,18	88,08	2,39	0,44	2,36	-	0,72	1,69	0,21	99,84
CRAVO	04.05.16	-	0,63	0,45	1,46	1,07	-	88,49	1,98	0,24	3,19	-	0,61	1,17	0,25	99,54
VOLK	04.05.16	-	0,66	0,48	1,44	1,31	-	88,04	1,92	0,24	3,51	-	0,61	1,04	0,28	99,53
TROYER	04.05.16	-	0,69	0,65	1,46	1,12	-	89,18	2,20	0,23	3,18	-	0,57	-	0,31	99,59
SWINGLE	04.05.16	-	0,70	0,55	1,45	0,78	-	90,20	2,10	0,21	2,39	-	0,48	0,76	0,21	99,99
CAIPIRA	04.05.16	-	0,63	0,53	1,46	1,02	-	89,08	2,02	0,23	3,43	-	0,64	-	0,27	99,31
F. DRAGON	04.05.16	-	0,62	0,58	1,44	0,94	-	90,63	1,91	0,22	2,59	-	0,52	-	0,26	99,71
CRAVO	31.05.16	-	1,72	-	-	1,83	-	87,19	2,77	-	4,92	-	-	-	-	98,43
VOLK	31.05.16	-	0,56	0,45	1,37	1,22	-	86,56	2,08	0,24	4,38	-	0,75	1,20	0,31	99,12
TROYER	31.05.16	-	0,61	0,60	1,40	1,05	-	90,14	1,76	0,22	2,99	-	0,55	-	0,31	99,63
SWINGLE	31.05.16	-	0,65	0,63	1,41	0,93	-	89,09	1,99	0,25	3,44	-	0,59	-	0,33	99,31
CAIPIRA	31.05.16	-	0,58	0,52	1,36	1,63	-	87,04	1,74	0,21	4,12	-	0,65	0,95	0,39	99,19
F. DRAGON	31.05.16	-	0,48	0,56	1,39	1,27	-	88,21	1,80	0,23	3,32	-	0,61	0,96	0,31	99,14
CRAVO	27.06.16	-	0,62	0,50	1,42	1,19	-	91,38	1,13	0,18	2,15	-	0,35	0,44	0,31	99,85
VOLK	27.06.16	-	0,63	0,67	1,43	1,16	-	89,71	1,89	0,20	3,12	-	0,45	-	0,29	99,55
TROYER	27.06.16	-	0,69	0,70	1,57	1,23	-	87,99	2,31	0,26	3,78	-	0,61	-	0,39	99,53
SWINGLE	27.06.16	-	0,69	0,64	1,47	0,50	-	91,94	2,08	0,19	1,69	-	0,27	0,24	0,28	99,99
CAIPIRA	27.06.16	-	0,55	0,51	1,36	1,50	-	89,18	1,53	0,20	3,28	-	0,44	0,54	0,38	99,47
F. DRAGON	27.06.16	-	0,72	0,74	1,62	0,58	-	90,80	2,10	0,25	2,13	-	0,45	-	0,31	99,70
<b>IR Calculado</b>		921	929	971	983	998	1014	1028	1053	1082	1093	1142	1180	1186	1293	
<b>IR Literatura</b>		924	932	969	980	1001	1018	1031	1054	1088	1098	1141	1177	1189	1294	

\*TI: Total Identificado

Na evolução da composição do OE ao longo do desenvolvimento dos frutos da tangerineira ‘Oneco’, observou-se que os teores dos componentes  $\beta$ -pineno e octanal permaneceram estáveis ao longo do tempo mantendo-se em  $1,39 \pm 0,27\%$  e  $1,16 \pm 0,28\%$  do OE, respectivamente. Os teores de limoneno, linalol e  $\gamma$ -terpineno apresentaram um comportamento cúbico enquanto os de  $\alpha$ -terpineol comportamento quadrático em relação ao tempo. Os teores de limoneno demonstraram um rápido incremento até os 220 DAPF e, posteriormente, mantiveram-se estáveis atingindo seus maiores valores ( $90,17 \pm 1,48\%$ ) na última amostragem entre 305 e 310 DAPF.

Bourgou *et al.* (2012) em experimento realizado na Tunísia demonstraram que a composição química e os teores de OE de *C. aurantium*, *C. limon*, *C. sinensis* e *C. reticulata* podem sofrer alterações durante a maturação dos frutos, sendo o nível mais alto de limoneno alcançado no estágio imaturo dos frutos dessas espécies. No entanto, Dugo *et al.* (2011) relatam decréscimo nos teores de limoneno no início e final do estágio de desenvolvimento de frutos das cultivares Avana e Tardivo di Ciaculli (*C. deliciosa*), embora estes autores não avaliaram frutos *C. reticulata*.

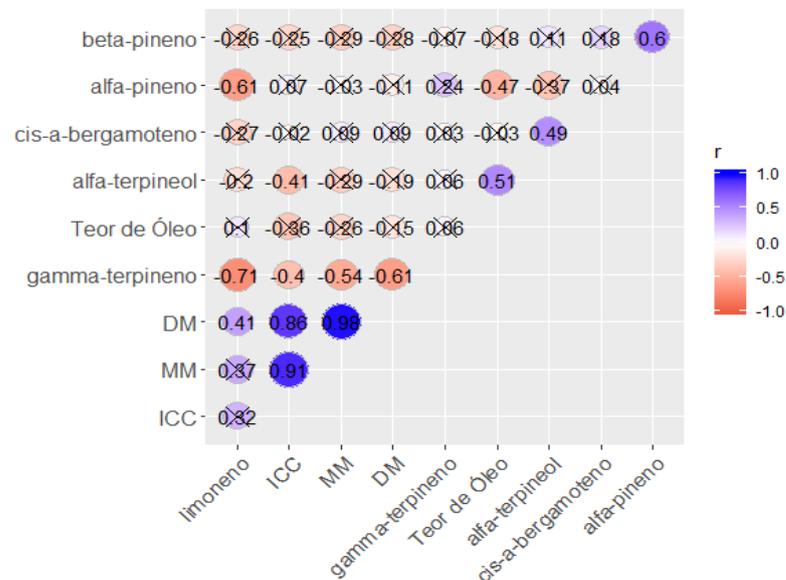
Em ‘Oneco’ o teor de linalol apresentou comportamento errático ao longo do desenvolvimento dos frutos e, os componentes  $\gamma$ -terpineno e  $\alpha$ -terpineol tenderam a reduzir seus teores com o crescimento dos frutos de forma mais suave no caso do  $\gamma$ -terpineno e de forma mais acentuada no caso de  $\alpha$ -terpineol. O linalol está entre os compostos mais valorizados comercialmente e confere intenso aroma floral aos OE de citros (SIMAS *et al.*, 2015). Diante disto, pode-se afirmar que em ‘Oneco’ os períodos mais recomendados para a colheita objetivando teores mais elevados dessa substância são os 180 DAPF, bem como os 280 DAPF (Figura 8).



**Figura 8.** Análises de regressão entre os teores de limoneno (A),  $\gamma$ -terpineno (B), linalol (C), e  $\alpha$ -terpineol (D) e o desenvolvimento dos frutos de ‘Oneco’, representado pelo número de dias após a plena floração (DAPF). Butiá-RS, julho de 2016.

### *Análises de correlação: ‘Montenegrina’*

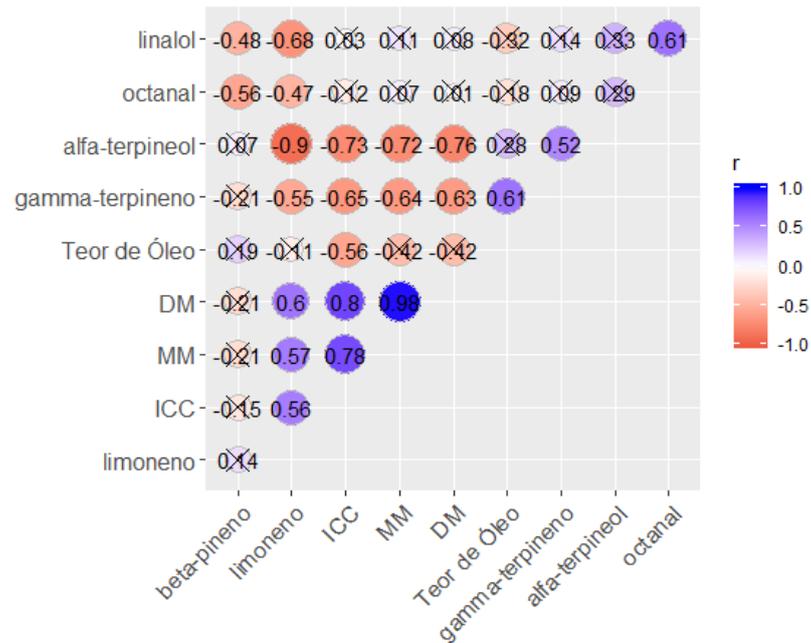
Através de análises de correlação de Pearson, avaliou-se a relação entre as características dos frutos: índice de coloração da casca (ICC), massa média (MM), diâmetro médio (DM), teor de óleo, e os compostos majoritários (limoneno,  $\gamma$ -terpineno,  $\alpha$ -terpineol, cis- $\alpha$ -bergamoteno,  $\alpha$ -pineno e  $\beta$ -pineno). Foi possível observar que o teor de  $\beta$ -pineno relacionou-se positivamente com o de  $\alpha$ -pineno, assim como os teores de cis- $\alpha$ -bergamoteno e  $\alpha$ -terpineol, e de  $\alpha$ -terpineol e teor médio de OE, ou seja, quanto maior a quantidade de OE por unidade de massa de fruto, maior a frequência de  $\alpha$ -terpineol na sua composição. Obteve-se correlação negativa do  $\alpha$ -pineno com o limoneno e com o teor de OE nos frutos, indicando que à medida que diminui o teor de OE nos frutos ou a quantidade de limoneno, o teor de  $\alpha$ -pineno aumenta. O teor de  $\gamma$ -terpineno no OE também se correlacionou negativamente com o teor de limoneno, com o índice de coloração da casca, e com a massa massa dos frutos e diâmetro dos frutos, indicando que com o aumento do teor de limoneno no OE ou o crescimento e amadurecimento do fruto, há diminuição do teor de  $\gamma$ -terpineno (Figura 9).



**Figura 9.** Análise de correlação para as características dos frutos de ‘Montenegrina’: massa média (MM), diâmetro médio (DM), índice de coloração da casca (ICC), teor de óleo essencial e compostos majoritários presentes no óleo essencial. Butiá-RS, julho de 2016. Coeficientes hachurados com × possuem  $p > 0,01$  e são considerados não significativos.

### ***Análises estatísticas de correlação: ‘Oneco’***

Através de análises de correlação foi possível observar que o teor de linalol relacionou-se positivamente com o teor de octanal, assim como o teor de  $\alpha$ -terpineol com o teor de  $\gamma$ -terpineno, e o teor de  $\gamma$ -terpineno com o teor de OE na casca das tangerinas ‘Oneco’. Ou seja, quanto maior o teor de linalol, maior o de octanal e quanto maior a quantidade de OE, maior a presença de  $\gamma$ -terpineno na sua composição, bem como quanto mais  $\gamma$ -terpineno, mais  $\alpha$ -terpineol. As características diâmetro, massa e índice de coloração da casca correlacionaram-se positivamente ao teor de limoneno no OE, indicando haver incremento nos teores de limoneno proporcionalmente ao crescimento dos frutos e mudanças de coloração características do processo de maturação dos frutos (Figura 10). Já o teor de linalol correlacionou-se negativamente aos teores de limoneno e  $\beta$ -pineno, indicando que há tendência de redução do teor de linalol com o aumento do limoneno e  $\beta$ -pineno, ou seja, há decréscimo daquele composto com o aumento destes últimos. Observou-se ainda que os teores de  $\alpha$ -terpineol e  $\gamma$ -terpineno correlacionaram-se significativamente de forma negativa aos de limoneno, bem como ao índice de coloração da casca, massa e diâmetro dos frutos, sendo que com o crescimento e amadurecimento dos frutos, além de ocorrer incremento de limoneno, também ocorreu redução dos teores de  $\alpha$ -terpineol e  $\gamma$ -terpineno (Figura 10). Relacionando essas informações com as da Figura 8, pode-se sugerir que as épocas mais recomendadas de colheita de ‘Oneco’ objetivando-se teores elevados de  $\alpha$ -terpineol e  $\gamma$ -terpineno seriam respectivamente 180 DAPF e 220 DAPF.



**Figura 10.** Análise de correlação para as características dos frutos de ‘Oneco’: massa média (MM), diâmetro médio (DM), índice de coloração da casca (ICC), teor de óleo essencial e compostos majoritários presentes no óleo essencial. Butiá-RS, julho de 2016. Coeficientes hachurados com × possuem  $p > 0,01$  e são considerados não significativos.

## Conclusões

Não foi possível verificar influência significativa dos porta-enxertos na composição do óleo essencial dos frutos de tangerineiras ‘Montenegrina’ e ‘Oneco’. Os frutos da tangerineira ‘Oneco’, durante o seu desenvolvimento, apresentam maiores teores médios de óleo essencial em relação aos frutos da tangerineira ‘Montenegrina’. Os teores máximos de OE obtidos foram aos 210 DAPF e 220 DAPF para ‘Montenegrina’ e ‘Oneco’, respectivamente, sendo a frequência dos compostos majoritários variável ao longo do desenvolvimento dos frutos, apresentando comportamento distinto em função do genótipo.

## Referências Bibliográficas

ADAMS, R.P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry**, 4 ed. Allured publishing: Waco, Texas (USA), 2017.

AGROSTAT - Estatísticas de Comércio Exterior do Agronegócio Brasileiro: **Exportação**. Brasília, 2019. Disponível em: <[www.indicadores.agricultura.gov.br/agrostat/index.htm](http://www.indicadores.agricultura.gov.br/agrostat/index.htm)>. Acesso em: 24 de fev. 2020.

- AGUILAR-HERNÁNDEZ, M. G. et al. Determination of the Volatile Profile of Lemon Peel Oils as Affected by Rootstock. **Foods**, v. 9, n. 241, 9p., 2020.
- BEYER, W. H. **Standard Mathematical Tables**, 28th ed. Boca Raton, FL: CRC Press, 1987.
- BIZZO, H. R.; HOVEL, A. M. C. & REZENDE, C. M. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 3, p. 588-594, 2009.
- BIZZO, H. R. Óleos essenciais: uma fonte de divisas a ser mais explorada no Brasil. **A Lavoura**, n. 699, p. 49-53, 2013. Disponível em: <[https://issuu.com/sociedadenedacionaldeagricultura/docs/a\\_lavoura\\_699](https://issuu.com/sociedadenedacionaldeagricultura/docs/a_lavoura_699)>. Acessado em: 14 de abr. 2020.
- BOURGOU, S. et al. Changes of Peel Essential Oil Composition of Four Tunisian Citrus during Fruit Maturation. **The Scientific World Journal**, 10p., 2012.
- CANO, A. & BERMEJO, A. Influence of rootstock and cultivar on bioactive compounds in citrus peels. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, n. 91, p. 1702-1711, 2011.
- DEWICK, P. M. **Medicinal Nactural Products: A Biosynthetic Approach**. Third Ediction, 546p., 2009.
- DUGO, P. et al. Analytical characterization of mandarin (*C. deliciosa* Ten.) essential oil. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 26, p. 34-46, 2011.
- EEA/UFRGS. 2020. Pesquisa: **Dados meteorológicos da Estação Experimental Agrônômica – 1970 a 2018**. Disponível em: <[www.ufrgs.br/agronomia/eea](http://www.ufrgs.br/agronomia/eea)>. Acessado em: 09 abr. 2020.
- EMBRAPA. **Sistema Brasileiro de Classificação de Solos**. 2.ed. Rio de Janeiro: Embrapa Solos, 2006, 306 p.
- FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Statistic Division**. 2018. Disponível em: <[faostat.fao.org](http://faostat.fao.org)>. Acesso em: 09 abr. 2020.
- ECOCITRUS. **Notícias** - Raleio: bergamota verde também é lucro. 2015. Disponível em:< <http://www.ecocitrus.com.br/index.php/noticia/raleio-bergamota-verde-tambem-e-lucro-40>>. Acessado em: 14 de abr. 2020.
- FRIZZO, C. D.; LORENZO, D. & DELLACASSA, E. Composition and seasonal variation of the essential oils from two mandarin cultivars of southern Brazil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 10, p. 3036 – 3041, 2004.
- GONZATTO, M. P. et al. Performance of ‘Oneco’ mandarin on six rootstocks in South Brazil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 46, n. 4, p. 406-411, 2011.
- GONZATTO, M. P. Desempenho hortícola de tangerineiras e híbridos sobre diferentes porta-enxertos no Rio Grande do Sul. 2015. 185 p. **Tese** (Doutorado em Fitotecnia) –

Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2015.

GRASSI FILHO, H. Preparo de amostras e métodos para a determinação do teor de óleo essencial de frutos de limoeiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 27, n. 1, p.191-193, 2005.

IBGE. 2018. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Sistema IBGE de Recuperação Automática: SIDRA**. Disponível em: <<http://sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/listabl.asp?c=1613&z=t&o=11>> Acesso em: 20 mar. 2020.

INTRIGLIOLO, F. et al. Yield and nutritional parameters related to quantity and quality of Bergamot oil. **Proceedings of the International Society of Citriculture**. v. 2: p. 817-821, 1996.

JOÃO, P. L.; CONTE, A. A citricultura no Rio Grande do Sul. In: EFROM, C. F. S. (Org.) **Citricultura do Rio Grande do Sul: indicações técnicas**. Porto Alegre: Secretaria da Agricultura, Pecuária e Irrigação - SEAPI; DDP, p. -2, 2018.

KNIGHT, T. G.; KLIEBER, A. & SEDGLEY, M. The relationship between oil gland and fruit development in Washington Navel Orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck). **Annals of Botany**, v. 88, p. 1039-1047, 2001.

KÖLLER, O. C (coord;). **Citricultura, cultura de tangerineiras: tecnologia de produção, pós-colheita e industrialização**. Porto Alegre: Editora Rígel, 2009. 400p.

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

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Relação Internacionais do Agronegócio (SRI): **Balança comercial do Agronegócio**, 2017. Disponível em:<<https://static.poder360.com.br/2018/01/Balancacomercialagro2017.pdf>>. Acessado em: 14 de abr. 2020.

MONTERO, C. R. S. **Alterações fisiológicas e anatômicas causadas por danos mecânicos durante o beneficiamento de maçãs e frutos cítricos**. 2010. 158p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

MORAIS, L. A. S. Influência dos fatores abióticos na composição química dos óleos essenciais. **Horticultura Brasileira**, v. 27, n. 2, 2009

RASHIDI, M.; BEHBOODI, S. & ASL, H. B. Modeling of Tangerine Mass Based on Geometrical Properties. **Agricultural Engineering Research Journal**, v. 8, n. 1, p. 6-9, 2018.

RODRIGUES, L. R. et al. **Raleio manual de frutos em tangerineiras**

**Montenegrina'**. Disponível

em:<<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/it45103/1/RALEIO-MANUAL-DE-FRUTOS-EM-TANGERINEIRAS.pdf>>. Acessado em: 15 mar. 2020.

SARTORI, I. A. et al. Épocas de maturação de tangerinas na depressão central do Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 20, p. 313-322, 1998.

SCHWARZ, S. F.; SOUZA, E. L. S.; OLIVEIRA, R. P. Características das variedades copa. In: SOUZA, P. V. D. (Ed.) et al. **Indicações técnicas para a citricultura do Rio Grande do Sul**. Porto Alegre: FEPAGRO, 2010. p. 31-43.

SEAPDR – Secretaria da Agricultura, Pecuária e Desenvolvimento Rural. Radiografia da agropecuária gaúcha: **Tangerina/Bergamota**. 2019. Disponível em: <<https://www.agricultura.rs.gov.br/secretaria-da-agricultura-apresenta-radiografia-da-agropecuaria-gaucha-2019>>. Acessado em: 14 de abr. 2020.

SIMAS, D. L. R. et al. Caracterização dos óleos essenciais de frutas cítricas. **Citrus Research & Technology**, Cordeirópolis, v. 36, n. 1, p. 15-26, 2015.

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

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

OLIVEIRA, R. P.; SCIVITTARO, W. B. Cadeia produtiva de citros do Rio Grande do Sul. **Citricultura Atual**, Cordeirópolis, v. 100, p. 4-6, 2014.

OLIVEIRA, R. P. et al. Cultivares-copa. In: OLIVEIRA, R. P.; SCIVITTARO, W. B. (Ed.). **Cultivo de citros sem sementes**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2011. p. 65-108. (**Sistema de Produção**, 21).

OLIVEIRA, R. P. et al. Diferenciação das tangerineiras mais cultivadas no Rio Grande do Sul. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2018. 21p. (**Documentos**, 453).

VERZERA, A. et al. Effects of Rootstock on the Composition of Bergamot (*Citrus bergamia* Risso et Poiteau) Essential Oil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, n. 51, p. 206-210, 2003.

ZOUAGHI, G. et al. Essential oil components of Citrus cultivar 'Maltaise Demi Sanguine' (*C. sinensis*) as affected by the effects of rootstocks and viroid infection. **International Journal of Food Properties**, v. 22, n. 1, 438-448, 2019.

ZULIAN, A.; DORR, A. C.; ALMEIDA, S. C. Citricultura e agronegócio cooperativo no Brasil. **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**. Universidade Federal de Santa Maria, v. 11, n. 11, p. 2290-2306, 2013.

## **4 ARTIGO 2**

### **Caracterização do óleo essencial de tangerinas verdes extraído pelos métodos laboratorial e industrial\***

\*Artigo formatado nas normas da revista Journal of Essential Oil Research

## Resumo

Os óleos essenciais de citros situam-se dentre os mais comercializados e utilizados, estando os de tangerinas (*Citrus deliciosa*) dentre os mais valorizados comercialmente. O método de extração mais empregado para a obtenção do óleo essencial de citros em escala laboratorial é a hidrodestilação em aparelho do tipo Clevenger, já para o óleo essencial de frutos verdes, em escala industrial, é a escarificação do epicarpo dos frutos. Sabe-se que o método de extração é determinante no rendimento e composição do óleo essencial. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar o rendimento e composição do óleo essencial dos frutos imaturos das principais variedades de *C. deliciosa* cultivadas no Rio Grande do Sul a partir dos métodos laboratorial (Clevenger) e industrial (escarificação). Para tanto, em quatro ocasiões, realizou-se a amostragem de frutos dos mesmos lotes para a hidrodestilação em laboratório, bem como dos óleos essenciais extraídos em agroindústria. O rendimento médio obtido foi de 0,07% (Clevenger) e de 0,53% (escarificação). A partir de análises estatísticas foi possível verificar acentuada redução do rendimento ao longo das avaliações no método industrial, e discreto aumento do rendimento, seguido de redução, no laboratorial. Após análises de CG/EM e CG/DIC, identificou-se o total de 25 diferentes compostos. Os componentes majoritários foram o limoneno (66,53 a 71,28%) e o  $\gamma$ -terpineno (12,09 a 18,42%), em ambos os métodos, embora tenha havido maior quantidade de compostos com teor superior a 1% no óleo proveniente de hidrodestilação. Concluiu-se que o método industrial confere maior rendimento de extração, mas menor diversificação de substâncias na composição do óleo essencial, oposto ao verificado no laboratorial.

**Palavras-chave:** *Citrus deliciosa*, rendimento, escarificação, hidrodestilação.

## Introdução

A citricultura é uma das mais importantes cadeias de produção agrícola do Brasil, que segundo Neves & Trombini (2017) gera ao ano um PIB de US\$ 6,5 bilhões de dólares em todos os elos da sua cadeia, oportunizando mais de 200 mil empregos diretos e indiretos, sendo o país responsável por mais da metade do suco de laranja produzido no mundo e por 76% do comércio mundial desta *commodity*. No setor de processamento, além da indústria de sucos, a produção de óleos essenciais tem evidenciado sua importância, situando o Brasil entre os principais fornecedores de óleo essencial no mercado mundial (Bizzo et al., 2009), sendo que em 2019 ultrapassou a marca de 56 mil toneladas exportadas de óleos essenciais a partir de plantas cítricas, movimentando cerca de US\$ 301 milhões (Agrostat, 2020).

Os óleos essenciais de citros são amplamente utilizados nas indústrias de alimentos, farmacêutica e cosmética, como substâncias naturais incrementadoras de sensações organolépticas (sabor e aroma) (Cornélio et al., 2004). Só na indústria de alimentos, os óleos essenciais de citros representam 40% do total de óleos essenciais empregados (Ferrua, 2001). Dentre as composições (*blends*), mais comercializados mundialmente para perfumaria estão os óleos de bergamote, limão, mandarina, tangerina e laranja (Bizzo, 2009).

Para a extração dos óleos essenciais podem ser utilizados métodos distintos. Entretanto, dependendo do método empregado, a composição dos óleos pode variar consideravelmente (Cassel et al., 2009). Dentre os métodos de extração de óleos essenciais de frutos cítricos em escala industrial há predomínio do uso da prensagem a frio (pressão hidráulica), que trata-se de uma técnica de extração mecânica, muito empregada na indústria de sucos, através da qual os frutos maduros são prensados, sendo extraído assim tanto o suco quanto o óleo essencial (Oliveira & Jose, 2007).

No Rio Grande do Sul, a técnica comumente empregada para a extração de óleos essenciais de frutos cítricos difere da usual no Sudeste do país, sendo que os frutos de mandarina ainda em estado imaturo (verdes) são submetidos a um processo de “ralagem” ou escarificação do epicarpo. O óleo obtido neste procedimento passa por processos de decantação e centrifugação, originando assim o denominado “óleo de mandarina verde”, bastante valorizado no mercado internacional (Ecocitrus, 2020).

A extração do óleo essencial de mandarina verde é feita a partir de frutos retirados por meio de uma prática de manejo usual em tangerineiras: o raleio manual de frutos. Esta técnica objetiva reduzir a alternância de produção em tangerineiras, bem como melhorar a qualidade dos frutos através de incremento no calibre e em características organolépticas (Rodrigues et al., 1998; Köller, 2009). Considerando-se que a produção de citros no Rio Grande do Sul é destinada, principalmente, para o consumo *in natura* (frutas de mesa) essa prática de manejo adquire grande importância (João, 2010). Assim, a comercialização dos frutos para a extração de óleos essenciais tem possibilitado o retorno econômico de parte dos gastos despendidos pelos citricultores em mão de obra para a realização do raleio (Gonzatto, 2015).

Dentre os métodos de extração de óleos essenciais, a hidrodestilação é o método mais antigo, dito um método artesanal, contudo, bastante empregado em escala laboratorial (Silveira *et al.*, 2012). Nesta técnica a matéria prima permanece imersa em água e é destilada em temperatura que não excede os 100 °C, empregando-se aparelho tipo Clevenger. Este método mostra-se extremamente versátil, podendo ser utilizado para a extração de óleo essencial de diferentes tipos de estruturas vegetais: flores, frutos, folhas, rizomas, raízes, sementes, cascas, castanhas e galhos (Leal, 2008). Contudo, devido às reações de hidrólise, pode ocorrer a redução da qualidade e valor dos óleos essenciais extraídos por hidrodestilação (Leal, 2008).

A tangerineira ‘Montenegrina’ é a cultivar de *Citrus deliciosa* com maior área de cultivo no Estado do Rio Grande do Sul, embora haja áreas significativas ocupadas por outras cultivares desta espécie, como a ‘Caí’, ‘Parei’, ‘Rainha’, por exemplo (Oliveira et al., 2018). De acordo com Frizzo et al. (2004), estudando a composição do óleo essencial das tangerinas ‘Cai’ e ‘Montenegrina’, estes possuem características químicas semelhantes às do óleo essencial de mandarina italiano, óleo de maior valorização e interesse comercial. Logo, o Rio Grande do Sul, apresenta grande potencial para produção de óleo essencial de qualidade e elevada remuneração, tendo em vista o predomínio do cultivo de tangerineiras da espécie *C. deliciosa* na região, assim como a presença de indústrias extratoras.

Tendo em vista o amplo uso dos métodos de extração laboratorial e industrial, bem como o predomínio da produção de tangerineiras da espécie *C. deliciosa*, este trabalho teve como objetivo comparar o rendimento de extração e composição dos óleos essenciais extraídos de frutos de tangerineiras das cultivares Montenegrina, Caí, Pareci e Rainha, oriundos dos mesmos lotes, a partir da extração por hidrodestilação em aparelho do tipo Clevenger, representando a escala laboratorial, e extração em escala industrial pelo método da escarificação da casca dos frutos realizado em agroindústria.

## **Material e Métodos**

### ***Amostragens de frutos e óleo essencial de mandarina verde***

Foram coletadas amostras de frutos em Agroindústria de Sucos e Óleos essenciais situada em Montenegro (RS) em datas distintas: 14 de março, 21 de março, 28 de março e 04 de abril de 2017, sendo coletadas em cada data três amostras pesando aproximadamente um quilograma (1 kg) de frutos do mesmo lote (carga). Também foram coletadas três amostras do óleo essencial obtido na Agroindústria através da escarificação da casca dos frutos, decantação e centrifugação, referentes aos mesmos lotes de onde

foram coletadas as amostras de frutos. O período amostral corresponde ao momento de maior remuneração ao produtor pela indústria, bem como à época mais próxima à recomendada para a realização do raleio em tangerineiras. Os lotes de frutos da Agroindústria correspondiam a mesclas das cultivares de *Citrus deliciosa* cultivadas no Vale do Caí (RS): ‘Montenegrina’, ‘Caí’, ‘Pareci’ e ‘Rainha’.

### ***Extração laboratorial***

As amostras de frutos coletados na Agroindústria foram levadas ao laboratório, onde foram submetidos ao procedimento de hidrodestilação em aparelho do tipo Clevenger. No laboratório os frutos foram fracionados, acondicionados em balões com capacidade de seis litros (6L) e preenchidos com dois litros (2L) de água destilada. A duração do procedimento de extração foi de quatro horas (4h), realizada em temperatura de até 100 °C. O óleo essencial extraído foi medido na coluna graduada do aparelho, pesado e então transferido, com o auxílio de pipeta de precisão, para frascos âmbar com capacidade de 10 mL para armazenagem até o momento da análise.

### ***Análises de cromatografia***

As análises de CG/EM foram realizadas em um cromatógrafo a gás acoplado a um espectrômetro de massas Hewlett Packard 6890/MSD5973 equipado com o software HP-Chemstation e espectroteca Wiley 275 (Hoboken, NJ, USA). Utilizou-se uma coluna capilar de sílica fundida HP-5 (30 m × 250 µm) com 0,50 µm de espessura de filme (Hewlett Packard). A programação de temperatura utilizada foi de 60 a 246 °C a 3 °C/min, temperatura do injetor de 250 °C, temperatura da interface de 280 °C; split ratio 1:100; hélio como gás de arraste (56 kPa); vazão de 1,0 mL/min; energia de ionização de 70 eV; volume de amostra injetado de 1 µL, diluída em hexano (1:10).

Os componentes foram identificados por comparação de seus respectivos espectros de massa com os da espectroteca Wiley, selecionadas pelo software do sistema pela

percentagem de similaridade e por comparação de seus índices de retenção linear (IRL) com os índices reportados por Adams (2017). O IRL dos componentes foi calculado utilizando a equação de Van den Dool e Kratz, utilizando uma solução padrão de alcanos de C7 a C30.

As análises de CG/DIC foram realizadas utilizando um cromatógrafo a gás Hewlett Packard 6890 Series equipado com um processador de dados HP-Chemstation, utilizando uma coluna HP-5 (30 m × 320 µm d. i.) com 0,50 µm de espessura de filme (Hewlett Packard, Palo Alto, CA, USA). Programação de temperatura foi a mesma do GC-MS; temperatura do injetor de 250 °C; split ratio 1:50; temperatura do detector de 250 °C; hidrogênio como gás de arraste (34 kPa); volume de amostra injetado de 1 µL, diluída em hexano (1:10).

### ***Análises dos dados***

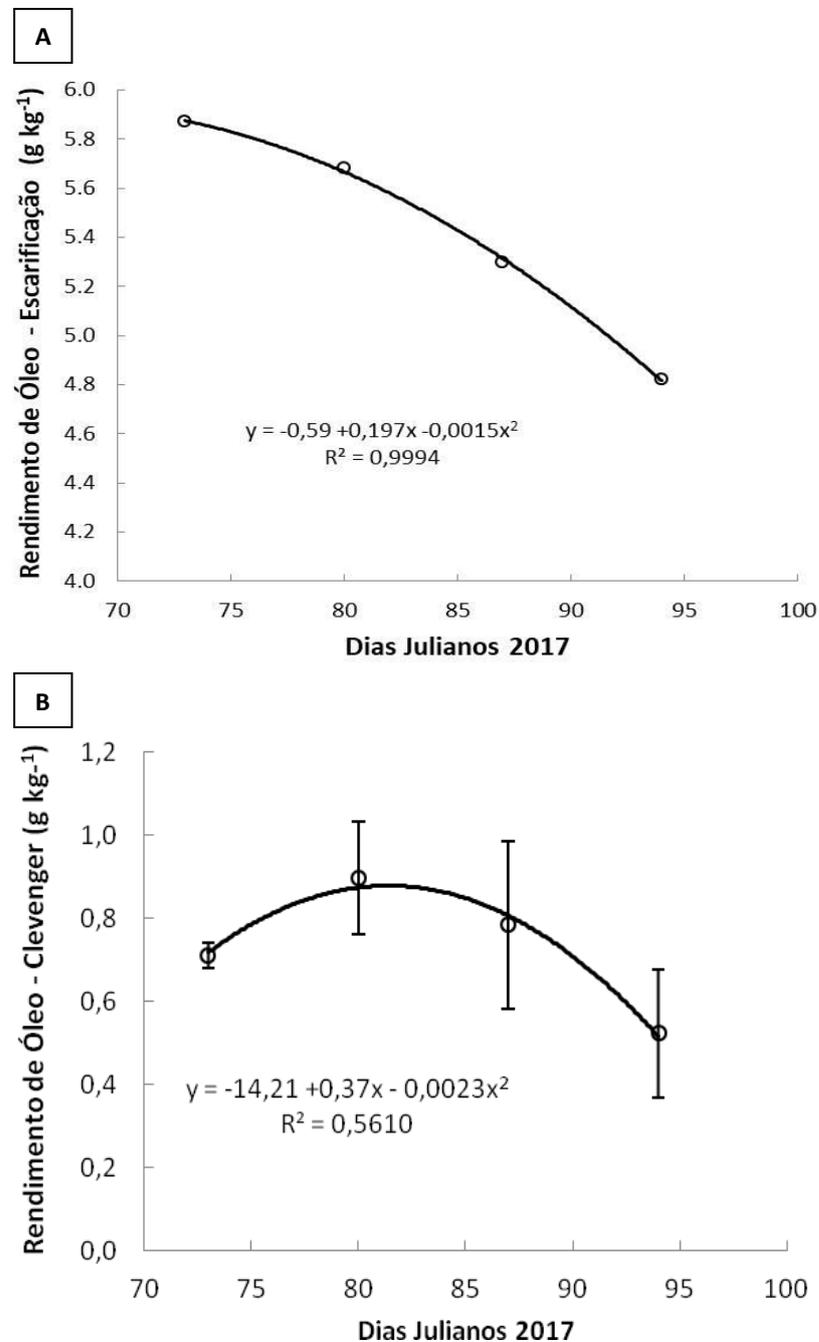
A frequência dos componentes identificados, extraídos por métodos diferentes em datas diferentes foram submetidos à análise de variância fatorial (2 métodos de extração × 4 datas de amostragem). Realizou-se também a análise de correlação linear de Pearson (r) para os teores dos óleos essenciais e dos diferentes compostos que os compõe, utilizando-se o software SAS 9.4®. Adicionalmente, realizou-se análise de regressão dos teores de óleos essenciais extraídos pelos métodos Clevenger e de escarificação, por meio do programa Sigmaplot 14.0 ®.

## **Resultados e Discussão**

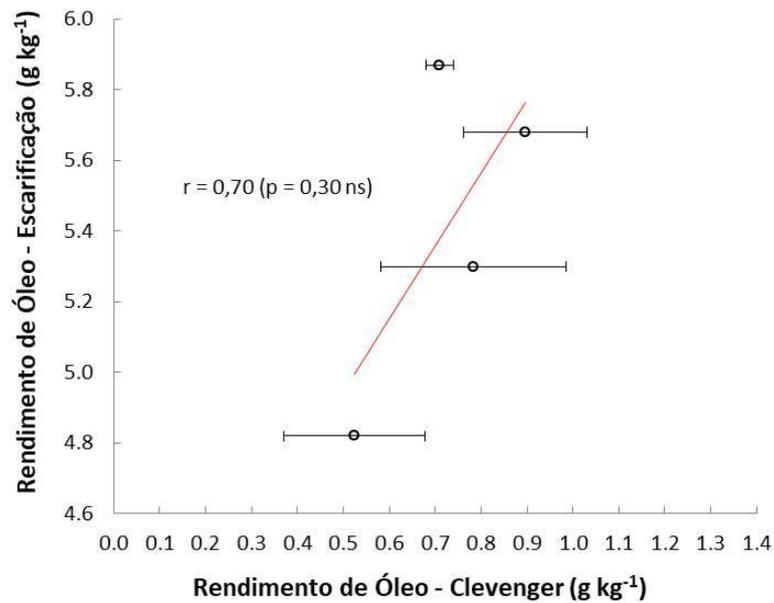
### ***Rendimento de extração de óleos essenciais***

Em relação ao comportamento do rendimento da extração do óleo essencial, observou-se um comportamento quadrático do rendimento em relação ao tempo para ambos os métodos avaliados (Figuras 1A e 1B). No método de escarificação, o rendimento de extração do óleo apresentou redução ao longo do período avaliado, sendo

que os maiores valores obtidos foram de 5,87 % na primeira avaliação aos 73 dias julianos (14 de março) (Figura 1A). Já o rendimento de óleo extraído pelo método de hidrodestilação de Clevenger atingiu um valor máximo de 0,88 % aos 80 dias julianos (21 de março), tendo um comportamento decrescente a partir deste ponto (Figura 1B).



**Figura 1.** Análise de regressão para avaliando o rendimento de óleo essencial obtido para os métodos de extração por escarificação (A) e hidrodestilação em Clevenger (B) de acordo com a data de amostragem (dias julianos). Montenegro - RS, abril de 2017.



**Figura 2.** Análise correlação entre o rendimento de óleo essencial obtido por escarificação e hidrodestilação em Clevenger. Montenegro - RS, abril de 2017.

O coeficiente de correlação linear de Perason calculado entre os dois métodos de extração foi de  $r = 0,70$ , contudo não apresentou significância estatística ( $p = 0,30$ ), demonstrando não haver correlação entre os teores extraídos entre os dois métodos (Figura 2). Os rendimentos de extração variaram, em média no período avaliado, entre 4,82 e 5,87 g kg<sup>-1</sup> de frutos de citros para o método industrial da escarificação, e entre 0,52 e 0,90 g kg<sup>-1</sup> para o método da hidrodestilação de Clevenger.

De acordo com Pauletti & Silvestre (2018), os rendimentos de extração industrial são variáveis, sendo que para o óleo essencial de mandarina verde (*C. deliciosa*), variam de 4 a 5kg de óleo por tonelada de frutos processados. Neste estudo, obteve-se em média 5,4 kg de óleo essencial por tonelada de frutos na extração em agroindústria. Calculando-se o teor de óleo essencial contido nos frutos, o mesmo variou de variou de 0,48 a 0,58% pelo método da escarificação, e de 0,04 a 0,10% pela hidrodestilação.

Conforme Teixeira et al. (2014), os teores de óleo essencial em *C. deliciosa* variam de 0,25 a 1,29% quando extraído através da hidrodestilação em aparelho Clevenger, sendo o rendimento obtido neste estudo, pelo mesmo método, inferior ao relato por estes autores. Assim como em relação ao relatado por Simas *et al.* (2015) para mexerica-do-Rio (*C. deliciosa*), de 1,99% para o método de hidrodestilação. Entretanto, estes autores avaliaram apenas frutos maduros, não analisando os teores ao longo do desenvolvimento, bem como frutos cultivados em outra região do país (Sudeste). Gonzatto (2015) obteve teores médios de 0,10% para ‘Montenegrina’ (*C. deliciosa*) também cultivada no Rio Grande do Sul e utilizando a hidrodestilação em aparelho Clevenger, teores próximos aos obtidos neste presente estudo de em média 0,07%. Segundo Guenther (1948), frutos verdes proporcionam OE de maior qualidade em termos de aroma em relação ao OE de frutos maduros.

#### ***Composição dos óleos essenciais***

Foram identificados 25 diferentes compostos voláteis nos óleos essenciais analisados neste experimento, estando a maior diversidade de substâncias presente nos óleos extraídos pelo método da hidrodestilação em aparelho Clevenger (25), em comparação à escarificação (apenas 17) (Tabela 1). Os compostos identificados correspondem a até 99,97% da composição total dos óleos essenciais extraídos através da escarificação, e até 95,07% do total dos óleos extraídos por hidrodestilação em Clevenger.

**Tabela 1.** Teores dos compostos identificados por data amostral e método, probabilidades de significância da análise de variância (teste F) para tempo (P<sub>t</sub>), método(P<sub>m</sub>) e para a interação (P<sub>t\*m</sub>), e coeficientes decorrelação de Pearson. Montenegro – RS, abril de 2017.

Componentes	Escarificação					Média	Clevenger					Média	P t (tempo)	P m (método)	P t*m (tempo*método)	Correlação de Perason	
	14-mar (73)	21-mar (80)	28-mar (87)	4-abr (94)			14-mar (73)	21-mar (80)	28-mar (87)	4-abr (94)						r	p
limoneno	71,14	70,15	71,63	72,20	71,28 A	67,06	66,69	66,21	66,16	66,53 B	0,95	0,00	0,80	-0,63	0,37		
γ-terpineno	18,80	19,89	18,34	16,63	18,42 A	11,92	13,68	12,10	10,67	12,09 B	0,01	<0.0001	0,89	<b>0,96</b>	<b>0,04</b>		
mirreno	1,82 aA	1,77 aA	1,73 aA	1,68 aA	1,75	1,28 aB	1,37 aB	1,08 bB	1,16 bB	1,22	0,00	<0.0001	0,02	0,59	0,41		
sabineno	1,75	1,73	1,64	1,58	1,67 A	0,77	0,69	0,54	0,56	0,64 B	0,04	<0.0001	0,88	0,91	0,09		
α-pineno	2,07 aA	1,97 aA	0,78 bB	0,76 bB	1,40	0,75 bB	1,00 bB	1,70 aA	1,75 aA	1,30	0,01	0,06	<0.0001	<b>-0,99</b>	<b>0,01</b>		
terpinoleno	1,01 abB	1,07 abB	1,21 aA	0,95 bB	1,06	1,58 aA	1,37 abA	1,00 cA	1,20 bcA	1,29	0,00	<0.0001	<0.0001	-0,57	0,43		
α-tujeno	0,76 aA	0,73 aA	0,66 aA	0,66 aA	0,70	0,09 bB	0,22 aB	0,19 aB	0,16 aB	0,17	0,11	<0.0001	0,01	-0,41	0,59		
cis-α-bergamoteno	0,52	0,63	0,56	0,66	0,59	0,61	0,57	0	0	0,29	0,63	0,17	0,54	-0,32	0,68		
α-sinesal	0,42	0,44	0,42	0,51	0,45 A	0,08	0,06	0,12	0,06	0,08 B	0,81	<0.0001	0,46	-0,53	0,47		
α-terpineno	0,40	0,40	0,50	0,33	0,41 B	0,47	0,64	0,69	0,61	0,60 A	0,42	0,01	0,75	0,44	0,56		
cadieno	0,29	0,31	0,32	0,35	0,32 A	0	0,06	0	0	0,02 B	0,44	<0.0001	0,32	-0,14	0,87		
linalol	0,20	0,32	0,27	0,35	0,29 B	1,41	1,17	1,37	1,53	1,37 A	0,41	<0.0001	0,43	0,03	0,97		
α-terpineol	0,28	0,30	0,24	0,33	0,29 B	4,95	4,54	4,70	6,07	5,06 A	0,34	<0.0001	0,41	0,69	0,31		
acetato de terpinol	0,09	0,09	0,10	0,13	0,10 B	1,39	1,09	0,93	1,32	1,18 A	0,24	<0.0001	0,27	0,23	0,77		
acetato de octila	0,08	0,13	0,11	0,00	0,08	0,16	0,19	0,05	0,16	0,14	0,61	0,21	0,46	0,19	0,81		
octanal	0,20 aB	0 aB	0,09 aB	0 aB	0,07	2,55 aA	1,21 cA	1,08 cA	1,47 bA	1,58	0,00	<0.0001	0,00	0,79	0,21		
β-cariofileno	0,05	0,04	0,10	0,07	0,07	0	0	0	0	0	-	-	-	-	-		
óxido de limoneno	0 bA	0 bA	0,17 aA	0 bA	0,04	0,09 aA	0,04 aA	0,003 aB	0,07 aA	0,05	0,21	0,77	0,00	-0,81	0,19		
d-gemacreno	0	0	0,03	0,05	0,02	0	0,08	0	0	0,02	0,72	1,00	0,30	-0,55	0,45		
N-metil-antranilato de metila	0	0	0	0	0	1,81	1,82	3,10	3,30	2,51	-	-	-	-	-		
terpin-4-ol	0	0	0	0	0	2,02	1,99	2,22	2,33	2,14	-	-	-	-	-		
formiato de nerila	0	0	0	0	0	0,46	0,56	0,21	0,33	0,39	-	-	-	-	-		
nerol	0	0	0	0	0	0,24	0,31	0,31	0,46	0,33	-	-	-	-	-		
camphor	0	0	0	0	0	0,17	0,26	0,19	0,52	0,29	-	-	-	-	-		
canfeno	0	0	0	0	0	0,07	0,03	0,01	0	0,03	-	-	-	-	-		
<b>Total identificado</b>	99,88	99,97	98,70	97,20	98,94	95,07	94,54	91,76	92,89	93,57							

\*As letras maiúsculas comparam o efeito do método de extração, seja na média de cada composto ou ao longo das amostragens; e as letras minúsculas exprimem o efeito do tempo, dentro do mesmo método.

Os compostos majoritários mais abundantes nos métodos da escarificação (E) e hidrodestilação em Clevenger (C) foram os hidrocarbonetos monoterpênicos limoneno, 66,53% (E) - 71,28% (C); e  $\gamma$ -terpineno, 12,09% (E) - 18,42% (C) (Tabela 1). Os demais majoritários na escarificação foram: mirceno, sabineno, terpinoleno e  $\alpha$ -tujeno - todos hidrocarbonetos monoterpênicos, sendo esta classe química responsável em média por mais de 98% da composição total do óleo essencial extraído por este método (Tabela 2); enquanto na hidrodestilação por Clevenger, além dos hidrocarbonetos monoterpênicos, classes químicas como as dos alcoóis (linalol,  $\alpha$ -terpineol, terpin-4-ol), aminas, ésteres (N-metil antranilato de metila), além de aldeídos, tiveram contribuições importantes na composição do óleo essencial (Tabela 1).

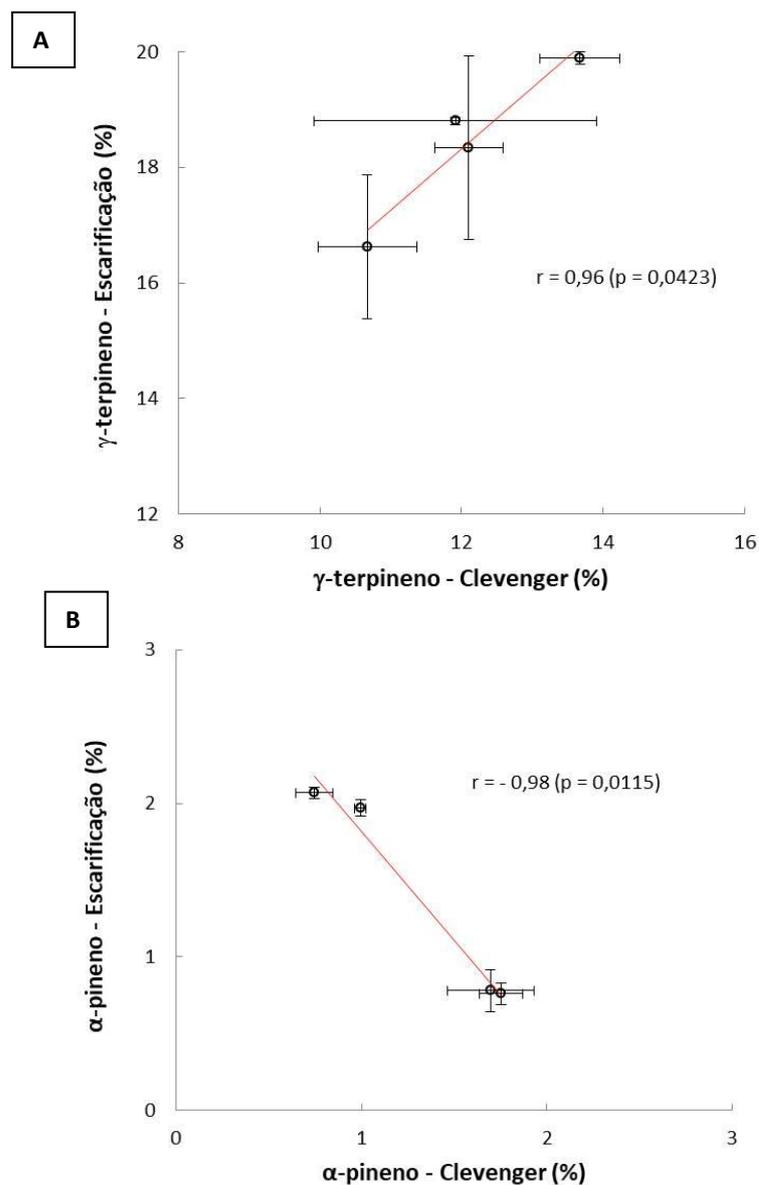
**Tabela 2.** Composição média (%) dos óleos essenciais extraídos pelos métodos industrial (escarificação) e laboratorial (Clevenger) por classe química. Montenegro-RS, abril de 2017.

Classe química	Escarificação (%)	Clevenger (%)
<b>Hidrocarbonetos Monoterpenos</b>	98,22	83,94
Alcoóis	0,58	8,96
Aminas	-	2,53
Ésteres	0,82	2,07
Aldeídos	0,53	1,67
Cetonas	-	0,30
<b>Hidrocarbonetos Sesquiterpenos</b>	0,42	0,04

Os resultados obtidos corroboram os relatados por Frizzo et al. (2004) a partir do óleo essencial de frutos de *C. deliciosa* cultivados na mesma região e obtido pelos mesmos métodos de extração, estando dentre os majoritários citados por estes autores o limoneno, cujos teores médios foram de 73,36% (C) - 72,18% (E) e  $\gamma$ -terpineno, cujos teores foram de 14,75% (C) - 17,94% (E). Assim como neste estudo, Frizzo et al. (2004) obtiveram o N-metil-antranilato de metila como um dos principais majoritários no

método da hidrodestilação em Clevenger, bem como dentre os mais abundantes os compostos mirceno,  $\alpha$ -pineno,  $\beta$ -pineno, octanal e terpin-4-ol.

A grande maioria dos compostos não tem seu teor de composição no óleo essencial correlacionado entre os dois métodos, exceto o  $\gamma$ -terpineno e o  $\alpha$ -pineno, cuja correlação foi significativa (Tabela 1). Para o  $\gamma$ -terpineno observou-se forte correlação linear positiva ( $r=0,96$ ), em ambos os métodos (Figura 3A); enquanto para o  $\alpha$ -pineno a correlação foi fortemente negativa ( $r=0,98$ ) (Figura 3B).



**Figura 3.** Análises de correlação significativas entre os teores dos compostos  $\gamma$ -terpineno (A) e  $\alpha$ -pineno (B) em função dos métodos de extração utilizados: escarificação e hidrodestilação em Clevenger. Montenegro - RS, abril de 2017.

### ***Influência do método de extração nos óleos essenciais***

Avaliou-se ainda a interação entre os compostos identificados, o efeito dos métodos sobre a composição do óleo essencial nos diferentes tempos de avaliação dentro de cada método em função do tempo, assim como entre os métodos (Tabela 1). Observou-se significância na interação entre os teores de  $\gamma$ -terpineno e o tempo de amostragem, lembrando que os teores deste composto apresentaram crescimento. Houve ainda significância entre os teores de  $\alpha$ -pineno e a relação entre as variáveis tempo e método, sendo verificado teores crescentes de  $\alpha$ -pineno em extração via Clevenger e decrescentes na escarificação.

De acordo com Pauletti & Silvestre (2018), as mandarinas apresentam maior rendimento e variedade quanto à composição em comparação aos óleos essenciais de outros frutos de citros. Nesses frutos, os aldeídos, álcoois e cetonas, comumente presentes como compostos minoritários ou mesmo como traços, são de grande importância na composição do aroma do óleo essencial, tratando-se de produtos de alto valor agregado quando comparados a outros terpenos que fazem parte da composição do óleo essencial (Pauletti & Silvestre, 2018). No presente estudo, os maiores teores de alcoóis, amins, ésteres e aldeídos foram obtidos pelo método da hidrodestilação em aparelho Clevenger (Tabela 2), demonstrando também este método proporcionar a maior diversidade de substâncias na composição dos óleos essenciais. Segundo Cassel et al. (2009), o método de extração empregado é determinante na composição dos óleos essenciais.

Embora tenha apresentado composição mais diversificada, o óleo essencial extraído por hidrodestilação foi o que apresentou o menor rendimento de extração, sendo este até cinco vezes inferior ao obtido na indústria. Possivelmente isso tenha ocorrido no presente trabalho por terem sido utilizados frutos inteiros, pois Frizzo et al. (2004) relatam teor médio de 0,45% de para frutos das cultivares Caí e Montenegrina (C.

*deliciosa*) cultivadas na mesma região de realização deste estudo, empregando também o método de hidrodestilação em Clevenger, mas utilizando apenas cascas moídas de frutos frescos.

Conforme Serafini et al. (2002) e Silveira et al. (2012), o fato de a matéria prima permanecer em contato direto com a água quente por longos períodos de tempo no método da hidrodestilação pode promover a degradação de alguns compostos. Na hidrodestilação, processos de hidrólise, hidrossolubilização ou degradação térmica podem ocorrer, sendo estes os principais problemas relatados neste método e os responsáveis pela redução do rendimento de óleo essencial obtido (Talati, 2017). Logo, tendo em vista a maior diversidade de substâncias presentes nos óleos essenciais extraídos por hidrodestilação em aparelho Clevenger no presente estudo, salienta-se o maior potencial de utilização deste método quando o objetivo for a composição qualitativa.

A obtenção de óleos essenciais com composição diversificada tem justificada a sua importância ao considerarmos as inúmeras aplicações que esses compostos podem ter, desde a indústria alimentícia, farmacêutica, cosmética e de perfumes até a de produtos de limpeza, aromaterapia, controle de pragas e inibição de patógenos (Palazzolo et al., 2013). De acordo com Rafiq et al. (2016) a casca de frutos de citros apresenta-se também como uma fonte promissora de compostos nutracêuticos de baixo custo para a indústria alimentícia, rica em fibras e polifenóis.

O maior rendimento proporcionado pelo método da escarificação, até cinco vezes superior ao laboratorial, justifica seu emprego em larga escala pela indústria, e o rendimento médio obtido (0,53%) corrobora o apontado por Frizzo et al. (2004) para a extração por este mesmo método a partir de frutos verdes de ‘Caí’ e ‘Montenegrina’ (*C. deliciosa*) (0,60%), cultivados na mesma região, sendo as avaliações realizadas por estes autores em um período mais amplo – de março a junho. Entretanto, salienta-se que a

recomendação técnica é de que o raleio manual em *C. deliciosa* cultivada no Rio Grande do Sul seja realizado entre os meses de janeiro e março, ou até os frutos atingirem no máximo 2,0 cm de diâmetro (Gonzatto et al., 2018). Neste estudo, as primeiras avaliações realizadas coincidiram com o início das atividades industriais, sendo que justamente na primeira metade de março obteve-se os maiores rendimentos de extração para ambos os métodos. Deste modo, o período que proporcionou o maior rendimento de óleo foi o mais próximo do recomendado para a realização do raleio, sendo possível, em concordância com as informações técnicas existentes, recomendar que as extrações de *C. deliciosa* a partir de frutos verdes, sejam realizadas neste momento.

### **Conclusões**

Com os resultados obtidos pode-se concluir que o método da hidrodestilação em aparelho Clevenger proporciona rendimento de extração de frutos verdes de tangerineiras até cinco vezes inferior ao método industrial da escarificação. Entretanto, apresenta maior diversidade em relação à quantidade de compostos, com a presença de N metil antranilato de metila e terpin-4-ol dentre os majoritários, compostos que não foram nem mesmo detectados na escarificação. O óleo essencial proveniente do método industrial demonstrou rendimento elevado e maior uniformidade quanto à composição, proporcionando uma menor diversidade de substâncias.

### **Agradecimentos**

À agroindústria de sucos e óleos essenciais da Cooperativa dos Citricultores Ecológicos do Vale do Caí – Ecocitrus pela parceria neste estudo, e CNPq pelo financiamento.

### **Referências**

ADAMS, R.P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry**, 4 ed. Allured publishing: Waco, Texas (USA), 2017.

- 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.
- CASSEL, E. et al. Steam distillation modeling for essential oil extraction process. **Industrial Crops and Products**, v. 29, p. 171-176, 2009.
- CORNÉLIO, A. R.; FERRUA, F. Q.; GUERREIRO, M. C. Influência de solventes orgânicos na adsorção de linalol e decanal em sílica gel. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 28, n. 4, p. 863-870, 2004.
- DEWICK, P. M. **Medicinal Nactural Products: A Biosyntethic Approach**. Third Ediction, 546p., 2009.
- ECOCITRUS, 2015. **Raleio: bergamota verde também é lucro**. Disponível em: <<http://www.ecocitrus.com.br/index.php/noticia/raleio-bergamota-verde-tambem-e-lucro-40>>. Acessado em: 09 de abr. 2020.
- FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Statistic Division**. 2018. Disponível em: <[faostat.fao.org](http://faostat.fao.org)>. Acesso em: 09 abr. 2020.
- FERRUA F. Q.; MARQUES M. O. M. & MEIRELES M. A. A. Óleo Essencial de Capim-Limão obtido por Extração com Dióxido de Carbono Líquido. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, n. 14, p. 83-92, 2001.
- FRIZZO, C. D.; LORENZO, D. & DELLACASSA, E. Composition and seasonal variation of the essential oils from two mandarin cultivars of southern Brazil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 10, p. 3036 – 3041, 2004.
- GONZATTO, M. P. Desempenho hortícola de tangerineiras e híbridos sobre diferentes porta-enxertos no Rio Grande do Sul. 2015. 185 p. **Tese** (Doutorado em Fitotecnia) – Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2015.
- GONZATTO, M. P. et al. Manejo da copa da planta cítrica. *In*: EFROM, C. F. S. (Org.) **Citricultura do Rio Grande do Sul: indicações técnicas**. Porto Alegre: Secretaria da Agricultura, Pecuária e Irrigação - SEAPI; DDPA, 113-119 (2018)
- GUENTHER, E. **The Essential Oils**. New York: Van Nostrand-Reinhold, v. 3, 1948.
- JOÃO, P. L.; CONTE, A. A citricultura no Rio Grande do Sul. *In*: EFROM, C. F. S. (Org.) **Citricultura do Rio Grande do Sul: indicações técnicas**. Porto Alegre: Secretaria da Agricultura, Pecuária e Irrigação - SEAPI; DDPA, 1-2 (2018).
- KÖLLER, O. C (coord.); **Citricultura, cultura de tangerineiras: tecnologia de produção, pós-colheita e industrialização**. Porto Alegre: Editora Rígel, 2009. 400p.
- LEAL, P. F. Estudo comparativo entre os custos de manufatura e as propriedades funcionais de óleos voláteis obtidos por extração supercrítica e destilação por arraste a vapor. 2008. 307p. **Tese** (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2008.
- NEVES, M.F.; TROMBINI, V.G. **Anuário da citricultura 2017**. CITRUSBR: São Paulo, 2017. 57 p.

- OLIVEIRA, S. M. M. de; JOSE, V. L. A. Processos de extração de óleos essenciais. 2007. **Dossiê Técnico** – Serviço Brasileiro de Respostas Técnicas, ITPR (Instituto Tecnológico do Paraná), 29p. Disponível em: <<http://www.respostatecnica.org.br/dossie-tecnico/downloadsDT/MTgy>>. Acessado em: 14 mar. 2020.
- OLIVEIRA, R. P. de. et al. Diferenciação das tangerineiras mais cultivadas no Rio Grande do Sul. **Documentos**, 453. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2018, 21p.
- PALAZZOLO, E. et al. Current and Potential Use of Citrus Essential Oils. **Current Organic Chemistry**, v. 17, n. 24, p. 3042-3049, 2013.
- PAULETTI, G. F. & SILVESTRE, W. P. Óleo Essencial Cítrico: produção, composição e fracionamento. Cap. 15, p. 245-268, 2018. In: EFROM, C. F. S. & SOUZA, P. V. D. De (Org.). **Citricultura do Rio Grande do Sul: indicações técnicas**. 1. Ed. Porto Alegre: Secretaria da Agricultura, Pecuária e Irrigação – SEAPI; DPPA, 2018. 289p.
- RAFIQ, S. et al. Citrus peel as a source of functional ingredient: A review. **Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences**, v. 17, n. 4, p. 351-358, 2018.
- RODRIGUES, L. R. et al. **Raleio manual de frutos em tangerineiras ‘Montenegrina’**. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/45103/1/RALEIO-MANUAL-DE-FRUTOS-EM-TANGERINEIRAS.pdf>>. Acessado em: 15 mar. 2020.
- SERAFINI, L. A. et al. **Extrações e aplicações de óleos essenciais de plantas aromáticas e medicinais**. Caxias do Sul: EDUCS, 2002.
- SILVEIRA, J. C. et al. Levantamento e análise de métodos de extração de óleos essenciais. **Enciclopédia Biosfera**, Goiânia, v. 8, n. 15, p. 2052, 2012.
- SILVESTRE, W. P. et al. Fractionating of green mandarin (*Citrus deliciosa* Tenore) essential oil by vacuum fractional distillation. **Journal of Food Engineering**, v. 178, p. 90-94, 2016.
- SIMAS, D. L. R. et al. Caracterização dos óleos essenciais de frutas cítricas. **Citrus Research & Technology**, Cordeirópolis, v. 36, n. 1, p. 15-26, 2015.
- TALATI, A. **Extraction Methods of Natural Essential Oils**. Disponível em: <[https://www.researchgate.net/publication/313638030\\_EXTRACTION\\_METHODS\\_OF\\_NATURAL\\_ESSENTIAL\\_OILS](https://www.researchgate.net/publication/313638030_EXTRACTION_METHODS_OF_NATURAL_ESSENTIAL_OILS)>. Acessado em: 09 abr. 2020.
- TEIXEIRA, J. P. F.; MARQUES, M. O. M. & PIO, R. M. Caracterização dos óleos essenciais em frutos de nove genótipos de tangerina. **Citrus Research & Technology**, v. 35, n. 1, p. 1-10, 2014.

## **5 ARTIGO 3**

**Composição do óleo essencial de folhas de tangerineiras e tangores obtido por arraste a vapor e hidrodestilação\***

\* Artigo formatado nas normas da revista Journal of Essential Oil Research

**Resumo:** O Brasil situa-se como o segundo maior produtor mundial de citros, sendo a extração de óleos essenciais (OEs) um subproduto de grande importância econômica desta cadeia agrícola. Apesar do interesse comercial nas substâncias presentes no OE de folhas de citros, há carência de informações a respeito da sua composição nas diferentes cultivares, assim como por diferentes métodos de extração. Desta forma, o objetivo deste estudo foi caracterizar a composição química do OE de folhas de tangerineiras e tangores obtido por arraste a vapor e por hidrodestilação. Para tanto, em propriedade situada em Pareci Novo (RS), realizou-se coleta de folhas de sete cultivares de citros na época de realização da poda. Estas foram submetidas à hidrodestilação e arraste a vapor durante quatro horas e o OE obtido foi analisado através de CG-EM e CG-FID. Em geral, as tangerineiras ‘Caí’, ‘Montenegrina’, ‘Pareci’ e ‘Rainha’ apresentaram rendimentos superiores à tangerineira ‘Ponkan’ e os tangoreiros ‘URSBRS Hada’ e ‘Murcott’ (0,46-0,60% v/m) em ambos os métodos. No total identificou-se 15 diferentes substâncias que representaram de 94,25 a 99,84% m/m do OE. As tangerineiras ‘Caí’, ‘Montenegrina’, ‘Pareci’ e ‘Rainha’ apresentaram altos teores de N metil antranilato de metila (78,74-95,53% m/m) e de  $\gamma$ -terpineno (4,09-15,76% m/m). Já no OE de ‘Ponkan’, ‘URSBRS Hada’ e ‘Murcott’, tiveram predomínio de linalol (51,93-82,86% m/m) e terpin-4-ol (5,71-31,12% m/m). O método de extração influenciou, principalmente, os teores dos compostos, enquanto que os fatores genéticos determinaram as variações na composição do óleo essencial de folhas de citros.

**Palavras-chave:** *Citrus deliciosa*, *C. reticulata*, *petitgrain*, rendimento, terpenos, linalol, N metil antranilato de metila

## Introdução

O Brasil destaca-se como o segundo maior produtor mundial de citros (19,7 milhões de toneladas), sendo precedido apenas pela China (29 milhões t) (FAO, 2020). No que diz respeito à produção de laranjas, o país mantém a liderança mundial com uma produção superior a 16,7 milhões de toneladas em 2018 (IBGE, 2020). Os estados de São Paulo e Minas Gerais respondem sozinhos por cerca de 82% da produção nacional de laranjas (IBGE, 2020). Entretanto, o Estado do Rio Grande do Sul destaca-se quanto à produção de tangerinas, sendo o terceiro maior produtor da fruta no Brasil (144 mil t) (IBGE, 2020).

O setor de extração de óleos essenciais (OEs) tem adquirido destaque na citricultura, estando o Brasil entre os principais fornecedores do produto no mercado mundial (Bizzo et al., 2009; Zulian et al., 2013). Os OEs de citros são amplamente utilizados nas indústrias de alimentos e bebidas, cosmética, farmacêutica e química, incluindo química fina (Dugo et al., 2012). Dentre as composições (*blends*), mais comercializados mundialmente para perfumaria estão os óleos essenciais obtidos a partir dos frutos de bergamoto, limão, mandarina, tangerina e laranja (Bizzo, 2009).

Compostos aromáticos também ocorrem nas flores e folhas de plantas cítricas, sendo que o óleo essencial obtido destas partes recebe a denominação de *petitgrain* ('pequeno grão' em francês), assim chamado devido a este tipo de óleo ser extraído originalmente das folhas e botões florais da laranjeira azeda (*Citrus aurantium*). Contudo, hoje o termo *petitgrain* é utilizado para óleo essencial extraído de folhas de qualquer espécie de *Citrus* (Pauletti & Silvestre, 2018). O *petitgrain* tem se mostrado um importante produto comercial para o Brasil, sendo que, somente em 2017, foram exportadas 23 t deste óleo essencial para o Reino Unido, França e Alemanha, correspondendo ao valor de US\$ 203 mil (US\$ 8,82 por kg) (ALICEWEB, 2020). Em

2019, o Brasil exportou um total superior a 56 mil toneladas de óleos essenciais a partir de plantas cítricas (incluindo-se *petitgrain*), movimentando cerca de US\$ 301 milhões (US\$ 5,38 por kg) (AGROSTAT, 2020).

Podem ser utilizados distintos métodos para a extração dos OEs. Entretanto, dependendo do método empregado, a composição final do óleo extraído pode variar consideravelmente (Cassel et al., 2009). A hidrodestilação é o método mais antigo de extração, dito artesanal, contudo, bastante empregado em escala laboratorial (Silveira et al., 2012). Mostra-se extremamente versátil, podendo ser utilizado para a extração de OE de diferentes tipos de estruturas vegetais: flores, frutos, folhas, rizomas, raízes, sementes, cascas, castanhas e galhos (Leal, 2008). Contudo, devido às reações de hidrólise, nas quais a água reage com ésteres, formando álcoois e ácidos carboxílicos, pode ocorrer alterações importantes na composição do óleo essencial obtido, o que pode acarretar em redução da qualidade e valor dos óleos essenciais extraídos por esse método (Leal, 2008). Já o arraste a vapor é o método mais empregado industrialmente a nível nacional e mundial, tratando-se de um processo em que os voláteis são arrastados do material vegetal pelo vapor de água saturado seco, sendo que a mistura de óleo condensado e água (hidrolato) separa-se em camadas pela diferença de densidade e pela imiscibilidade entre as duas fases (Koketsu & Gonçalves, 1991; Leal, 2008).

Tendo em vista a escassez de informações acerca da composição do OE contido nas folhas de diferentes cultivares de citros, este estudo teve como objetivo caracterizar a composição do óleo essencial de folhas de algumas cultivares de tangerineiras e tangores, bem como avaliar o rendimento de extração e identificar diferenças na composição dos óleos em função do método de extração (arraste a vapor ou hidrodestilação).

## **Material & Métodos**

### ***Obtenção do material vegetal***

O local amostral encontra-se a 29°37'17.1" S e 51°25'41.7" O, tratando-se de propriedade citrícola situada no município de Pareci Novo (RS), cujo solo é classificado como Argissolo Vermelho-Amarelo (EMBRAPA, 2006), e o clima é do tipo subtropical úmido (Cfa: úmido com verões quentes), com temperatura média de 18,9°C e precipitação média anual de 1468 mm (IRGA, 2020).

Na data de três de dezembro de 2018 foram coletados ramos de quatro cultivares da tangerineira *C. deliciosa*: 'Caí', 'Montenegrina', 'Pareci' e 'Rainha', de *C. reticulata* ('Ponkan'), e de dois tangoreiros: 'Murcott' (*C. reticulata* x *C. sinensis*) e 'URSBRS Hada' (*C. unshiu* x *C. sinensis*). A data da coleta foi definida de acordo com a época em que os citricultores realizam a poda, visando aproveitar as folhas que são retiradas durante esta prática de manejo para a extração de OE. Todas as plantas encontravam-se enxertadas sobre o mesmo porta-enxerto (*Poncirus trifoliata*), receberam a mesma nutrição e manejo e encontravam-se submetidas às mesmas condições edafoclimáticas.

Foram coletadas folhas de cinco plantas por cultivar, a partir dos quatro quadrantes das plantas. Os galhos cortados durante a coleta foram levados ao laboratório, onde as folhas foram destacadas dos ramos e acondicionadas em refrigerador (-5 °C) até o momento da realização da extração, que não excedeu 30 dias após a coleta.

### ***Extração dos óleos essenciais***

Amostras de 300g de folhas (massa fresca) de cada cultivar foram submetidas aos procedimentos de hidrodestilação em aparelho do tipo Clevenger modificado e ao arraste a vapor durante quatro horas, em temperatura de aproximadamente 100 °C. As folhas foram previamente rasgadas durante a preparação das amostras, sendo empregadas

três repetições para cada cultivar, bem como para cada método de extração. Foi realizada a medição da quantidade de OE extraída através da coluna do aparelho para cálculo posterior do rendimento, sendo este armazenado em frasco âmbar e em congelador até ser encaminhado para análise cromatográfica.

### *Análises cromatográficas*

As análises dos OEs foram realizadas no Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), sendo a análise qualitativa da composição realizada em cromatógrafo a gás acoplado ao espectrômetro de massas (CG-EM, QP 5000 – Shimadzu) dotado de coluna capilar OV-5 MS (30 m x 0,25 mm x 0,25  $\mu$ m) e hélio (99,9999% de pureza) como gás de arraste (vazão: 1 mL/min). O sistema foi operado no modo full scan, com impacto de elétrons (70 eV), e faixa de 40 a 450 m/z. O injetor mantido a 220 °C, com divisão de vazão do gás de arraste (split) na razão de 1:20, seguindo a programação da temperatura de 60-240 °C, a uma taxa de aquecimento de 3 °C/min. A temperatura da interface foi mantida em 240 °C. As amostras de OE foram diluídas em acetato de etila (1 mg/mL) e injetado 1  $\mu$ L de solução.

A análise quantitativa dos OEs foi conduzida em cromatógrafo a gás com detector de ionização de chama (CG-DIC, Shimadzu, CG-2010/AOC-20i), dotado de coluna capilar de sílica fundida OV-5 (30 m x 0.25 mm x 0.25  $\mu$ m, Ohio Valle Specialty Chemica), hélio como gás de arraste (vazão de 1,0 mL/min), injetor a 280 °C, detector a 300 °C, split 1:20 e o mesmo programa de temperatura do sistema CG-EM.

A identificação dos constituintes químicos foi efetuada por meio da análise comparativa dos espectros de massas das substâncias com a biblioteca Nist 62.lib e os índices de retenção de literatura das substâncias (Adams, 2007). Os índices de retenção calculados foram obtidos a partir da injeção da mistura de n-alcenos (C9-C24, Sigma

USA) nas mesmas condições cromatográficas das amostras, aplicando-se a equação de Van den Dool e Kratz (1963).

### ***Análise estatística e interpretação dos dados***

O delineamento empregado foi inteiramente casualizado, fatorial 2x7 (dois métodos de extração x sete cultivares). O rendimento, expresso em porcentagem (%), foi calculado através da fórmula:  $ROE (\%) = MOE (g) * 100 / MF(g)$ , onde MOE= massa de óleo essencial extraída (g), MF= quantidade de folhas utilizadas na extração (g).

Os dados obtidos, tanto de rendimento quanto de composição, foram analisados estatisticamente empregando-se o programa R, de domínio público. O rendimento de extração foi avaliado utilizando-se análise de variância e o teste de Tukey-Kramer (considerando-se 5% de significância). A composição química foi avaliada através de análise de compostos principais (PCA) e de agrupamento hierárquico utilizando distância euclidiana, buscando realizar a separação dos óleos essenciais em função da similaridade química.

### **Resultados e Discussão**

As cultivares Montenegrina e Pareci apresentaram rendimento de extração de OEs significativamente superior pelo método de arraste a vapor, enquanto que a ‘Ponkan’ apresentou maior rendimento pelo método de hidrodestilação (Tabela 1). Conforme Silveira *et al.* (2012), o arraste a vapor apresenta menor custo energético e maior qualidade do OE produzido, já que as reações de hidrólise e polimerização são reduzidas por não haver contato direto do material vegetal com a água.

**Tabela 1.** Rendimento médio de extração (% m/m) de *petitgrain* pelos métodos de arraste a vapor (A) e hidrodestilação (H) nas sete cultivares de citros avaliadas. Porto Alegre (RS), 2019.

Método	Cultivares						
	'URSBRS Hada'	'Murcott'	'Caí'	'Montenegrina'	'Pareci'	'Rainha'	'Ponkan'
A	0,30 aB	0,23 aB	0,53 aA	0,60 aA	0,60 aA	0,54 aA	0,22 bB
H	0,28 aC	0,26 aC	0,57 aA	0,46 bAB	0,46 bAB	0,49 aA	0,34 aBC

\* Médias seguidas por letras minúsculas iguais, na coluna, e letras maiúsculas iguais, na linha, não diferem significativamente pelo teste de Tukey-Kramer ( $P < 0,05$ ).

Em geral, as cultivares de *C. deliciosa* apresentaram rendimentos, em ambos os métodos, significativamente superiores à 'Ponkan' e aos tangoreiros 'URSBRS Hada' e 'Murcott' variando de 0,46 a 0,60% (Tabela 1). Nos trabalhos desenvolvidos por Lota *et al.* (2000; 2001) o rendimento de *petitgrain* de diversos genótipos de citros, extraído através da hidrodestilação de folhas frescas, assim como no presente estudo, variou de 0,05 a 0,60%, sendo que tamanha variação pode ser explicada pela maior diversidade de genótipos avaliados por estes autores.

Avaliando acessos de *C. deliciosa* enxertados sobre diferentes porta-enxertos, Almeida (2013) obteve rendimentos por hidrodestilação de OE de folhas, variando de 0,15 até 1,48%. Contudo, cabe salientar que os porta-enxertos empregados por Almeida (2013) apresentam maior vigor em relação à *P. trifoliata*, já sendo conhecida a influência dos porta-enxertos nos atributos de crescimento e desenvolvimento da copa das plantas (Castle, 1987; 2010) e relações hídricas (Rodríguez-Gamir *et al.*, 2010), que podem influenciar também nos rendimentos de OE.

De acordo com Sharma & Vashist (2015), a casca dos frutos de citros fornece maior quantidade de OE em comparação às folhas, sendo que em folhas de *C. reticulata*

estes autores obtiveram 0,25% de rendimento por hidrodestilação. No presente estudo, obteve-se rendimento semelhante (0,22%) para ‘Ponkan’ (*C. reticulata*) empregando-se o mesmo método, mas superior quando se utilizou o arraste a vapor (0,34%).

Na análise da composição dos OEs foram identificadas 15 substâncias; estas representaram de 94,25 a 99,84% m/m da composição total (Tabelas 2 e 3). As amostras de *C. deliciosa* apresentaram altos teores de N-metil-antranilato de metila (78,74 a 95,53% m/m) e de  $\gamma$ -terpineno (4,09 a 15,76% m/m) (Tabela 2). As amostras de *C. reticulata* e tangores foram caracterizadas pelo predomínio de linalol (51,93 a 82,86% m/m) e de terpin-4-ol (5,71 a 31,12% m/m) (Tabela 3).

Almeida (2013), avaliando o OE extraído por hidrodestilação das folhas de acessos de *C. deliciosa* enxertados sobre diferentes porta-enxertos em área experimental na Bahia, determinou que os compostos que se destacaram na sua composição foram o limoneno, o linalol, o sabineno, o  $\gamma$ -terpineno e o antranilato de dimetila (N metil antranilato de metila). Ainda conforme Almeida (2013), os teores de N metil antranilato de metila variaram de 61,5 a 84,6% m/m e de  $\gamma$ -terpineno de 6,1 a 19,6% m/m. No presente estudo, se destacaram quanto à concentração os compostos N metil antranilato de metila e  $\gamma$ -terpineno, que juntos representaram de 84 a 98% m/m da composição total do *petitgrain* das cultivares de *C. deliciosa*.

Silvestre *et al.* (no prelo), também avaliando OE de folhas, extraído por hidrodestilação, de *C. deliciosa* (‘Montenegrina’ e ‘Caí’) sobre diferentes porta-enxertos realizado em São Sebastião do Caí (RS), obtiveram 59 a 66% m/m de N metil antranilato de metila e 17 a 23% m/m de  $\gamma$ -terpineno, valores próximos aos obtidos neste estudo.

**Tabela 2.** Composição química (% m/m) dos óleos essenciais das folhas (*petitgrain*) de cultivares de *C. deliciosa*, extraídos pelos métodos de arraste a vapor e hidrodestilação, Porto Alegre, 2019.

Substância	IR <sub>Calc</sub> <sup>1</sup>	IR <sub>Lit</sub> <sup>2</sup>	Arraste a vapor				Hidrodestilação			
			‘Caí’	‘Montenegrina’	‘Pareci’	‘Rainha’	‘Caí’	‘Montenegrina’	‘Pareci’	‘Rainha’
$\alpha$ -pineno	932	932	-	-	0,26	-	-	-	-	-
sabineno	971	969	0,59	0,82	0,43	-	-	0,41	0,37	-
$\beta$ -pineno	976	974	0,36	0,32	1,16	0,56	-	0,28	0,32	0,17
mirceno	989	988	-	-	-	-	-	-	0,24	0,15
p-cimeno	1022	1020	0,35	0,54	1,11	2,94	1,97	1,09	1,65	1,75
limoneno	1027	1024	0,53	0,87	1,68	3,13	4,89	1,44	3,51	4,14
( <i>E</i> )- $\beta$ -ocimeno	1045	1044	-	-	0,39	-	-	-	0,27	0,28
$\gamma$ -terpineno	1057	1054	1,71	4,09	6,33	15,58	15,76	7,85	10,56	14,61
terpinoleno	1087	1086	-	0,40	0,13	0,89	0,66	0,35	0,66	0,88
N metil antranilato de metila	1405	1405	95,53	91,20	87,57	75,44	82,28	83,94	82,68	78,74
( <i>E</i> )-cariofileno	1418	1417	0,76	1,61	0,93	1,56	0,29	0,45	0,25	0,37
Total identificado			99,69	99,23	99,41	99,84	99,65	99,30	99,27	99,27

‘-’ não detectado; <sup>1</sup>Índice de Retenção Linear calculado; <sup>2</sup>Índice de Retenção utilizado como referência (Adams, 2017)

**Tabela 3.** Composição química (% m/m) dos óleos essenciais das folhas (*petitgrain*) de *C. reticulata* e tangores, extraídos pelos métodos de arraste a vapor e hidrodestilação, Porto Alegre, 2019.

Substância	IR <sub>Calc</sub> <sup>1</sup>	IR <sub>Lit</sub> <sup>2</sup>	Arraste a vapor			Hidrodestilação		
			‘URSBRS Hada’	‘Murcott’	‘Ponkan’	‘URSBRS Hada’	‘Murcott’	‘Ponkan’
$\alpha$ -pineno	932	932	-	-	0,73	-	-	-
sabineno	971	969	6,32	7,24	-	4,06	2,63	1,52
$\beta$ -pineno	976	974	0,50	-	-	0,55	-	-
mirceno	989	988	-	0,75	-	0,71	-	0,41
p-cimeno	1022	1020	-	-	0,14	0,55	-	-
limoneno	1027	1024	0,99	1,07	0,39	0,97	1,17	1,09
( <i>E</i> )- $\beta$ -ocimeno	1045	1044	1,87	1,73	2,27	2,38	2,51	2,39
$\gamma$ -terpineno	1057	1054	2,19	1,14	4,03	2,06	2,89	2,86
terpinoleno	1087	1086	0,82	-	0,39	0,78	-	0,84
linalol	1099	1095	64,37	68,08	82,86	51,93	53,82	66,25
terpin-4-ol	1175	1174	15,08	14,07	5,71	29,41	31,12	18,96
$\alpha$ -terpineol	1188	1186	1,54	0,82	1,03	1,86	1,55	0,98
timol metil éter	1232	1232	-	-	1,95	-	-	2,35
Total identificado			99,34	94,52	94,25	98,29	96,85	98,79

<sup>1</sup>- não detectado; <sup>1</sup>Índice de Retenção Linear calculado; <sup>2</sup>Índice de Retenção utilizado como referência (Adams, 2017).

Verificou-se que os OEs de 'Ponkan', 'URSBRS Hada' e 'Murcott' apresentaram elevados teores de linalol e terpin-4-ol. Na cultivar USBRS Hada o teor de linalol variou de 51,93% m/m (hidrodestilação) a 64,37% m/m (arraste a vapor), o teor de terpin-4-ol variou de 15,08% m/m (arraste a vapor) a 29,41% m/m (hidrodestilação). Para 'Murcott' o teor de linalol variou de 53,82% m/m (hidrodestilação) a 68,08% m/m (arraste a vapor), enquanto que o teor de terpin-4-ol variou de 14,07% m/m (arraste a vapor) a 31,12% m/m (hidrodestilação). Os mais altos teores de linalol foram obtidos em (66,25% m/m – hidrodestilação; 82,86% m/m - arraste a vapor) por ambos os métodos, bem como os menores teores de terpin-4-ol (5,71% m/m - arraste a vapor; 18,96% m/m - hidrodestilação), também verificados em ambos os métodos de extração. Cabe salientar que os teores obtidos neste estudo diferiram em relação aos observados por Silvestre *et al.* (no prelo) cujas avaliações envolveram a tangerineira 'Ponkan' e o tangoreiro 'Murcott', tendo os autores verificado teores de apenas 18,65 a 28,61% m/m de linalol e 4,18 a 5,75% m/m de terpin-4-ol, empregando o método de hidrodestilação.

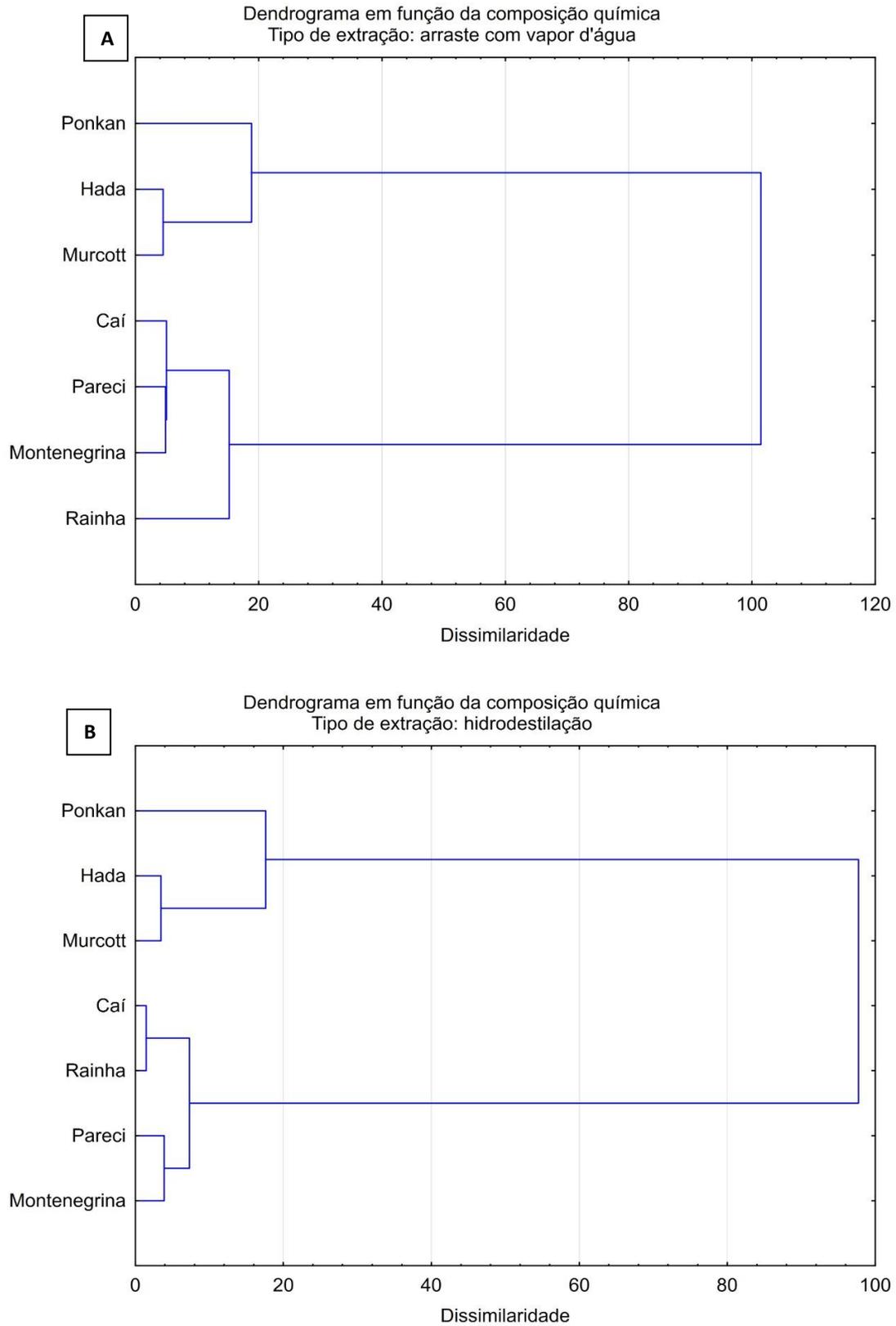
Em relação à influência do método de extração utilizado sobre a composição do OE obtido, pode-se afirmar que o tipo de método promoveu, principalmente, alterações de caráter quantitativo - relacionadas aos teores de cada substância, em vez de qualitativas - relacionadas às substâncias identificadas em cada um dos tratamentos (cultivar x método de extração). Portanto, o padrão de substâncias identificadas nos OEs de cada cultivar mostrou-se bastante similar, independentemente do método de extração empregado, seja ele arraste a vapor ou hidrodestilação.

A influência genética mostrou-se determinante na composição do OE e, conseqüentemente, no agrupamento das cultivares e espécies. A partir dos dendrogramas gerados (Figura 1A e B) é possível observar em ambos uma clara separação entre dois

grupos em função da composição dos OEs: um composto pelas cultivares de *C. deliciosa* e outro constituído por *C. reticulata* e os tangores, ambos híbridos de *C. sinensis*.

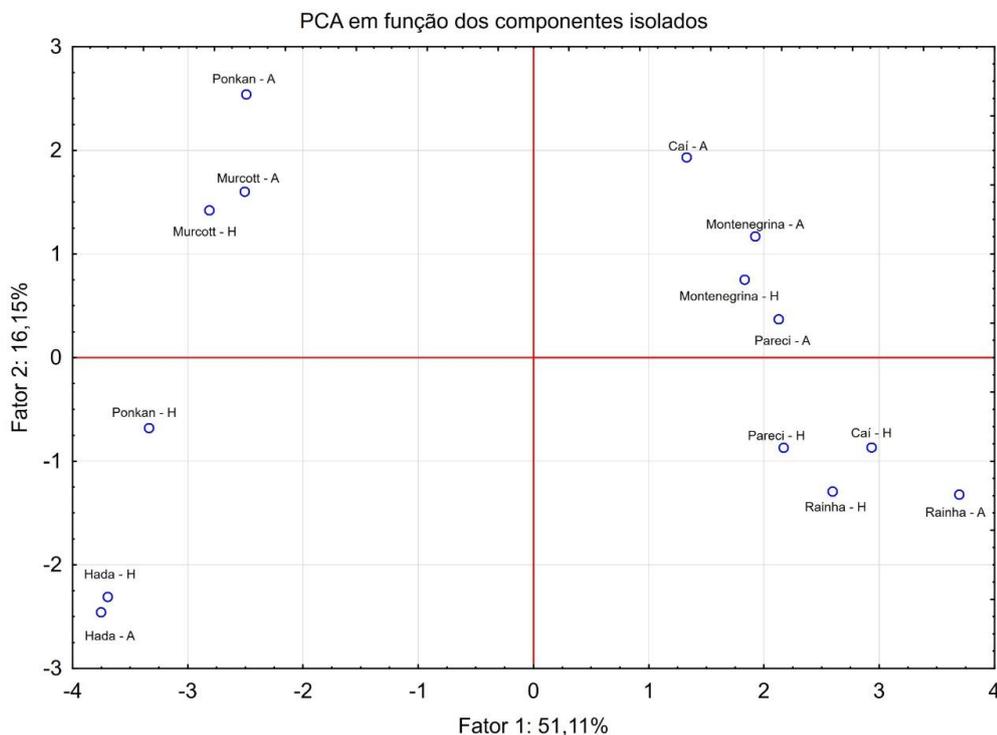
Foram elaborados dendrogramas específicos para cada método de extração, pois o método empregado promoveu alterações nos teores dos compostos identificados, influenciando o agrupamento das cultivares de *C. deliciosa*. No arraste a vapor verificou-se maior proximidade entre as cultivares ‘Caí’, ‘Pareci’ e ‘Montenegrina’ (Figura 1A). Cabe salientar que ‘Pareci’ e ‘Montegrina’ são mutações naturais de ‘Caí’, e ‘Rainha’, que por sua vez trata-se de uma mutação da cultivar Montenegrina, justificando assim sua maior dissimilaridade em relação às demais. No dendrograma referente ao processo de hidrodestilação (Figura 1B), verificou-se dissimilaridades ainda menores entre o grupo formado pelas cultivares de *C. deliciosa*.

Em estudo avaliando o OE dos frutos de genótipos de tangerineiras, Teixeira *et al.* (2014), observou o agrupamento das cultivares em quatro clusters do dendrograma: Israel, Do Rio e Umbigo; Avana, Pernambucana, Paraguaia e Céu; Tardia da Sicília; todas da espécie *C. deliciosa* e, separadamente, a tangerineira Vermelha (*C. reticulata*). Segundo os autores, características especiais no OE de Tardia da Sicília, como teores superiores de limoneno e reduzidos de  $\gamma$ -terpineno, foram responsáveis pelo seu isolamento em relação às demais, sendo que os autores consideraram ser necessário o aprofundamento do conhecimento sobre esses genótipos.



**Figura 1.** Dendrograma dos óleos essenciais das folhas (*petitgrain*) de sete cultivares do gênero *Citrus*, extraído através de arraste a vapor (A) e hidrodestilação (B). Agrupamento em função da composição química utilizando distância Euclidiana. Porto Alegre, 2019.

A análise de componentes principais (PCA) em função da composição química (Figura 2, que explica 67,26% da variância total verificada nas amostras) indica a separação das amostras em duas formas principais: os tangores e 'Ponkan' distribuídos nos quadrantes da esquerda, e as cultivares de *C. deliciosa* nos quadrantes da direita, confirmando o que foi observado nos dendrogramas (Figuras 1A e 1B) com a formação de dois grandes grupos. Também é possível identificar a divisão das amostras em quatro grupos, um grupo em cada quadrante. No quadrante superior esquerdo da Figura 2, as amostras de OEs das folhas de 'Ponkan' e 'Murcott' obtidas por arraste a vapor e 'Murcott' por hidrodestilação se agruparam. Estas amostras apresentaram em comum os teores similares de linalol e terpinen-4-ol.



**Figura 2.** Análise de componentes principais (PCA) agrupando o óleo essencial das folhas (*petitgrain*) de sete cultivares de citros, avaliadas em função da composição química. Porto Alegre, 2019.

Referente ao quadrante inferior esquerdo da Figura 2 pode-se observar que as amostras de 'URSBR Hada', obtidas por ambos os métodos, agruparam-se, indicando que o tipo de extração exerce pouca influência sobre o OE das folhas desta cultivar.

Ainda neste quadrante, é possível verificar a amostra de ‘Ponkan’ obtida pelo método de hidrodestilação, isolada. De acordo com a Tabela 3, pode-se verificar que as principais diferenças entre o OE das folhas de ‘Ponkan’ obtido por hidrodestilação em relação ao obtido por arraste a vapor é o maior teor de terpinen-4-ol, a presença de sabineno e mirceno, e a ausência de p-cimeno.

Fanciullino et al. (2006) relatam variabilidade química intraespecífica para os OEs extraídos por hidrodestilação em Clevenger a partir de folhas de diferentes cultivares de *C. reticulata*, sendo a separação dos OE em grupos, através de análise de componentes principais, realizada em função da presença preponderante de linalol, sabineno/linalol e  $\beta$ -pineno/linalol. Ainda conforme Fanciullino et al. (2006), os resultados obtidos permitem uma classificação das tangerinas não apenas pelo DNA, mas pelo perfil do OE.

Já Santos (2013), através do mesmo método de análise, verificou agrupamentos em diferentes quadrantes de genótipos de *C. reticulata* e híbridos de *C. reticulata* x *C. sinensis* devido aos teores de linalol/sabineno e linalol/terpin-4-ol no OE das folhas submetidas à hidrodestilação. Os constituintes em maior concentração no estudo de Santos (2013) foram o linalol e o sabineno, enquanto no presente estudo, o linalol e o terpin-4-ol, sendo o sabineno o terceiro composto em importância.

Quanto ao quadrante superior direito da Figura 2 observa-se as amostras da cultivar Montenegrina com os dois métodos de extração agrupados, indicando pouca variação do OE em função do tipo de extração. Neste mesmo grupo estão mais dispersas as amostras das cultivares Caí e Pareci, ambas obtidas por arraste a vapor. Como similaridades, entre estes quatro OEs pode-se citar os teores semelhantes e mais elevados de N-metil-antranilato de metila, os teores mais baixos de  $\gamma$ -terpineno e limoneno, e mais altos de (E)-cariofileno.

No quadrante inferior direito (Figura 2) situam-se, também de forma dispersa, as amostras da cultivar Rainha obtidas por ambos os métodos, e as amostras de ‘Caí’ e ‘Pareci’ obtidas por hidrodestilação. Como principais similaridades entre os OEs, estão o menor teor de N-metil-antranilato de metila, e os maiores teores de  $\gamma$ -terpineno, terpinoleno e limoneno.

Através da análise de compostos principais, Almeida (2013) verificou a formação de um único grupo para o OE de folhas de cultivares de *C. deliciosa*, extraído através da hidrodestilação, sendo que em seu estudo o agrupamento se deu, principalmente, em função dos teores de N-metil antranilato de metila. Ainda de acordo com Almeida (2013), as discretas variações observadas no agrupamento podem ser atribuídas às variações genotípicas entre as cultivares de *C. deliciosa*.

Em estudo de Hosni et al. (2010), extrações através de hidrodestilação do OE de frutos de diferentes genótipos de citros: *C. aurantium*, *C. reticulata* e *C. grandis*, sobre as mesmas condições de cultivo, coleta e processamento, evidenciaram que diferenças na composição do OE estão intimamente ligadas à expressão do genótipo. Sendo que estes autores apontam que os diferentes padrões de OE proporcionados pelas diferentes espécies e cultivares avaliadas podem ser úteis, inclusive, para a identificação da origem botânica do OE, bem como para diferentes aplicações nas indústrias alimentícia, farmacêutica e cosmética (Hosni et al., 2010).

A dificuldade de obtenção do *petitgrain* e a sua composição (com teores mais elevados de compostos como o N-metil-antranilato de metila e o linalol) o tornam interessante para usos industriais e pelo seu valor agregado, contribuindo para a sua valorização comercial (Dugo & Mondello, 2010; Perini et al., 2017). O linalol natural é amplamente empregado na composição de produtos finos e perfumes (Budavari et al., 1996). Enquanto o N-metil-antranilato de metila é utilizado como aromatizante natural de

alimentos, perfumes e cosméticos (Santos, 2013), apresentando importância crescente na formulação de produtos ecologicamente corretos e com apelo sustentável.

Os resultados obtidos indicam um grande potencial de exploração do OE de folhas de citros, destacando-se as cultivares de *C. deliciosa* que podem ser empregadas objetivando-se a obtenção de elevados teores de N metil antranilato de metila e  $\gamma$ -terpineno, e *C. reticulata* e tangores para obtenção de elevados teores de linalol e terpin-4-ol relevantes para a indústria, principalmente após o fracionamento do OE e separação das substâncias de interesse.

### **Conclusões**

O método de extração utilizado influenciou, principalmente, os teores das substâncias extraídas (composição quantitativa), enquanto que os fatores genéticos determinaram as variações na composição qualitativa do óleo essencial das folhas de citros. Foram observadas variações interespecíficas no agrupamento das cultivares atribuídos aos diferentes métodos de extração.

### **Agradecimentos**

Ao CNPq e Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul pela concessão da bolsa de doutorado, ao IAC pelas análises cromatográficas dos óleos essenciais e ao colega Gerson Nestor Böettcher pela concessão da área experimental e colaboração nas coletas.

### **Referências**

AGROSTAT – Estatísticas de Comércio Exterior do Agronegócio Brasileiro.

**Exportação**, 2019. Disponível em:

<[www.indicadores.agricultura.gov.br/agrostat/index.htm](http://www.indicadores.agricultura.gov.br/agrostat/index.htm)>. Acesso em: 24 de fev. 2020.

ALICEWEB - Sistema de Análise das Informações de Comércio Exterior.  
**Desenvolvimento.** Disponível em: <<http://aliceweb2.mdic.gov.br/consulta-ncm/index/type/exportacaoNcm>> Acesso em 11 jan. 2020.

ALMEIDA, L. A. DA H. **Caracterização química de óleos essenciais em folhas de laranjeira azeda e mexeriqueira.** 2013. 67p. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós Graduação em Recursos Genéticos Vegetais da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia e Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, 2013.

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.

BUDAVARI, S. et al. **The Merck index:** an encyclopedia of chemical, drugs, and biologicals. 12 ed. Whitehouse Station: Merck, 1996. 1741 p.

CASSEL, E.; VARGAS, R. M. F., MARTINEZ, N.; LORENZO, D.; DELLACASSA, E. Steam distillation modeling for essential oil extraction process. **Industrial Crops and Products**, v. 29, p. 171-176, 2009.

CASTLE, W.S. Citrus rootstocks. In: ROM, R.C.; CARLSON, R.F. (Ed.). **Rootstocks for fruits crops.** New York: John Wiley and Sons, 1987. p.361-399.

CASTLE, W.S. A Career Perspective on Citrus Rootstocks, Their Development, and Commercialization. **Hortscience**, v. 45, p. 11-15, 2010.

DUGO, G. & MONDELLO, L.. **Citrus Oils:** Composition, Advanced Analytical Techniques, Contaminants, and Biological Activity, 1st ed., 2010.

DUGO, G. et al. Analytical characterization of mandarin (*Citrus deliciosa* Ten.) essential oil. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 26, n. 1, 34-46, 2012.

EMBRAPA. **Sistema Brasileiro de Classificação de Solos.** 2 ed. Rio de Janeiro: Embrapa Solos, 2006, 306 p.

FANCIULLINO, A. L. et al. Chemical variability of peel and leaf oils of mandarins. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 21, p. 359-367, 2006.

FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Statistic Division.** 2020. Disponível em: <[faostat.fao.org](http://faostat.fao.org)>. Acesso em: 10 jan. 2020.

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

IBGE. Sistema IBGE de Recuperação Automática – SIDRA: **Produção Agrícola 2018.** Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/home/ipca/brasil>>. Acesso em: 10 jan. 2020.

IRGA. **Médias Climatológicas:** Pareci Novo. Disponível em: <<https://irga.rs.gov.br/medias-climatologicas>>. Acessado em: 10 de abril de 2020.

KOKETSU, M. & GONÇALVES, S. L. Óleos essenciais e sua extração por arraste a vapor. Rio de Janeiro: EMBRAPA – CTAA, 1991. 24p. **Documentos**, 8.

LEAL, P. F. **Estudo comparativo entre os custos de manufatura e as propriedades funcionais de óleos voláteis obtidos por extração supercrítica e destilação por arraste a vapor**. 2008. 307p. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2008.

LOTA, M-L; DE ROCCA SERRA, D.; TOMI, F; CASANOVA, J. Chemical variability of peel and leaf essential oil of mandarins from *Citrus reticulata* Blanco. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 28, p. 61-78, 2000.

LOTA, M-L; SERRA, D. de R; TOMI, F; CASANOVA, J. Chemical variability of peel and leaf essential oils of 15 species of mandarins. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 29, p. 77-104, 2001.

PAULETTI, G. F. & SILVESTRE, W. P. Óleo Essencial Cítrico: produção, composição e fracionamento. Cap. 15, p. 245-268, 2018. In: EFROM, C. F. S. & SOUZA, P. V. D. De (Org.). **Citricultura do Rio Grande do Sul: indicações técnicas**. 1. Ed. Porto Alegre: Secretaria da Agricultura, Pecuária e Irrigação – SEAPI; DPPA, 2018. 289p.

PERINI, J.F. *et al.* Fractioning of orange (*Citrus sinensis* L.) essential oil using vacuum fractional distillation. **Separation Science & Technology**, 52, 1397–1403, 2017.

RODRÍGUEZ-GAMIR, J. *et al.* Citrus rootstock responses to water stress. **Scientia Horticulturae**, v.126, p. 95-102, 2010.

SANTOS, J. Z. dos. **Caracterização química de óleos essenciais de folhas de tangerineiras e híbridos**. 2013. 160p. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade de Brasília, Brasília, 2013.

SHARMA, D. & VASHIST, H. Hydrodistillation and Comparative Report of Percentage Yield on Leaves and Fruit Peels from Different Citrus Plants of Rutaceae Family. **Journal of Plant Sciences**, v. 10, n. 2, p. 75-78, 2015.

SILVEIRA, J. C.; BUSATO, N. V.; DA COSTA, A. O. S.; DA COSTA JUNIOR, E. F. Levantamento e análise de métodos de extração de óleos essenciais. **Enciclopédia Biosfera**, Goiânia, v. 8, n. 15, p. 2052, 2012.

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

ZULIAN, A.; DORR, A. C.; ALMEIDA, S. C. Citricultura e agronegócio cooperativo no Brasil. **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**. Universidade Federal de Santa Maria, v. 11, n. 11, p. 2290-2306.

## 6 CONCLUSÕES

- 1) Não foi possível verificar influência significativa dos seis diferentes porta-enxertos na composição do óleo essencial dos frutos de tangerineiras ‘Montenegrina’ e ‘Oneco’;
- 2) A espécie *C. reticulata* cv. Oneco apresenta maior teor médio de óleo essencial do que *C. deliciosa* ‘Montenegrina’;
- 3) Os teores dos compostos majoritários contidos nos OE dos frutos de ‘Montenegrina’ e ‘Oneco’ são variáveis em decorrência do desenvolvimento dos frutos, apresentando comportamento distinto em cada uma das espécies;
- 4) O método da hidrodestilação em aparelho Clevenger proporciona menor rendimento de extração de frutos verdes de tangerineiras, em relação ao método industrial da escarificação, embora o óleo essencial do primeiro apresente maior heterogeneidade em relação à quantidade de compostos;
- 5) O OE obtido dos frutos verdes de tangerineiras por meio do método industrial de escarificação apresenta maior rendimento e maior uniformidade quanto à composição, proporcionando uma menor diversidade de substâncias;

- 6) O método de extração utilizado influencia, principalmente, os teores das substâncias extraídas (composição quantitativa) do OE das folhas de tangerineiras e tangores (*petitgrain*);
- 7) Os fatores genéticos determinaram as variações na composição qualitativa do OE de folhas de citros obtido através de hidrodestilação e arraste a vapor.

## **7 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

A realização do estudo de caracterização dos OE de frutos de tangerineiras cultivadas sobre diferentes porta-enxertos durante todo o ciclo de desenvolvimento dos frutos (safra), avaliando a sazonalidade dos teores e composição dos OE demonstrou que sob as mesmas condições edafoclimáticas, bem como tratos culturais, o distinto suprimento hídrico e de fotoassimilados atribuído aos genótipos de porta-enxertos podem ter sido minimizados, não promovendo diferenças estatísticas significativas quanto à composição do OE. Entretanto, foi possível verificar teores até duas vezes superiores de algumas substâncias, o que demonstra importante potencial para obtenção de maior remuneração.

A colheita em média aos 210 DAPF em ‘Montenegrina’ e aos 220 DAPF em ‘Oneco’ demonstrou ser o período em que o teor de OE encontra-se no seu ápice, provavelmente relacionado ao pleno desenvolvimento das glândulas de OE presentes no flavedo dos frutos. Permitindo assim que se identificasse que o momento mais adequado para a extração, em ambas as cultivares, está em torno dos 210-220 DAPF, que no ano de avaliações (2016) correspondeu à segunda quinzena do mês de março. Os teores mais elevados de OE obtidos em ‘Oneco’ corroboram o verificado por estudos anteriores como o de Gonzatto (2015) que baseando-se nos resultados obtidos por Montero (2010), o atribuiu às diferenças quanto a características de tamanho e densidade das glândulas

de óleo em *C. reticulata*, bem como ao tamanho dos frutos no momento da amostragem, já que ‘Oneco’ apresenta ciclo precoce em relação à ‘Montenegrina’, demonstrando potencial desta cultivar para obtenção de maiores rendimentos.

O trabalho avaliando a composição do OE de folhas de tangerineiras e tangores (*petitgrain*) revelou que o método de extração utilizado influencia, principalmente, nos teores dos compostos obtidos (composição quantitativa), enquanto que os fatores genéticos, ou seja, as diferenças quanto às espécies e até mesmo entre cultivares (pois algumas surgiram devido a mutações) determinaram as variações na composição qualitativa do óleo essencial das folhas de citros. Sabe-se que a dificuldade de obtenção do *petitgrain*, assim como a sua composição, o torna interessante para usos industriais contribuindo para a sua valorização comercial.

Estudos futuros avaliando apenas a casca dos frutos de *C. deliciosa* e *C. reticulata* seriam interessantes visando verificar a hipótese de obtenção de maiores teores de OE. Entretanto, também há de se considerar a influência negativa da pectina presente na casca dos frutos quando utilizados procedimentos que promovam o aquecimento da amostra, pois forma-se uma espécie de goma, responsável pela redução do rendimento de extração já que esta dificulta a passagem do vapor d’água com o OE. Deste modo, pondera-se que para a obtenção de OE com características similares aos da indústria (em relação a rendimento e composição), deve-se fazer uso de equipamento que utilize procedimento de extração através de prensagem ou escarificação dos frutos de citros.

## **8 APÊNDICES**

APÊNDICE 1. Probabilidades de significância do efeito de porta-enxertos da análise de variância para as variáveis teor de óleo essencial (%) e compostos com teor superior a 1% na média das avaliações. Butiá-RS, 2016.

**'Montenegrina' (*C. deliciosa*)**

Variável	Porta-Enxerto
Teor de OE (%)	$p=0,9351$ ns
limoneno	$p=0,2311$ ns
$\gamma$ -terpineno	$p=0,1661$ ns
$\alpha$ -pineno	$p=0,9107$ ns
$\beta$ -pineno	$p=0,1580$ ns
$\alpha$ -terpineol	$p=0,6247$ ns
cis- $\alpha$ -bergamoteno	$p=0,0552$ ns

**'Oneco' (*C. reticulata*)**

Variável	Porta-Enxerto
Teor de OE (%)	$p=0,9514$ ns
$\beta$ -pineno	$p=0,3436$ ns
octanal	$p=0,0365^*$
limoneno	$p=0,8034$ ns
$\gamma$ -terpineno	$p=0,9829$ ns
linalol	$p=0,3083$ ns
$\alpha$ -terpineol	$p=0,9692$ ns

\*sem diferenças médias