

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ  
CAMPUS-TOLEDO**

**EMANUELI FERNANDA SPODE**

**ESTUDO DA DEGRADAÇÃO E PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DO  
EXTRATO AQUOSO DA CASCA DE LARANJA DAS ESPÉCIES *CITRUS  
SINENSIS* E *CITRUS AURANTIUM***

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PROCESSOS QUÍMICOS E  
BIOTECNOLÓGICOS  
PPGQB

**TOLEDO  
2020**

**EMANUELI FERNANDA SPODE**

**ESTUDO DA DEGRADAÇÃO E PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DO  
EXTRATO AQUOSO DA CASCA DE LARANJA DAS ESPÉCIES *CITRUS  
SINENSIS* E *CITRUS AURANTIUM***

**Study of the degradation and physical-chemical properties of the aqueous  
extract of orange peel of *Citrus sinensis* and *Citrus aurantium* species**

Dissertação apresentada como requisito para  
obtenção do título de Mestre em Processos  
Químicos e Biotecnológicos da Universidade  
Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR).

Orientador: Profa. Dra. Viviane da Silva Lobo

Coorientador: Prof. Dr. Maurício Ferreira da Rosa

TOLEDO

2020



[4.0 International](https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/)

Esta licença permite que outros remixem, adaptem e criem a partir do seu trabalho, mesmo para fins comerciais, desde que lhe atribuam o devido crédito e que licenciem as novas criações sob termos idênticos. Esta licença costuma ser comparada com as licenças de software livre e de código aberto "copyleft". Todos os trabalhos novos baseados no seu terão a mesma licença, portanto quaisquer trabalhos derivados também permitirão o uso comercial.



Ministério da Educação  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná  
Câmpus Toledo



EMANUELI FERNANDA SPODE

**ESTUDO DA DEGRADAÇÃO E PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DO EXTRATO AQUOSO DA CASCA DE LARANJA DAS  
ESPÉCIES CITRUS SINENSIS E CITRUS AURANTIUM**

Trabalho de pesquisa de mestrado apresentado como requisito para obtenção do título de Mestre Em Processos Químicos E Biotecnológicos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR). Área de concentração: Processos Químicos E Biotecnológicos.

Data de aprovação: 27 de Agosto de 2020

Prof.a Viviane Da Silva Lobo, Doutorado - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Prof.a Magali Silva De Amorim, Doutorado - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Prof Renato Eising, Doutorado - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Documento gerado pelo Sistema Acadêmico da UTFPR a partir dos dados da Ata de Defesa em 15/11/2020.

## RESUMO

SPODE, Emanuelli Fernanda. Estudo da degradação e propriedades físico-químicas do extrato aquoso da casca de laranja das espécies *Citrus sinensis* e *Citrus aurantium*. Toledo. 2020. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Processos Químicos e Biotecnológicos, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Toledo.

A laranja é uma das frutas mais consumidas no mundo todo, seja na forma *in natura* ou, após seu processamento, na forma de sucos concentrados ou polpas. Como produto secundário do processamento das laranjas obtém-se seu óleo essencial, que constitui uma mistura de compostos com alto valor agregado e com várias aplicações nas indústrias farmacêuticas, de cosméticos e de alimentos. O óleo é obtido através do método de prensagem a frio e, o extrato aquoso pode ser obtido pelo processo de hidrodestilação. Nesse trabalho foi obtido o extrato aquoso a partir do pericarpo da espécie *Citrus sinensis* pelo processo de hidrodestilação, no qual se obteve rendimento médio de 1,32%. O pré-tratamento da matriz vegetal com celulase e hemicelulase obtidas de *T. reesi* e *A. niger* resultou no aumento do rendimento de óleo em mais de 50%. Os extratos obtidos foram analisados por CG/EM para qualificação e quantificação dos constituintes químicos. Foi verificado que o *R*-limoneno foi o constituinte majoritário em todas as amostras (>90%). A fotodegradação dos extratos foi avaliada por meio de análises na região do UV-Vis e por cromatografia gasosa e os resultados demonstraram que o extrato aquoso é instável e suscetível a degradação quando exposto a condições adversas. Foi avaliada a atividade antimicrobiana dos óleos obtidos frente aos micro-organismos *E. coli*, *B. subtilis* e *S. aureus*, sendo verificado que todos apresentaram atividade moderada. Em relação à atividade antioxidante pôde-se propor um novo método de avaliação baseado no sequestro de peróxido de hidrogênio e os resultados corroboram com aqueles já encontrados por métodos largamente utilizados, tais como DPPH e o método de cooxidação do  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico para os óleos essenciais de laranja, classificando os extratos aquosos dos óleos como fracos agentes antioxidantes. Os efeitos toxicológicos do extrato dos óleos, tais como DL50, MRTD, taxa de absorção e excreção foram avaliados e concluiu-se que se tratam de extratos seguros para utilização, visto que os componentes mais tóxicos estão presentes em baixíssima concentração, e seria necessário uma quantidade muito grande de consumo de extrato ou de óleo diário para que fosse constatado algum malefício pela sua utilização.

**PALAVRAS-CHAVE:** limoneno, degradação, atividade antioxidante, atividade antimicrobiana, toxicidade.

## ABSTRACT

SPODE, Emanuelli Fernanda. Study of the degradation and physical-chemical properties of the aqueous extract of orange peel of *Citrus sinensis* and *Citrus aurantium* species. Toledo. 2020. Dissertation (Master's Degree) - Graduate Program in Chemical and Biotechnological Processes, Federal Technological University of Paraná, Toledo.

Orange is one of the most consumed fruits worldwide, either in its fresh form or after its processing in the form of concentrated juices or pulps. As a secondary product of the processing of oranges, its essential oil is obtained, which is a mixture of compounds with high added value and with several applications in the pharmaceutical, cosmetics and food industries. The oil is obtained through the cold pressing method and the aqueous extract can be obtained by the hydrodistillation process. This extract was extracted from the pericarp of the species *Citrus sinensis* by the hydrodistillation process in which was obtained an average yield of 1.32%. The pre-treatment of the vegetable matrix with cellulase and hemicellulase obtained from *T. reesi* and *A. niger* resulted in an increase in oil yield of more than 50% in average. The extract obtained was analyzed by GC/MS for qualification and quantification of the chemical constituents. It was found that *R*-limonene was the major constituent in all samples (> 90%). The photodegradation of the extracts was evaluated by analysis in the UV-Vis region and by gas chromatography and the results showed that the aqueous extract is unstable and susceptible to degradation when exposed to adverse conditions. The antimicrobial activity of the extracts obtained against the microorganisms *E. coli*, *B. subtilis* and *S. aureus* was evaluated, and it was verified that all showed moderate activity. Regarding the antioxidant activity, a new evaluation method based on the sequestration of hydrogen peroxide could be proposed and the results corroborate those already found by widely used methods, such as DPPH and the  $\beta$ -carotene / linoleic acid cooxidation method, for orange essential oil, classifying the aqueous extracts of the oil as weak antioxidant agents. The toxicological effects of the oil extract, such as LD50, MRTD, absorption rate and excretion were evaluated and it was concluded that they are safe extracts to use, since the most toxic components are present in very low concentration, and it would take a very large amount of daily oil consumption to see any harm from its use.

KEYWORDS: *R*-limonene, degradation, antioxidant activity, antimicrobial activity, toxicity.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura química dos terpenos facilmente encontrados na natureza.....	15
Figura 2: Aparato utilizado na extração por arraste de vapor a nível laboratorial .....	18
Figura 3:Aparato utilizado na hidrodestilação em laboratório. ....	19
Figura 4: Estrutura morfológica da laranja.....	21
Figura 5: Estruturas enantioméricas do limoneno. ....	25
Figura 6: Módulo para a obtenção do extrato aquoso da casca de laranja.....	31
Figura 7: Tratamento pré-enzimático da matéria-prima vegetal .....	32
Figura 8: Cromatograma do extrato de <i>Citrus aurantium</i> .....	45
Figura 9: Cromatograma do extrato extraído de <i>Citrus sinensis</i> .....	46
Figura 10: Cromatograma do extrato aquoso de <i>Citrus aurantium</i> .....	47
Figura 11: Cromatograma do extrato aquoso de <i>Citrus sinensis</i> .....	49
Figura 12: Estrutura química dos principais componentes dos extratos aquosos de laranja: (a) $\alpha$ -pineno; (b) sabineno; (c) mirceno; (d) octanal; (e) <i>R</i> -limoneno e (f) linalol.....	51
Figura 13: Acompanhamento da fotodegradação do extrato aquoso de <i>Citrus aurantium</i> pelo método Uv-Vis. ....	52
Figura 14: Pico do composto principal da <i>Citrus aurantium</i> após uma hora de degradação.....	53
Figura 15:Pico do composto principal da <i>Citrus aurantium</i> após duas horas de degradação.....	53
Figura 16: Acompanhamento da fotodegradação do extrato aquoso de <i>Citrus sinensis</i> pelo método UV-Vis .....	54
Figura 17: Pico do composto principal da <i>Citrus sinensis</i> após uma hora de degradação.....	55
Figura 18: Pico do composto principal da <i>Citrus sinensis</i> após duas horas de degradação.....	55
Figura 19: Sobreposição dos cromatogramas do extrato aquoso de <i>Citrus aurantium</i> .....	56
Figura 20: Sobreposição dos cromatogramas do extrato aquoso de <i>Citrus sinensis</i>	57
Figura 21: Produtos resultantes da formação de um dirradical.....	58
Figura 22: Controle positivo referente a <i>S. aureus</i> .....	59

Figura 23: Controle positivo referente a <i>E. coli</i> .....	59
Figura 24: Controle positivo referente a <i>B. subtilis</i> .....	60
Figura 25: Controle negativo referente aos microrganismos <i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> e <i>B. subtilis</i> .....	61
Figura 26: Halo de inibição dos extratos frente aos microrganismos <i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> e <i>B. subtilis</i> .....	61

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Parâmetros da laranja e a sua composição .....	21
Tabela 2: Produção de laranja no Brasil em 2017 .....	22
Tabela 3: Composição média do extrato aquoso ou do óleo essencial de laranja ....	24
Tabela 4: Valores referência para toxicidade aguda .....	40
Tabela 5: Dados das extrações aquosas da casca de laranja da espécie <i>Citrus sinensis</i> .....	41
Tabela 6: Umidade da casca e cálculo dos rendimentos das extrações após tratamento enzimático. ....	42
Tabela 7: Massas de extrato obtidas no volume de 100 uL .....	43
Tabela 8: Composição do extrato aquoso de <i>Citrus aurantium</i> .....	45
Tabela 9: Resultado do CG-MS para o extrato aquoso de <i>Citrus aurantium</i> .....	48
Tabela 10: Resultado do CG-MS para o extrato aquoso da espécie <i>Citrus sinensis</i> .	49
Tabela 11: Evolução da absorbância com a fotodegradação do extrato aquoso de <i>Citrus aurantium</i> .....	52
Tabela 12: Evolução da absorbância com a fotodegradação do extrato aquoso da espécie <i>Citrus sinensis</i> .....	54
Tabela 13: Interpretação dos halos de inibição .....	58
Tabela 14: Estudo da atividade antimicrobiana dos extratos de laranja das espécies <i>Citrus sinensis</i> e <i>Citrus aurantium</i> .....	61
Tabela 15: Resultados obtidos a partir da análise toxicológica com o ProTox-II .....	65
Tabela 16: Resultados obtidos a partir da análise toxicológica com o pkCSM .....	67



## LISTA DE ABREVIATURAS

ABNT	Associação brasileira de normas técnicas
ANVISA	Agência nacional de vigilância sanitária
CG/FID	Cromatografia gasosa com ionização em chama
CG/MS	Cromatografia gasosa associada a um espectrômetro de massas
COMTRADE	<i>Commodity Trade Statistics Database</i>
COX-1	Proteína ciclo-oxigenase-1
CV	Coefficiente de variação
DL50	Dose letal mediana
DP	Desvio padrão
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazil
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IRLe	Índice de retenção linear experimental
IRLi	Índice de retenção linear da literatura
ISO	<i>International Organization for Standardization</i>
ITA	Instituto tecnológico de aeronáutica
MAPA	Ministério da agricultura, pecuária e abastecimento
MAO-A	Amina oxidase A
MRTD	Máxima dose diária tolerada
NBR	Norma técnica
pH	Potencial de Hidrogênio
ppm	Partes por milhão
q.s.p	Quantidade suficiente para
RT	Tempo de retenção
UV-Vis	Espectroscopia no ultravioleta visível

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	11
1.1	OBJETIVOS.....	13
1.1.1	Objetivo geral.....	13
1.1.2	Objetivos específicos .....	13
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA .....	14
2.1	ÓLEOS ESSENCIAIS .....	14
2.1.1	A importância dos óleos essenciais no Brasil e no mundo.....	15
2.1.2	Métodos de extração de óleos essenciais .....	16
2.1.2.1	Extração por arraste de vapor.....	17
2.1.2.2	Extração por hidrodestilação.....	18
2.1.2.3	Extração com pré-tratamento enzimático.....	19
2.2	A LARANJA .....	19
2.2.1	A importância da laranja para a economia brasileira.....	22
2.2.2	O óleo essencial de laranja e o extrato aquoso das cascas de laranja .....	23
2.2.3	Atividade antimicrobiana.....	25
2.2.4	Atividade antioxidante.....	26
2.3	TOXICOLOGIA DE COMPOSTOS .....	27
3	MATERIAIS E MÉTODOS .....	30
3.1	MATÉRIA-PRIMA .....	30
3.1.1	Pré-processamento das matérias-primas .....	30
3.1.2	Teor de umidade da casca da laranja .....	30
3.2	OBTENÇÃO DO EXTRATO AQUOSO DA CASCA DA LARANJA DA ESPÉCIE <i>CITRUS SINENSIS</i> .....	31
3.2.2	Obtenção do extrato aquoso com a utilização de enzimas .....	32
3.3	ANÁLISES QUÍMICAS E FÍSICAS.....	33
3.3.1	Rendimento (%).....	33
3.3.2	Análises qualitativas .....	33
3.3.3	Análise quantitativa.....	34
3.4	ESTUDO DA DEGRADAÇÃO.....	35
3.4.1	Fotodegradação.....	35
3.5	ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	36

3.5.1	Preparo do inóculo.....	36
3.5.2	Preparo do meio de cultivo .....	37
3.5.3	Inoculação .....	37
3.6	ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE .....	37
3.7	ANÁLISE DA TOXICIDADE <i>IN SILICO</i> .....	39
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	41
4.1	TEOR DE UMIDADE E RENDIMENTO (%).....	41
4.2	ANÁLISES FÍSICAS.....	43
4.2.1	Massa específica .....	43
4.2.2	Índice de refração .....	44
4.3	ANÁLISE QUANTITATIVA .....	44
4.3.1	Análise por CG/FID.....	44
4.3.2	Análise por CG/MS .....	47
4.4	ESTUDO DA DEGRADAÇÃO .....	51
4.4.1	Fotodegradação .....	51
4.5	ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA .....	58
4.6	ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE .....	63
4.7	ESTUDO DA TOXICIDADE .....	64
4.7.1	Estudo da toxicidade <i>in silico</i> por meio da plataforma ProTox-II .....	65
4.7.2	Estudo da toxicidade <i>in silico</i> por meio da plataforma pkCSM .....	66
5	CONCLUSÃO.....	68
6	SUGESTÃO DE TRABALHOS FUTUROS .....	69
	REFERÊNCIAS .....	70

## 1 INTRODUÇÃO

Os óleos essenciais constituem metabólitos secundários originados de matrizes vegetais como as flores, frutos, cascas e sementes. Definem-se como compostos aromáticos e voláteis que tem entre outras funções, a função designar o aroma exalado por cada espécie. Os constituintes dos óleos essenciais são principalmente os derivados terpênicos, como os mono e sesquiterpenos e os fenilpropanoides (SOLÓRZANO-SANTOS; MIRANDA-NOVALES, 2012). E é essa combinação de diversas substâncias químicas que é a responsável por suas propriedades como a atividade antioxidante a antimicrobiana apresentada pela maioria de seus representantes (GUTIERREZ; BARRY-RYAN; BOURKE, 2008).

O crescente interesse do mercado mundial em utilização de produtos naturais, em vez de sintéticos, constitui o principal fator responsável pelo aumento da demanda e conseqüente produção dos óleos essenciais. Dados, que comprovam esse fato, são apresentados pela COMTRADE (*United Nations Commodity Trade Statistics Database*), que informam o quanto o comércio desses produtos contribuem para a economia de cada país. E devido à grande biodiversidade do Brasil, desde o início do século XX, esse é visto como um local promissor para a obtenção de óleos essenciais das mais diversas matrizes vegetais, estando entre elas a laranja. O Brasil, por exemplo, em 2018 arrecadou mais de US\$ 430 milhões com a exportação dos produtos classificados na classe 3301 que correspondem aos óleos essenciais, resinoides e subprodutos terpênicos (COMTRADE, 2018).

Atualmente o óleo essencial de laranja é o principal produto no mercado de produtores e exportadores de óleos essenciais, já que o Brasil responde por 76 % de participação no comércio mundial do suco de laranja (NEVES; TROMBIN, 2017). O óleo essencial de laranja é um subproduto da indústria de sucos concentrados, que possui um alto valor agregado, já que é um metabólito de suma importância para aplicação nas indústrias farmacêuticas, cosméticas e de alimentos. Na primeira delas, é utilizado principalmente para dar aroma e sabor agradável aos medicamentos. Cosméticos e produtos de higiene utilizam os óleos essenciais principalmente como aromatizantes, e na indústria de alimentos eles podem ser utilizados além de aromatizantes, como conservantes para prolongar a validade de alimentos e diminuir o uso de antioxidantes sintéticos.

A composição dos óleos essenciais, em geral, pode variar de acordo com o método de extração, época de colheita e nível de maturação do fruto quando utilizado. O óleo essencial de laranja é aquele obtido exclusivamente por meio de prensagem mecânica a temperatura ambiente e, ao utilizar os outros métodos de extração se obtém um extrato aquoso. Esses dois materiais são semelhantes e tem sua composição variada de acordo com a espécie de laranja utilizada, mas são compostos basicamente pelas espécies químicas de *R*-limoneno, mirceno e linalol. Desses compostos, a concentração de *R*-limoneno pode ultrapassar 90%.

Entretanto, para que o óleo ou o extrato aquoso possa ser utilizado pelas indústrias e ter seus benefícios usufruídos pelos consumidores é necessário garantir a sua qualidade. Devido à falta de investimentos no setor e a falta de padrões de qualidade, o óleo essencial obtido pelas indústrias de suco no Brasil que utilizam o método de extração por prensagem ainda é considerado de baixa qualidade (BIZZO; HOVELL; RESENDE, 2009), já que, segundo Cardoso, Bastos, Neves e Abrantes (2004), um dos problemas relacionados à produção de laranjas no Brasil revela-se o pouco cuidado com a fitossanidade, visto que agrotóxicos são largamente utilizados durante a produção agroindustrial. Além disso, adição de compostos sintéticos ou óleos essenciais de menor valor nos óleos e no seu extrato, assim como a falsificação do óleo através de misturas de substâncias sintéticas dissolvidas num veículo inerte também são responsáveis pela diminuição da qualidade desses materiais distribuídos aos consumidores (SIMÕES *et al*, 2002).

Nesse contexto é justificada a importância do estudo do extrato aquoso da casca de laranja, que se diferencia do óleo essencial pelo método de extração empregado, mas tem sua composição e propriedades muito semelhantes, conforme já exemplificado por Silva (2018) ao avaliar as propriedades dos óleos essenciais e extratos aquosos de *P. desiderabilis*. Através desse estudo, é possível identificar quais parâmetros podem interferir na qualidade desses materiais, já que a degradação dos mesmos é indesejada para a sua utilização como matéria-prima. Além disso, investigar possíveis propriedades, que são atrativas do ponto de vista industrial, como por exemplo, a capacidade de atuar como agente antioxidante ou antimicrobiano é interessante ao pensar na substituição de agentes sintéticos hoje utilizados com essas funções. Também, estudar os efeitos toxicológicos de seus principais compostos contribui para assegurar a segurança dessas matérias-primas,

que, além de serem utilizadas na indústria química e alimentícia, também podem ser utilizadas diretamente pelos consumidores que desejam usufruir de suas propriedades.

## 1.1 OBJETIVOS

### 1.1.1 Objetivo geral

Estudar as propriedades e os fatores que ocasionam a degradação do extrato aquoso da casca de laranja obtido por duas diferentes metodologias de hidrodestilação.

### 1.1.2 Objetivos específicos

- Obter em laboratório o extrato aquoso da casca de laranja através da hidrodestilação;
- Utilizar tratamento enzimático para otimizar a extração;
- Realizar análises químicas e físicas do extrato aquoso obtido;
- Realizar um estudo de fatores como a incidência de luz sobre a degradação do extrato;
- Avaliar a atividade antimicrobiana e antioxidante dos extratos em estudo;
- Realizar um estudo *in silico* da toxicologia dos extratos em estudo;
- Comparar os resultados obtidos do extrato aquoso obtido no laboratório pelo método de hidrodestilação com os resultados encontrados com um extrato aquoso obtido no comércio, que foi extraído pelo método de arraste a vapor.

## 2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.1 ÓLEOS ESSENCIAIS

Desde os primórdios da humanidade as plantas são utilizadas de maneira a auxiliar a sobrevivência humana, sendo como alimentos, ou como agentes paliativos. Entretanto, os estudos a respeito dos óleos essenciais provenientes de matrizes vegetais iniciaram somente em meados do século XVIII, período esse, em que foram extraídos os óleos e foram realizados isolamentos das moléculas que o constituem, com conseqüente estudo das suas propriedades (MONTANARI, 2010). A partir da década de 1920 iniciaram-se as primeiras descobertas das propriedades benéficas dos óleos, como por exemplo algumas propriedades curativas, antissépticas, antioxidantes e antimicrobianas.

Os óleos essenciais são formados por uma mistura de compostos aromáticos, que estão presentes nas mais variadas matrizes vegetais (TRANCOSO *et al*, 2013). São secretados em glândulas, como os tricomas ou pelos glandulares, por exemplo (LOPES *et al*, 2016). Nas plantas, os óleos são responsáveis pelos seus aromas e odores, e, muitas vezes, funcionam como uma “arma” de defesa destes, podendo atuar como inibidores da germinação de outras espécies que competiriam pelos mesmos recursos naturais (água, solo, luz) (MELO, 2005).

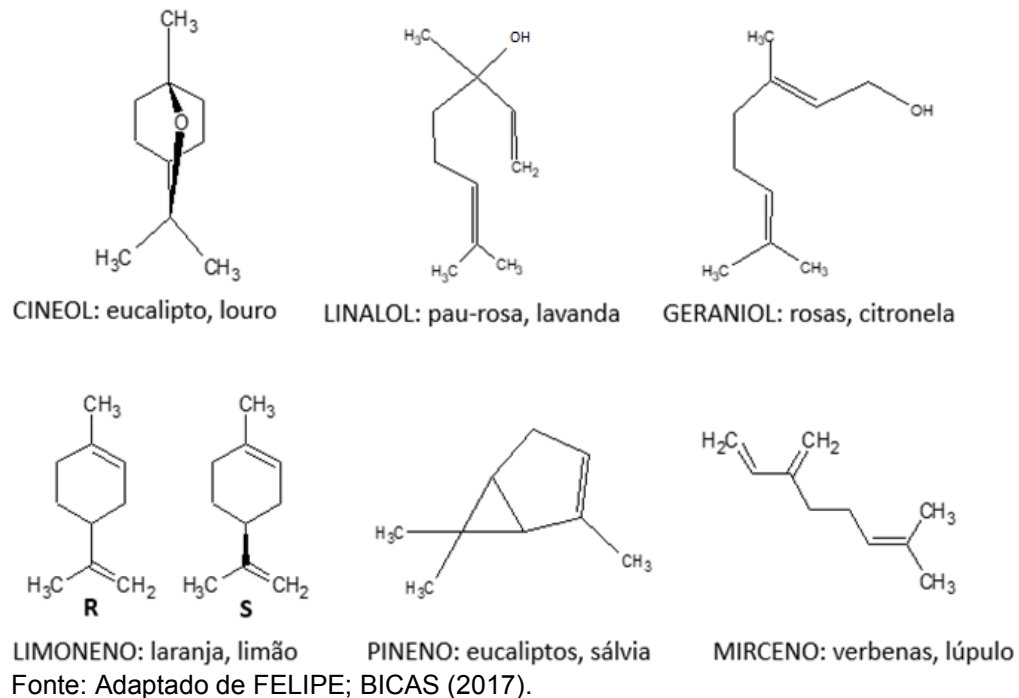
Quimicamente os óleos essenciais geralmente possuem altos índices de refração e a maioria deles são opticamente ativos (LOPES *et al*, 2016). Geralmente são apolares, e, por isso, imiscíveis em água, mas miscíveis em éter, álcool e na maioria dos solventes orgânicos (MELO, 2005).

Os óleos essenciais são compostos principalmente por terpenos que tem, entre outras funções, a de proteger as plantas contra fatores abióticos relacionados ao ambiente físico como níveis de iluminação, exposição aos raios UV, conteúdo de água e deficiências nutricionais (CORREIA *et al.*, 2008; VIEGAS JÚNIOR, 2003).

Os terpenos que são classificados de acordo com o tamanho da cadeia de moléculas que os compõem. Basicamente são compostos derivados de diversas combinações de unidades prenilicas, uma combinação de cinco átomos de carbono ligados a oito átomos de hidrogênio (C<sub>5</sub>H<sub>8</sub>), denominado de isopreno (PAVARINI,

2011). As estruturas dos terpenos mais abundantes na natureza podem ser observadas na Figura 1.

Figura 1: Estrutura química dos terpenos facilmente encontrados na natureza



### 2.1.1 A importância dos óleos essenciais no Brasil e no mundo

A extração de óleos essenciais no Brasil com finalidade comercial se deu início na década de 1920 com a extração do óleo essencial de pau-rosa (*Aniba rosaeodora*), e alavancou em 1930 com o início da Segunda Guerra Mundial devido a maior dificuldade do mercado europeu em manter as transações econômicas da época com o restante do mundo (BIZZO; HOVELL; RESENDE, 2009). Foi neste contexto que o Brasil surgiu como uma alternativa, pois possuía mão de obra barata e grande diversidade de riquezas naturais que atraía a atenção do mundo principalmente devido à presença da floresta amazônica e da mata atlântica que constituem duas das maiores diversidades vegetais do planeta. A partir de então novas culturas passaram a ser exploradas como o óleo essencial de sassafrás, *Mentha arvensis*, laranja e eucalipto.

Apesar de não existir, na época, uma infraestrutura político-econômica, essas culturas conseguiram modificar o comportamento registrado na pauta de exportação desse período, passando o país de importador para exportador (SANTOS, 2011).



A partir da década de 1980, o Brasil ganhou destaque na produção de óleos essenciais e, ao lado da França, China e Estados Unidos, é considerado um dos quatro grandes produtores mundiais, e se inclui entre os sete países responsáveis por 85% da produção mundial de óleos essenciais (GAMA, 2011). A posição do Brasil deve-se, basicamente, aos óleos essenciais cítricos, obtidos como subprodutos da indústria de sucos. Em 2009, o Brasil constitui o quarto do “ranking”, contribuindo principalmente com óleos cítricos, com destaque para o óleo essencial de laranja (cerca de 80%), o qual é um subproduto da indústria de sucos. Apesar do Brasil ter uma posição de destaque no mercado de exportações de óleos essenciais, ainda é precária a situação quando refere-se a qualidade dos óleos obtidos no país. Isso se deve, entre outros motivos, aos baixos investimentos governamentais no setor.

Em 2013, a produção mundial de óleo essencial foi estimada entre 45 e 50 mil toneladas, movimentando cerca de US\$ 15 bilhões por ano, de acordo com dados disponibilizados pela Sociedade Nacional de Agricultura (2013). Os maiores consumidores de óleos essenciais no mundo são países como os Estados Unidos, China, Índia e Japão.

Em valores, o Brasil exportou no ano de 2018 o equivalente a US\$ 134.676.332 (17.672.743 Kg) para os EUA, US\$ 30.998,698 (4.245.185 Kg) para a China, US\$ 29.070.843 (3.669.683 Kg) para a Índia e US\$ 26.184.605 (4.644.572 Kg) para o Japão, conforme o banco de dados do comércio de mercadorias das Nações Unidas (*Commodity Trade Statistics Database - COMTRADE*) (COMTRADE, 2018). Dessa mesma fonte obteve-se o dado de que o Brasil, em 2018, importou pouco mais de US\$ 77 milhões nessa mesma categoria, comprovando a balança comercial favorável desses produtos e a sua real importância econômica para o nosso país.

### 2.1.2 Métodos de extração de óleos essenciais

Para cítricos é considerado óleo essencial, segundo a norma internacional ISO 9235:2013, somente aquele obtido por processos mecânicos a partir do epicarpo do fruto, a temperatura ambiente e, o extrato aquoso é aquele obtido por outros métodos de extração, como a partir da destilação. Entretanto, devido a essa

peculiaridade encontrada apenas para óleos cítricos, muitos trabalhos acadêmicos e artigos científicos tratam o extrato do óleo obtido por arraste a vapor ou por hidrodestilação como óleo essencial. Essa diferenciação, entretanto, é metodológica, visto que a composição e grande parte das propriedades atribuídas aos óleos essenciais também são encontradas nos extratos aquosos obtidos da destilação dos materiais em análise, mesmo que em menor intensidade (SILVA, 2018).

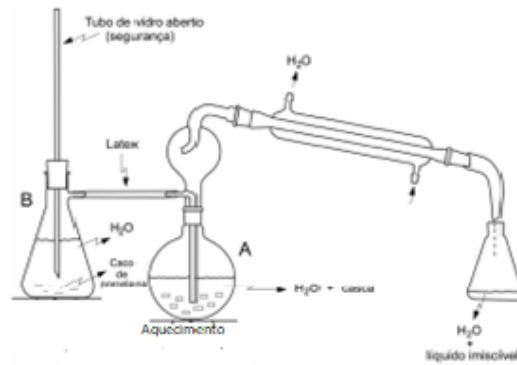
Para as demais matrizes vegetais, segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2007), o óleo essencial constitui um "produto volátil de origem vegetal obtido por processo físico (destilação por arraste com vapor de água, destilação a pressão reduzida ou outro método adequado)". Dentre as tecnologias mais usuais para a obtenção dos óleos essenciais estão extração por prensagem mecânica, extração com solventes orgânicos, hidrodestilação, destilação por arraste de vapor e, nos últimos anos, foram desenvolvidas técnicas que realizam a extração utilizando fluidos supercríticos e enzimas. (NJOROGE *et al.*, 2005; BAGETTA *et al.*, 2010; TRANCHIDA, *et al.*, 2011).

#### 2.1.2.1 Extração por arraste de vapor

Em escala industrial, o método mais utilizado para a extração de óleos essenciais em geral é a destilação por arraste a vapor, pois, apesar de demandar a utilização de vasos de destilação, condensadores, separadores e caldeira para geração de vapor, ainda é mais lucrativo quando comparado as técnicas mais novas como, por exemplo, a extração com fluidos supercríticos (SARTOR, 2009).

A extração por arraste de vapor, demonstrada pela Figura 2, consiste no método mais utilizado para a realização de extração de óleos essenciais.

Figura 2: Aparato utilizado na extração por arraste de vapor a nível laboratorial



Fonte: Adaptado de BAPTISTELLA et al., 2009.

Nele, a matriz vegetal entra em contato apenas com o vapor de água, e este retira o óleo de dentro das glândulas do vegetal. Assim que é retirado, o óleo sofre um choque térmico devido à alta temperatura na qual a matriz vegetal está exposta e vaporiza, voltando a sua forma líquida apenas quando atinge o condensador. Por fim, a mistura de óleo com hidrolato (água condensada resultante da extração) é separada por meio das diferenças de polaridade e densidade (SILVEIRA *et al*, 2012). Caso ainda houver a presença de óleo no hidrolato, é possível submeter a mistura a uma destilação com auxílio do evaporador com o intuito de separar os dois compostos. Entretanto, devido à baixa quantidade de óleo que geralmente fica misturado no hidrolato, é muito difícil conseguir obter alguma quantidade de óleo ao submeter o hidrolato ao evaporador sendo, portanto, inviável a sua utilização.

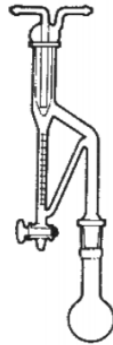
#### 2.1.2.2 Extração por hidrodestilação

A hidrodestilação é uma variante do processo de destilação a vapor, com a diferença de que nela a matéria-prima vegetal é completamente mergulhada em água, e esta é aquecida sem que a temperatura ultrapasse os 100°C. Após aquecido, os materiais voláteis são levados pelo vapor até o condensador, no qual ocorre a sua condensação e posterior separação devido ao fato de óleo essencial de laranja ser menos denso que a água (OLIVEIRA; SOUZA, 2012).

O aparato utilizado para esse método está representado pela Figura 3 e consiste em um balão de fundo redondo envolto a uma manta de aquecimento, e esse balão acoplado a uma vidraria de Clevenger na qual está acondicionado um

condensador que retornará o óleo e o hidrolato a sua forma líquida para que possa ser coletado em um recipiente adequado.

Figura 3:Aparato utilizado na hidrodestilação em laboratório.



Fonte: SILVA et al., 2005

### 2.1.2.3 Extração com pré-tratamento enzimático

As enzimas constituem um grupo de substâncias orgânicas de natureza proteica que são capazes de acelerar reações químicas. Elas são capazes de romper a parede celular do vegetal geralmente composto de celulose e lignina e liberar o óleo para o meio aquoso (JUGE, 2006). O método de extração com a utilização de enzimas visa a otimização das extrações, seja elevando o rendimento ou diminuindo o tempo de extração, bem como a substituição de métodos que atualmente utilizam solventes tóxicos (WU, JOHNSON e JUNG, 2009; CHABRAND; GLATZ, 2009). Após o tratamento enzimático o composto extraído pode ser separado da água devido a diferença de densidade ou por centrifugação, sem a necessidade da utilização de solventes orgânicos. Trata-se de um processo promissor, pois não necessita de altas temperaturas (geralmente ocorre na temperatura ótima de atividade da enzima) e o maior investimento refere-se a aquisição das enzimas para o processo.

## 2.2 A LARANJA

A história da laranja e seus benefícios como a alta concentração de vitamina C, presença de ácido fólico, potássio e magnésio, além das propriedades antioxidantes são conhecidas há muito tempo. Sabe-se que as diversas espécies

existentes hoje no Brasil se originaram da Ásia e foram trazidas pelos portugueses ainda na época da colonização.

A laranja doce chegou ao Brasil em meados do século XVI juntamente com o início da colonização do país. Há vários relatos da época que comprovam a existência do cultivo da laranja, como o realizado pelo historiador português Pero de Magalhães Gândavo (TOMCHINSKY, MING, 2019). A extração em larga escala do seu óleo, entretanto, ocorreu somente no século XX com o surgimento das fábricas de sucos concentrados a partir de década de 1960, e como consequência deu-se início à exportação desse insumo, fazendo com que a indústria de óleos essenciais se concretizasse no país.

A laranja pertence à família *Rutaceae*, sub família *Aurantioideae*, tribo *Citreae* e subtribo *Citrinae*. Os principais gêneros dessa fruta são o *Fortunella*, *Poncirus* e *Citrus*. Este último é o mais conhecido e engloba quase todas as espécies cultivadas comercialmente. Dentre elas está a *Citrus sinensis*, a qual reúne um grupo de laranjas mais doces, como a laranja-lima, laranja-pêra, laranja-bahia e a laranja-seleta, e as pertencentes a espécie *Citrus aurantium*, da qual fazem parte as laranjas mais azedas (TAYLOR, 2005).

Além da variação no sabor que vai de muito doce a levemente azeda, as espécies de laranjas anteriormente citadas se diferenciam pela sua utilização. A primeira delas é mais comumente utilizada para consumo *in natura*, sucos naturais, etc. A segunda espécie, por seu amargor característico dificilmente é consumida sem ser processada em formas de geleias, pastas e compotas (COELHO *et al*, 2019).

Quanto à morfologia os citros se caracterizam pela produção de frutas do tipo baga. O fruto apresenta o endocarpo dividido em um número variável de segmentos ou gomos, os quais são preenchidos por vesículas de suco, e na porção próxima ao eixo central localizam-se as sementes, quando presentes. A casca é caracterizada por duas partes: o exocarpo, a mais externa, designada como "flavedo", constituído pela epiderme e por uma camada de células glandulares de óleo, e o mesocarpo, constituído por uma camada de células esponjosas brancas denominada "albedo", que reveste externamente os gomos (ALVES; MELO, 2003). A Figura 4 representa a estrutura interna desse fruto.

Figura 4: Estrutura morfológica da laranja



Fonte: Adaptado de <https://hortifrutigranjeiros.com.br/curiosidades/laranja> (2019).

A composição da laranja pode variar devido a diversos fatores que vão desde o clima, temperatura, irrigação, adubação até ao estágio de maturação em que é realizada a colheita. A Tabela 1 demonstra os principais componentes relacionados a laranja e sua composição média (TITA, 2011).

Tabela 1: Parâmetros da laranja e a sua composição

Parâmetros		Valores	
Água	86 a 92%	Suco	50 a 55%
		Albedo	40 a 50% de flavedo
		Polpa	5 a 10%
<b>Carboidratos</b>		9 a 12%	
<b>Açúcares</b>		5 a 8%	
<b>Pectina</b>		1 a 2%	
<b>Fibras</b>		0,8 a 2%	
<b>Proteínas</b>		0,8 a 1%	
<b>Componentes nitrogenados</b>		0,7 a 0,8%	
<b>Minerais</b>		0,5 a 0,9%	
<b>Lipídios</b>		0,2 a 0,5%	
<b>Óleo essencial</b>		0,2 a 0,5%	
Parâmetros		Valores	
<b>Valor Calórico</b>		33 a 45 Kcal	
<b>Sementes</b>		3 a 4 unidades em média	
<b>Outros componentes</b>		Enzimas, pigmentos, constituintes voláteis, flavonoides e vitaminas.	

Fonte: (TITA, 2011).

### 2.2.1 A importância da laranja para a economia brasileira

O Brasil por si só é um grande produtor de frutas cítricas, sendo a mais comum delas, a laranja. A maior produção está concentrada no sudeste, sendo que o estado de São Paulo é o maior produtor nacional, chegando a produzir mais de 80% do total produzido em todo o país (NEVES, TROMBIN, 2017). Esse valor acentuado é explicado pelas ótimas condições encontradas na região para o cultivo das laranjeiras que são traduzidas pelo clima tropical com baixa variação térmica e chuvas regulares. Além disso, a presença de solos areno-argilosos também contribui para a maturação dos frutos e com a sua qualidade.

O último censo realizado pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) em 2017 revela os dados da citricultura em todo o país. Na Tabela 2, é possível perceber com facilidade a supremacia da região sudeste no que se refere a produção de laranjas.

Tabela 2: Produção de laranja no Brasil em 2017

Região Fisiográfica	Área colhida (ha)	Quantidade produzida (t)	Rendimento Médio (t/ha)	Participação na produção (%)
<b>Norte</b>	23.641	358.812	15,18	2,06
<b>Nordeste</b>	102.012	1.266.525	12,42	7,25
<b>Sudeste</b>	447.121	14.379.125	32,16	82,36
<b>Sul</b>	50.504	1.270.405	25,15	7,28
<b>Centro-Oeste</b>	8.408	185.041	22,01	1,06
<b>BRASIL</b>	631.686	17.459.908	27,64	100,00

Fonte: IBGE – Produção Agrícola Municipal, 2017.

De acordo com os dados do censo do IBGE, o total produzido em 2017 passou de 17 milhões toneladas e, segundo projeções do agronegócio realizadas pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, estima-se que na safra de 2027/28 o valor suba para 18,2 milhões de toneladas. A produção deve ter crescimento anual por volta de 0,7% no próximo decênio (MAPA, 2018).

Já em relação ao mercado externo, as projeções realizadas pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento indicam que as exportações de suco de laranja devem passar de 2,3 milhões de toneladas em 2017/18 para 2,7 milhões de

toneladas em 2027/28. Isso representa um aumento de 17,5% na quantidade exportada (MAPA, 2018).

A citricultura paulista é a principal responsável pela primeira posição brasileira no mercado mundial de suco de laranja. Segundo Neves e Trombin (2017), a maioria da produção desse cinturão vai para as indústrias de suco que produzem todos os anos entre 1 milhão e 1,3 milhões de toneladas de suco, das quais 97% são exportados. Apenas nessa região a citricultura gera cerca de 200 mil empregos diretos e indiretos e o setor ainda gera um PIB de US\$ 6,5 bilhões de dólares em todos os elos da sua cadeia produtiva.

Entretanto, apesar de o suco concentrado ser o carro chefe da exportação brasileira, há outros derivados da laranja que também são obtidos durante o seu processamento e tem grande valor econômico: os óleos essenciais, que podem ser provenientes tanto das cascas, como das folhas das laranjeiras.

### 2.2.2 O óleo essencial de laranja e o extrato aquoso das cascas de laranja

Como já citado, a diferença entre o óleo essencial de laranja e o extrato aquoso obtido a partir da destilação das cascas de laranja constitui o método de extração empregado. Entretanto, apesar de se tratarem de materiais distintos, a composição e as propriedades encontradas nessas duas matérias-primas podem ser muito semelhantes (SILVA, 2018).

Tanto o óleo essencial, como o extrato extraído da casca de laranja por destilação podem ter composições variadas que dependem do método de extração utilizado, região de cultura e do nível de maturação do fruto quando colhido (SILVA *et al.*, 2003; SANTOS *et al.*, 2004).

Apesar das possíveis variações na produção da laranja, a maioria dos óleos essenciais ou dos extratos aquosos da casca da laranja apresenta uma composição aproximada e, os compostos predominantes são os apresentados na Tabela 3, mas há outros compostos em menor proporção que completam a sua composição.



Tabela 3: Composição média do extrato aquoso ou do óleo essencial de laranja

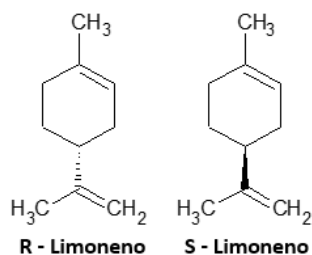
<b>Composto</b>	<b>Presença (%)</b>
Limoneno ( <i>R</i> -limoneno)	94
Mirceno	1,18
$\alpha$ -pineno	0,54
Sabineno	0,74
Linalol	0,84
Total	97,3

Fonte: Adaptado de STASHENKO et al., 1996; VALE et al., 2002; SANTOS; SERAFINI; CASSEL, 2003; CHEN et al., 2014.

A partir dos dados apresentados na Tabela 3 é possível evidenciar que o monoterpeno *R*-limoneno é o componente principal nos óleos essenciais extraídos da laranja e no seu extrato, podendo ser o responsável por grande parte das propriedades atribuídas a esses produtos. O restante da composição pode variar, sendo geralmente encontrado em menor composição compostos como o octanal, decanal, geraniol, entre outros.

O limoneno (1-metil-4-(prop-1-en-2-il) ciclohex-1-eno) é um hidrocarboneto cíclico insaturado que pertence à família dos terpenos. É um líquido incolor, volátil e oleoso e é o principal responsável pelo odor característico das frutas cítricas. Esse composto apresenta em seu anel ciclo-hexeno, com um carbono quiral. Tal característica faz com que esta molécula exista na forma de dois estereoisômeros que estão representados pela Figura 5, o D-limoneno (*R*-(+)-limoneno), que desvia a luz polarizada para o sentido horário e o L-limoneno (*S*-(-)-limoneno), que desvia a luz polarizada para o sentido anti-horário. Estes estereoisômeros podem apresentar propriedades, aplicações e até mesmo efeitos indesejáveis distintos (LIMA,1997) e são os monoterpenos considerados como mais abundantes na natureza (PAKDELA; PANTEAA; ROY, 2001).

Figura 5: Estruturas enantioméricas do limoneno.



Fonte: Adaptado de GERCHMAN, 2019.

Devido ao fato de o *R*-limoneno ser o composto em maior proporção no óleo essencial de laranja e no extrato destilado da casca da laranja, pode-se dizer que sua composição majoritária é de monoterpenos (SANTOS, 2014). A presença de monoterpenos insaturados, como o caso do *R*-limoneno poderá facilitar a formação de produtos indesejados quando exposto a determinadas condições, degradando o composto em questão, sendo isso possível através de reações fotoquímicas (HENDRICKSON; CRAM; HAMMOND, 1970) ou pela quebra homolítica das ligações, onde a cisão da ligação ocorre de maneira igual e cada um dos átomos permanece com o seu elétron de origem, surgindo os radicais livres (SOLOMONS, 2001).

O óleo essencial de laranja e o extrato aquoso obtido da casca da laranja possuem diversas opções de aplicação. No ramo industrial sua principal utilização está atrelada às indústrias de perfumaria, cosmética (produtos de higiene), farmacêutica, de alimentos, condimentos e aromatizantes de alimentos e bebidas e de polímeros. (SIMÕES *et al.*, 2002).

Além disso, o principal constituinte do óleo essencial de laranja e do seu extrato (o *R*-limoneno) também possui várias aplicações. Na indústria alimentícia ele é utilizado como precursor para o carveol, a carvona, uma cetona terpênica, e o mentol (MAROSTICA JUNIOR, PASTORE, 2007). Seu uso como solvente está crescendo pelo fato dele ser biodegradável e menos tóxico e também faz parte da composição de diversos inseticidas (HOLLINGSWORTH, 2005).

### 2.2.3 Atividade antimicrobiana

Os óleos essenciais ou seus extratos podem apresentar ação antimicrobiana por três formas: interferência na dupla camada fosfolipídica da parede celular da

bactéria, pelo aumento da permeabilidade e perda dos constituintes celulares, e por alteração de uma variedade de sistemas enzimáticos como os envolvidos na produção de energia celular e síntese de componentes estruturais ou destruição do material genético (KALEMBA; KUNICKA, 2003).

Os microrganismos são divididos em dois grandes grupos, os gram-positivos e os gram-negativos. No primeiro deles a célula é encoberta pela parede celular onde está presente o peptidoglicano. Internamente à parede celular existe a membrana plasmática formada por dupla camada de fosfolipídios e proteína, onde toda a energia da célula é produzida. Já as gram-negativas, além de apresentar as estruturas da gram-positiva, possui uma membrana externa à parede celular com dupla camada de lipídios, contendo proteína, semelhante à membrana plasmática, possuindo também polissacarídeos que diferem nas diferentes cepas de bactérias (ARAUJO, 2010).

Dessa forma, devido à maior complexidade da membrana externa da bactéria gram-negativa, ela pode ser considerada mais resistente, pois dificulta a penetração de antibióticos. Frente aos óleos essenciais e seus extratos, uma possível atividade antimicrobiana pode ser atrelada a capacidade desses compostos penetrar no interior das células de algumas bactérias, danificando suas membranas, resultando na morte celular das mesmas (BAJPAI; BAEK; KANG, 2012)

Estudos realizados por Heberle *et al.* (2016) mostram que o extrato aquoso da casca de laranja apresenta atividade antimicrobiana frente a bactérias gram positivas, como as do gênero *Bacillus*, *Pseudomonas* e *Staphylococcus*. Já Fazio *et al* (2018) evidenciaram também a possibilidade de inibição frente a microrganismos gram negativos, como as Salmonelas. Por fim, Torres-Alvarez (2017) evidenciaram moderados halos de inibição contra *S. aureus* e outras cepas do gênero *Bacillus*, sendo, portanto, interessante investigar a presença dessa característica nos dois grupos de microrganismos a fim de sugerir ou não a aplicação dos óleos das espécies estudadas na conservação de alimentos.

#### 2.2.4 Atividade antioxidante

Um composto com atividade antioxidante é capaz de inibir reações de oxidação, que ocorrem devido à presença de radicais livres, principalmente na forma

de oxigênio, que são altamente reativos e causam a degradação de materiais e tecidos, animal ou vegetal (PISOSCHI; NEGULESCU, 2012). O excesso de radicais livres no organismo é combatido por antioxidantes produzidos pelo corpo ou absorvidos da dieta (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006) e estes radicais podem estar associados a diversas doenças quando os fatores endógenos não são capazes de controlar e oferecer proteção completa do organismo contra espécies de oxigênio reativas (ROY & KULKARNI, 1996; STAHL & SIES, 1997).

Dessa forma, agentes exógenos com capacidade antioxidante, isto é, com capacidade de doar átomos de hidrogênio ou elétrons, transformando os radicais em substâncias estáveis, ou então através da ligação à íons metálicos, conversão de hidroperóxidos em espécies não-reativas ou absorção de radiação ultravioleta, podem ser utilizados para atenuar os malefícios da presença dos radicais livres nos organismos vivos.

Estudos realizados por Torres-Alvarez (2017) mostraram dados interessantes em que o óleo essencial de laranja apresentou maior atividade antioxidante em situações em que foi concentrado com auxílio de uma coluna de destilação, pois nesse caso a concentração do *R*-limoneno diminuiu ao mesmo tempo em que a concentração dos compostos em menor quantidade foi aumentada, ou seja, o óleo puro apresentou atividade antioxidante inferior devido a alta concentração do monoterpeno *R*-limoneno.

Dessa forma, pensando no óleo essencial de laranja e no extrato aquoso como potencial aditivo alimentar, é interessante avaliar como essas matérias-primas se comportam frente a radicais livres, justificando ou não a possibilidade da sua aplicação para esse fim.

### 2.3 TOXICOLOGIA DE COMPOSTOS

Visando garantir a segurança da aplicação dos óleos essenciais e do extrato aquoso nas mais diversas áreas, faz-se necessário estudar a toxicidade dos compostos presentes nesses materiais. A avaliação da toxicidade de compostos em tecidos animais e vegetais tem por finalidade determinar possíveis efeitos biológicos que os esses materiais podem apresentar frente às células do corpo humano (VALADARES, 2006).

A previsão de toxicidade de determinados compostos inclui a verificação de efeito citotóxico, sendo este a capacidade de destruição de células, de genotoxicidade, dita como a capacidade de causar alterações genéticas nos organismos, além da mutagenicidade, caracterizada pela capacidade dos óleos de causar mutações aleatórias no organismo e a DL50, conhecida como a concentração necessária para apresentar letalidade a 50% dos indivíduos expostos àquele componente. Seu estudo pode ser feito por métodos *in silico*, *in vitro* e *in vivo*.

O estudo *in silico* consiste em previsões da toxicidade através ferramentas computacionais e modelos estatísticos, sendo uma ferramenta já reconhecida no campo farmacêutico (MATOS, 2015). Para isso, destaca-se a produção de ferramentas computacionais de avaliação preditiva da toxicidade, a partir da integração de avanços em informática e bioinformática, estatística, química computacional, biologia e toxicologia (FERREIRA *et al.*, 2018). As predições são realizadas a partir da estrutura do composto em questão e a partir disso podem ser aplicados testes computacionais medindo a energia de ligação entre potenciais ligantes e os alvos moleculares.

As estimativas de toxicidade computacional (*in silico*) não são apenas mais rápidas que a determinação de doses tóxicas em animais, mas também podem ajudar a reduzir a quantidade de experimentos em animais. Ainda, estas tecnologias *in silico* podem reduzir o custo do desenvolvimento de um nova substância e encurtar o tempo de trabalho dos pesquisadores (NETO, 2019).

Dentre as mais diversas plataformas existentes para a realização dessas predições, estão a Protox-II e a pkCSM. A primeira delas baseia-se em um total de 33 modelos para a previsão de vários pontos de extremidade toxicológica, como toxicidade aguda, hepatotoxicidade, citotoxicidade, carcinogenicidade, mutagenicidade, imunotoxicidade, além de apresentar a classificação toxicológica e a DL50 (BANERJEE *et al.*, 2018). Já a pkCSM baseia-se em assinaturas construídas a partir de gráficos, que codificam padrões de distância entre átomos e são usados para representar a molécula visando treinar modelos preditivos (PIRES *et al.*, 2015) e apresenta a toxicocinética da molécula no organismo, ou seja, apresenta suas formas de absorção, distribuição, biotransformação e excreção.

Estudos que utilizam a modelagem matemática para prever o comportamento de moléculas tem sido cada vez mais utilizados juntamente com técnicas já usuais para otimizar e orientar um desenvolvimento mais simplificado de fármacos, conforme descrito por WANG *et al* (2015). Exemplificam essa promissora aplicação os estudos realizados por Schrey *et al*, 2017 que utilizaram dados de inibição de crescimento de células sanguíneas de banco de dados e derivados da literatura para realizar ensaios de citotoxicidade em diferentes tipos de células imunes e encontraram resultados satisfatórios, mas mesmo assim não excluíram a necessidade de avaliações adicionais.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 MATÉRIA-PRIMA

A matéria-prima utilizada foi a laranja da espécie *Citrus sinensis*, denominada comercialmente de Laranja-pera, obtida diretamente em um supermercado localizado na cidade de Toledo – PR.

O extrato aquoso da casca de laranja obtido comercialmente foi adquirido na cidade de Toledo – PR e, segundo a embalagem, a espécie do qual esse extrato foi destilado é a *Citrus aurantium* e o mesmo foi obtido pelo método de arraste a vapor.

##### 3.1.1 Pré-processamento das matérias-primas

A matéria-prima utilizada para a obtenção do extrato aquoso de laranja foi a casca da fruta. Com isso, realizou-se o descasque de em média 10 laranjas da espécie selecionada com o cuidado de não prejudicar os bolsões nos quais as substâncias desejadas estão contidas. Por esse motivo, o descasque foi feito retirando junto com a casca uma fina camada do albedo.

Após realizado o descasque, a casca foi picada em tamanhos de aproximadamente 0,5 cm para aumentar a área da superfície de contato da casca com a água que fará a retirada do material, já que, segundo Geankoplis (1998) a redução do tamanho de uma amostra aumenta o rendimento na extração sólido-líquido.

A massa de cascas obtidas *in natura* foi pesada antes de dar início ao processo para posterior cálculo do rendimento.

##### 3.1.2 Teor de umidade da casca da laranja

Após o descasque, também foi separado cerca de 2,0 g da matéria-prima para análise de umidade da mesma, a qual foi determinada por termobalança de umidade por infravermelho (marca BEL Engineering), localizada no Laboratório de Alimentos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus de Toledo.

## 3.2 OBTENÇÃO DO EXTRATO AQUOSO DA CASCA DA LARANJA DA ESPÉCIE *CITRUS SINENSIS*

### 3.2.1 Obtenção do extrato aquoso sem a utilização de pré-tratamento com enzima

O extrato aquoso da casca da laranja *in natura* foi obtido pelo processo de hidrodestilação utilizando a vidraria de Clevenger. Assim, adicionou-se a matéria-prima previamente processada de cada extração em balão de fundo redondo com capacidade de 2000 mL e acrescentou-se em média de 1000 mL de água destilada. O balão foi acondicionado no interior de uma manta de aquecimento, e em seu bocal foi acoplada uma vidraria de Clevenger. Quando a mistura de água e biomassa entra em ebulição, os vapores de água e os voláteis são conduzidos em direção ao condensador, onde é realizada a troca de calor, condensando os vapores com a água de refrigeração e nessa etapa, podem ser visualizadas, no tubo separador do extrator, as formas líquidas do extrato aquoso e da água.

Abaixo do aparato de Clevenger foi posicionado um béquer para que fosse possível a retirada do hidrolato durante a extração. Durante o período de destilação, o extrato aquoso ficou acondicionado dentro da vidraria graduada do aparelho de Clevenger, para medição do volume obtido durante o processo. A Figura 6 ilustra a aparelhagem utilizada para a realização da extração.

Figura 6: Módulo para a obtenção do extrato aquoso da casca de laranja.



- (1) Balão de fundo redondo para acondicionamento da matéria-prima e da água destilada;
- (2) Manta de aquecimento;
- (3) Aparelho de Clevenger;
- (4) Condensador;
- (5) Béquer para recolhimento do hidrolato

Fonte: Autoria própria, 2019.



A extração do extrato durou em média 1 hora e, por ter densidade inferior à da água, ficou separado na parte superior do meio aquoso, podendo dessa maneira ser separado da água e armazenado em frasco âmbar. Por fim, este frasco foi acondicionado dentro de um freezer até a realização das análises.

### 3.2.2 Obtenção do extrato aquoso com a utilização de enzimas

Para realizar a extração com a utilização de enzimas utilizou-se o equivalente a 0,1% da massa de matéria-prima vegetal das enzimas celulase e hemicelulase da Sigma-Aldrich, sendo a primeira delas obtida de *T. reesi* e a segunda de *A. niger*, sendo que cada uma delas foi utilizada para extrações distintas. Após adicionar a matriz vegetal e a água destilada ao balão de fundo redondo, conforme ilustrado pela Figura 7, adicionou-se a enzima correspondente, aqueceu-se até 50°C e aferiu-se o pH para verificar a necessidade de adequação do mesmo, já que a temperatura de maior atividade das enzimas está na faixa de 50 - 55°C e o pH ótimo é igual a 5 (BALSAN, 2011, MAGALHÃES, 2005, SOWBHAGYA, *et al.*, 2009). Após duas horas nessas condições, tempo médio utilizado para o tratamento enzimático, de acordo com Cassini (2010), deu-se início a extração pelo método convencional de hidrodestilação, conforme descrito em 3.2.1.

Figura 7: Tratamento pré-enzimático da matéria-prima vegetal



Fonte: Autoria própria.

### 3.3 ANÁLISES QUÍMICAS E FÍSICAS

#### 3.3.1 Rendimento (%)

Para o cálculo do rendimento em base seca, foi utilizada a Equação 01, adaptada de Girard, Koehler e Netto (2007), tanto para a extração convencional, como para as extrações com pré-tratamento enzimático:

$$R(\%) = \frac{M_o}{M_s} * 100 \quad (1)$$

Em que:

$R(\%)$ : representa o rendimento do extrato aquoso obtido em porcentagem;

$M_o$  é a massa de extrato obtido experimentalmente, em g;

$M_s$  é a massa da matéria-prima em base seca, em g.

#### 3.3.2 Análises qualitativas

##### 3.3.2.1 Massa específica

Para a determinação da massa específica é possível utilizar materiais como um picnômetro ou micropipetas. Sabendo da pequena quantidade de extrato ou óleo essencial que é geralmente obtida em cada extração, utilizou-se uma micropipeta de volume de 100 – 1000 uL previamente calibrada (marca Kasvibasic). Antes de prosseguir com a determinação da propriedade física, a calibração foi realizada utilizando água destilada, sendo pesada em balança analítica (marca Shimadzu AY220). As amostras foram pesadas em quadruplicata, e utilizou-se a média das massas obtidas para a determinação da densidade a partir da Equação 2.

$$\rho_{\text{óleo}} = \frac{m_{\text{óleo}}}{V_{\text{óleo}}} \quad (2)$$

Onde:

$\rho_{\text{óleo}}$ : é a massa específica do extrato aquoso em g/ml;

$m_{\text{óleo}}$ : é a massa pesada do extrato, em g;

$V_{\text{óleo}}$ : é o volume de óleo de acordo com a micropipeta utilizada, em ml.

### 3.3.2.2 Índice de refração

O refratômetro utilizado foi do tipo ABBE (marca DIGIT), calibrado inicialmente com água destilada e após, o índice de refração da amostra foi determinado através de leitura direta no refratômetro de acordo com a metodologia descrita pela norma NBR 5785 – Óleos essenciais – determinação do índice de refração (ABNT, 1985). A medição foi realizada em triplicata para melhor confiabilidade dos resultados obtidos.

### 3.3.3 Análise quantitativa

#### 3.3.3.1 Análise por Cromatografia Gasosa (CG/FID)

A análise quantitativa do extrato aquoso obtido da casca de laranja foi realizada na Central Analítica da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Campus Toledo e esteve baseada na metodologia proposta por Hussain *et al.* (2010) com algumas modificações. Ela foi realizada utilizando um cromatógrafo de fase gasosa com ionização de chama (CG/FID) (marca PerkinElmer, modelo Clarus 680), equipado com coluna capilar de sílica fundida (30 m x 0,25 mm d.i.) com fase estacionária Elite-5 (5% de difenil e 95% de dimetil polisiloxano) de 0,25 µm de espessura do filme; gás de arraste hidrogênio, ajustado para fornecer uma vazão de 1 mL min<sup>-1</sup>. As temperaturas do injetor e do detector foram de 220 °C e 250 °C, respectivamente, o tipo de injeção: com divisão de fluxo na razão de 1:40. Foi injetado 1,0 µL de uma solução (2,0 µL de óleo: 1,0 mL n-heptano). A temperatura do forno foi programada para 80 – 240 °C (4 °C min<sup>-1</sup>).

#### 3.3.3.2 Análise por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (CG/MS)

As amostras foram enviadas para o Laboratório de Análises CG/MS da Embrapa Agroindústria de Alimentos, localizado no Rio de Janeiro.

Alíquotas de 1,0 µL de uma solução a 0,1 % do extrato aquoso em hexano PA (Sigma- Aldrich), acrescida do padrão interno de octanoato de metila foram

injetadas em cromatógrafo Agilent 7890A, em injetor operando no modo com divisão de fluxo (split 1:20 ou 1:50) a 250 °C. Para a separação dos componentes foi utilizada coluna capilar com fase 5%-fenil-95%-metilsilicone (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm), com programação de temperatura de 60 a 240 °C com variação de 3 °C min<sup>-1</sup> e hidrogênio como gás carreador (1,5 mL min<sup>-1</sup>). A quantificação foi calculada a partir da área normalizada e corrigida (área %) de um detector de ionização por chama operando a 280 °C.

Para a identificação dos constituintes foi utilizado sistema acoplado de cromatografia em fase gasosa e espectrometria de massas Agilent 5973N, operando nas mesmas condições acima, mas empregando He (hélio) como gás carreador. A ionização eletrônica será utilizada para gerar íons. Os espectros obtidos foram comparados com os da Biblioteca Wiley 6th ed. Também foram calculados os índices de retenção linear utilizando-se mistura de *n*-alcanos (8 a 26 carbonos). Os índices calculados foram comparados com dados da literatura. Cada componente foi considerado o espectro de massas e se o índice de retenção tiverem sido compatíveis com os valores tabelados

### 3.4 ESTUDO DA DEGRADAÇÃO

#### 3.4.1 Fotodegradação

Para a análise da degradação do extrato aquoso perante a luz foi utilizado um fotorreator construído em madeira com lâmpada de mercúrio (Hg) de 100 W de potência sem o bulbo protetor. A lâmpada de Hg fornece irradiação tanto na região do UV quanto na região do visível conforme Vieira (2010). Com relação à lâmpada de vapor de mercúrio, a variação do comprimento de onda emitido abrange uma faixa de 404,7 nm a 623,4 nm, na faixa do visível, e tem uma emissão otimizada em 365 nm, essa no UV (ITA, 2008).

Para a verificação da degradação perante a luz, preparou-se uma solução de concentração de 5000 ppm (50 µL de extrato em 10 mL de hexano marca Anidrol). Durante os 100 min de exposição à luz, foram retiradas alíquotas da amostra a cada 20 min para verificação da degradação através do método de

espectrometria UV-VIS (PG INSTRUMENTS Ltda T80+), utilizando-se cubetas de quartzo a fim de se obter os espectros de absorção dos componentes presentes.

Também, deixou-se extrato puro exposto às mesmas condições para posterior avaliação utilizando o cromatógrafo a gás (CG/FID) para comprovação da degradação, já que, após degradado, a concentração do composto principal do extrato deverá diminuir.

Após transcorrida 1 h de exposição, foi retirada uma alíquota e preparada uma solução de 2,0 uL de extrato para 1,0 mL de heptano PA (Sigma-Aldrich) de pureza a nível de HPLC. Dessa solução injetou-se 1,0 uL no equipamento e realizou a análise conforme parâmetros já descritos no item 3.3.3.1. A mesma análise foi repetida com o extrato após 2 h de exposição à luz, a fim de comparar os resultados obtidos.

Todos os recipientes utilizados para armazenamento do extrato aquoso da casca da laranja durante o experimento foram devidamente vedados antes da exposição para evitar que os compostos presentes evaporassem.

### 3.5 ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

#### 3.5.1 Preparo do inóculo

Para a realização do experimento foram utilizados três cepas de microrganismos distintos, sendo dois deles gram positivos (*Bacillus subtilis* ATCC 19659 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923) e um gram negativo (*Escherichia coli* ATCC 25922). A cepa de *Bacillus subtilis* foi doada pela Indústria Farmacêutica Prati, Donaduzzi, localizada na cidade de Toledo – PR. As demais foram obtidas diretamente do Laboratório de Microbiologia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Campus Toledo.

Para a realização do experimento procedeu-se primeiramente com a padronização do inóculo. Assim utilizou-se o meio de *Mueller Hinton* (marca KASVI) para proporcionar o crescimento microbiológico e, após 18 horas de cultivo, foi realizada a leitura da absorbância do meio em Espectrofotômetro UV/Vis (marca Kasuaki, modelo IL-0082) no comprimento de onda de 600 nm. Após a leitura procedeu-se com a diluição do meio até que o mesmo atingisse o valor de 0,5 de

absorbância que equivale a  $1,5 \times 10^8$  células por mL, segundo a escala nefelométrica de *McFarland* (ANVISA, 2013).

### 3.5.2 Preparo do meio de cultivo

O meio de cultivo utilizado foi o ágar batata-dextrose (marca Merck) e antes da sua utilização foi esterilizado a 121,1 °C durante 15 min em autoclave (marca *Stermax Extra 21 Litros*), disponível no Laboratório de Microbiologia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Campus de Toledo.

### 3.5.3 Inoculação

A inoculação foi realizada pelo método de espalhamento em placa, adaptado do método já executado por Alves (2006). Uma quantidade de 100 uL de inóculo do microrganismo desejado previamente preparado conforme descrito no item 3.5.1 foi colocada sobre o meio já na placa de Petri e utilizou-se a alça de *Drigalski* para realizar o espalhamento.

Após, foram dispostos quatro discos de papel filtro de 6 mm de diâmetro sobre o meio, e, por fim, aplicou-se 10 uL de extrato aquoso da casca da laranja sobre cada disco para, após 24 h, avaliar a formação do halo de inibição.

Também, foi realizado o controle positivo, no qual foram utilizados dois antibióticos, Amoxicilina e Cefalexina, que foram preparados solução na concentração de 80 ppm. Por fim realizou-se o controle negativo, no qual as bactérias foram dispostas sem nenhum fator que pudesse impedir seu crescimento.

## 3.6 ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Os métodos utilizados para a determinação da atividade antioxidante podem ser baseados na captura de radicais livres ou na determinação da oxidação de determinada molécula.

Visando a obtenção de um método ainda não utilizado para a determinação da atividade antioxidante em óleos essenciais, adaptou-se o método proposto por Ruch, Cheng e Klauning (1989) para medir a captura de peróxido de hidrogênio e a

consequente atividade antioxidante dos extratos aquosos dos óleos essenciais de laranja em estudo.

O método desenvolvido pode ser dividido em quatro partes: o preparo da solução tampão, o preparo da solução tampão acrescida do peróxido de hidrogênio, o preparo das amostras e a análise das amostras.

- 1) O primeiro passo deu-se através do preparo de 1 L de solução tampão. Para isso, foram dissolvidos 20,8 g de fosfato dissódico heptahidratado ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) (marca Synth) em água deionizada (q.s.p.) e, depois, dissolveu-se 3,08 g de fosfato de sódio monoidratado ( $\text{NaHPO}_4$ ) (marca Synth) nesta primeira solução. O pH da solução foi aferido e ajustado para uma faixa de 7,3 e, então, completou-se o volume do balão volumétrico com água deionizada.
- 2) Após isso, preparou-se a solução composta pelo tampão e por peróxido de hidrogênio, medindo em volume o equivalente a 0,01 mol de peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) para 0,5 L da solução tampão, previamente preparada.
- 3) O preparo das amostras consistiu em, para cada extrato aquoso, dois tubos de ensaio, chamados de grupo de controle, dois tubos de ensaio chamados de branco e três tubos de ensaio contendo a amostra, chamado de amostras. O branco e o grupo de controle foram preparados em duplicata e a amostra foi preparada em triplicata, objetivando obter resultados mais precisos e confiáveis, visto que, é possível a degradação do peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ).  
Para o preparo da solução branco foram utilizados 0,1 mL da amostra de extrato com 0,9 mL da solução tampão sem peróxido de hidrogênio. Para o grupo de controle foram utilizados 0,1 mL de água deionizada com 0,9 mL da solução tampão com peróxido de hidrogênio e para os tubos de amostras foram utilizados 0,1 mL do extrato aquoso com 0,9 mL da solução tampão com peróxido de hidrogênio. Foram acrescidos a todas as soluções 0,1% de *Tween* 80 (Polisorbato 80) (marca Synth).
- 4) Feito isso, as amostras foram incubadas a 35°C, sem a presença de luz, por 30 min. Após a incubação, todas as amostras foram diluídas em 1:1000, em água deionizada, e realizou-se a leitura da absorbância das

mesmas à 230 nm (nanômetros) em um espectrofotômetro UV-VIS, (marca Kasuaki modelo IL-0082), disponibilizado UTFPR – Campus Toledo. O *baseline* (branco) do equipamento foi feito com água deionizada.

Analisou-se os resultados utilizando a Equação 3.

$$\%_{sequestro} = \frac{(abs1 - (abs3 - abs2))}{abs1} \quad (\text{Eq. 3})$$

Onde:

$\%_{sequestro}$ : corresponde a quantidade de peróxido de hidrogênio sequestrado e a consequente atividade antioxidante;

$abs1$ : corresponde a absorvância média do grupo de controle;

$abs2$ : corresponde a absorvância média do branco;

$abs3$ : corresponde absorvância média das amostras.

### 3.7 ANÁLISE DA TOXICIDADE *IN SILICO*

A análise *in silico* das principais substâncias contidas no extrato aquoso da casca da laranja foi realizada por duas diferentes plataformas a fim de se obter dados variados a respeito da toxicidade dos compostos majoritários do extrato aquoso obtido da casca de laranja.

Na plataforma Protox-II (BANERJEE *et al*, 2018), utilizou-se a representação estrutural das moléculas a serem analisadas como método de entrada, sendo elas:  $\alpha$ -pineno, sabineno, mirceno, octanal, *R*-limoneno e linalol. Para fornecer os resultados, essa plataforma contém um banco de dados e apresenta os resultados baseados em probabilidade de acontecimentos de ligação com um receptor específico, DL50, além da semelhança e precisão do teste baseando-se em moléculas já conhecidas.

A classificação do nível de toxicidade foi realizada de acordo com o previsto na Norma Técnica NBR 14725-2:2009 (ABNT, 2009), a qual classifica a toxicidade dos compostos de 1 a 5 considerando os valores DL50 por mg Kg<sup>-1</sup> de peso corpóreo, em relação à toxicidade aguda obtida experimentalmente, em categoria de perigo, para diferentes vias de exposição. Considerando a possível utilização do extrato aquoso como aditivo alimentar, considerou-se a via oral. Os dados utilizados como referência estão apresentados na Tabela 4.



Tabela 4: Valores referência para toxicidade aguda

Via de exposição	Categoria de classificação
Oral	$0 < \text{categoria } 1 \leq 5$
	$5 < \text{categoria } 2 \leq 50$
	$50 < \text{categoria } 3 \leq 300$
	$300 < \text{categoria } 4 \leq 2\,000$
	$2\,000 < \text{categoria } 5 \leq 5\,000$

Fonte: NBR 14725-2:2009

Já para a análise utilizando a plataforma pkCSM (PIRES, ASCHER, 2015) a inserção da molécula na plataforma foi realizada através da geração de SMILES, pelo *software ChemSketch*, na versão livre. Selecionou-se todas as opções disponíveis em relação à toxicocinética para análise das moléculas de interesse, sendo elas a solubilidade em água, absorção, distribuição, excreção e a MRTD (dose máxima diária tolerada). Os resultados obtidos foram analisados e comparados entre as plataformas.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 TEOR DE UMIDADE E RENDIMENTO (%)

Antes de proceder com a extração do extrato aquoso da casca de laranja da espécie *Citrus sinensis*, o teor de umidade das cascas foi determinado em análise única.

O rendimento pode ser determinado utilizando a massa da matéria-prima vegetal em base seca ou em base úmida. Esta última é considerada imprecisa, pois não apresenta repetibilidade e poderá induzir a desvios ao não considerar a verdadeira quantidade de biomassa utilizada para a extração (SANTOS *et al*, 2004). Dessa, forma, procedeu-se com o cálculo em base seca.

A Tabela 5 demonstra os valores obtidos para a umidade da casca e o rendimento de cada extração.

Tabela 5: Dados das extrações aquosas da casca de laranja da espécie *Citrus sinensis*.

Extração	Massa das cascas (g)	Umidade	Massa das cascas em base seca (g)	Volume obtido de extrato (ml)	Rendimento após 1 hora de extração	Desvio padrão
1 <sup>a</sup>	96,0	71,1 %	27,74	0,3	0,93%	
2 <sup>a</sup>	558,0	75,0 %	139,50	2,5	1,55%	0,28
3 <sup>a</sup>	580,0	54,3 %	265,06	3,0	0,98%	
Média de rendimento					1,15%	

Fonte: Autoria própria.

Segundo Surburg e Panten (2006), a porcentagem de óleo essencial extraída de materiais naturais varia entre 0,01% e 5%. Para o extrato aquoso da casca de laranja obtido por hidrodestilação, autores encontraram rendimentos que variam de 1,8 a 2,3% (LIMA, PLACEDES e CARDOSO, 2019). O valor médio de rendimento obtido nessas extrações ficou um pouco inferior, sendo igual a 1,15%, com desvio padrão de 0,28 e coeficiente de variação igual a 24,38%. Esse alto valor do coeficiente de variação indica que os dados são pouco homogêneos, já que é aceitável um valor entre 20 e 30% para qualificar esse atributo como alto, segundo

Gomes (1990). Entretanto, ainda é possível considerar esses valores de rendimento satisfatórios, já que há muitos fatores que podem influenciar no seu valor, como a espécie de laranja utilizada, época de colheita do fruto e nível de maturação (SILVA *et al.*, 2003; SANTOS *et al.*, 2004).

A mesma avaliação foi realizada após o tratamento preliminar com as enzimas celulase e hemicelulase. Os dados demonstrados na Tabela 6 foram obtidos utilizando 0,1% de massa de enzima em relação à massa de matéria prima, com duas horas de tratamento enzimático na temperatura de 50°C e pH 5,0.

Tabela 6: Umidade da casca e cálculo dos rendimentos das extrações após tratamento enzimático.

Enzima	Massa das cascas (g)	Umidade	Massa das cascas em base seca (g)	Volume obtido (ml)	Rendimento após 1 hora de extração	Desvio Padrão
<b>Celulase</b>	524,0	80,8 %	100,61	2,1	1,80%	0,01
<b>Hemicelulase</b>	408,0	72,4 %	112,68	2,0	1,77%	

Fonte: Autoria própria.

De acordo com a Tabela 6, é possível observar um rendimento superior ao encontrado na extração sem esse tratamento primário. Segundo Rosenthal, Pyle e Niranjana (1996), as extrações obtidas com o uso de enzimas podem produzir maiores rendimentos em óleo em comparação com outros métodos porque elas têm a capacidade de romper a parede celular do vegetal e liberar o material para o meio aquoso.

Quando comparado à média do rendimento obtido nas três extrações em que não foi utilizado nenhum pré-tratamento, houve um aumento de 56% com a utilização da celulase e 53,9% com a utilização da hemicelulase, o que evidencia a eficácia da extração com a utilização de enzimas, e, mesmo o experimento tendo sido realizado uma única vez, corrobora com os dados apresentados por Vilhena (2013), que comparou o rendimento obtido com outros métodos de extração e obteve os maiores rendimentos utilizando enzimas.

## 4.2 ANÁLISES FÍSICAS

### 4.2.1 Massa específica

Após a calibração com água destilada, utilizou-se uma micropipeta de volume conhecido e igual a 100 uL para, ao pesar a quantidade de água e de extrato que representa esse volume, ser possível determinar a sua massa específica.

Para o extrato aquoso da espécie *Citrus aurantium* e para o extrato aquoso da espécie *Citrus sinensis*, as massas obtidas estão representado pela Tabela 7, onde M1 representa a massa obtida na primeira medição, M2 representa a massa obtida na segunda medição, e assim sucessivamente:

Tabela 7: Massas de extrato obtidas no volume de 100 uL

Espécie	M1(g)	M2(g)	M3(g)	M4(g)	Média	Desvio Padrão	Coefficiente de Variação (%)
<i>Citrus aurantium</i>	0,0872	0,0865	0,0851	0,0847	0,0859	0,0010	1,18
<i>Citrus sinensis</i>	0,0886	0,0841	0,0856	0,0873	0,0864	0,0017	1,96

Fonte: Autoria própria.

Ao realizar a análise estatística dos valores das massas obtidas no volume de 100 uL é possível concluir que os mesmos são homogêneos devido ao baixo desvio padrão (DP) e baixo coeficiente de variação (CV) (inferior a 10%) (GOMES, 1990).

Utilizando as médias das massas obtidas, sabendo o volume que é igual a 100 uL é possível aplicar a Equação 2. Com isso, obteve-se o valor da massa específica de 0,859 g mL<sup>-1</sup> para o extrato aquoso de *Citrus aurantium* e de 0,864 g mL<sup>-1</sup> para o extrato aquoso da *Citrus sinensis*. Segundo a Farmacopeia Europeia (2014), o valor da densidade do óleo essencial de laranja está entre 0,842 e 0,850 g mL<sup>-1</sup>, sendo possível dizer que os valores obtidos experimentalmente para os extratos estão bem próximos aos dados dos óleos encontrados na literatura.

#### 4.2.2 Índice de refração

O índice de refração indica quanto o feixe de luz, ao passar pelo material que está sendo analisado, é refratado em relação ao seu percurso original no vácuo, sendo, portanto, característico para cada tipo de material. Devido à presença ou a ausência de compostos na composição dos óleos essenciais e no seu extrato, o índice de refração se alterará, pois irão refletir a luz emitida de diferentes formas alterando o índice analisado (MORAES, 2012). Portanto, esse parâmetro é importante de ser avaliado visto que produtos sintéticos ou adulterados possuem índices de refração distintos do especificado, ou seja, através dele é possível comprovar a pureza do material avaliado.

Esse parâmetro foi medido em triplicata para o extrato aquoso da espécie *Citrus sinensis* obtido em laboratório e para o extrato da espécie *Citrus aurantium*. Para ambos o índice de refração observado foi de 1,471 nas três medições. Segundo que, na ficha técnica do óleo essencial de laranja disponível na Farmacopeia Europeia (2014), o valor do índice de refração fica na faixa de 1,470 até 1,476, o que indica mais uma vez a semelhança entre o óleo essencial e o extrato aquoso obtido da casca de laranja em relação as suas propriedades físico-químicas.

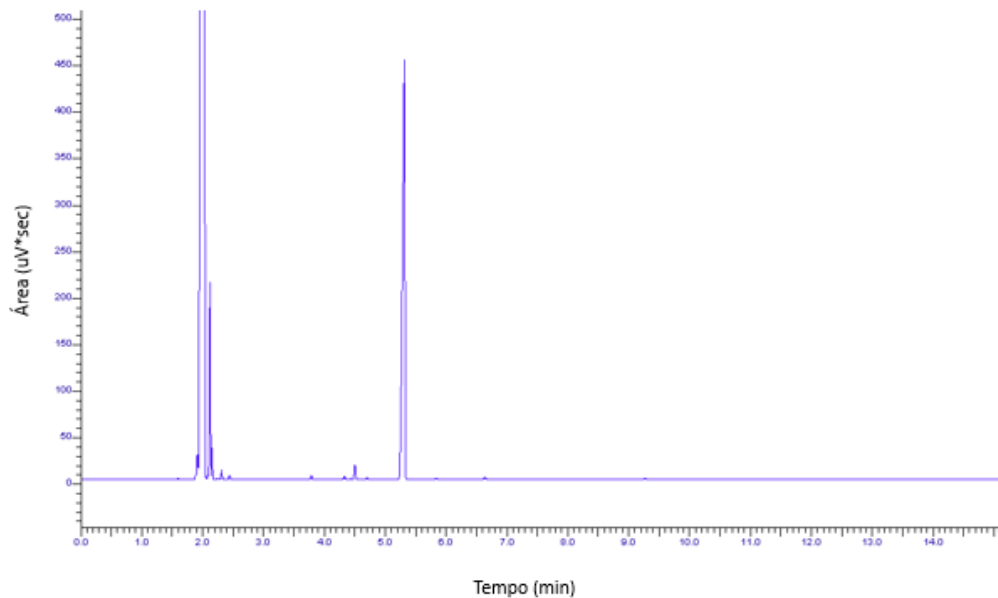
Valores próximos a esses também foram encontrados nas pesquisas realizadas por Medeiros (2013) e Leão (2015), nas quais foram avaliados os compostos obtidos da casca de laranja por um sistema híbrido de evaporação e pela hidrodestilação, respectivamente.

### 4.3 ANÁLISE QUANTITATIVA

#### 4.3.1 Análise por CG/FID

A análise quantitativa realizada pelo cromatógrafo de fase gasosa com ionização de chama (CG/FID) do extrato aquoso da laranja adquirido no comércio local da espécie *Citrus aurantium* está representado na Figura 8.

Figura 8: Cromatograma do extrato de *Citrus aurantium*



Fonte: Autoria própria

O cromatograma representado pela Figura 8 indica que ao analisar o extrato aquoso da espécie *Citrus aurantium*, o pico mais significativo foi encontrado em 5 min e 31 seg. Segundo o programa do equipamento, esse pico possui uma área de 1224664 uV\*sec. Segundo própria embalagem da empresa produtora da qual foi realizada a compra do material, os principais compostos do extrato são apresentados pela Tabela 8.

Tabela 8: Composição do extrato aquoso de *Citrus aurantium*

Composto	Presença (%)
Limoneno ( <i>R</i> -limoneno)	90
Mirceno	1,3 – 5,5
<i>cis</i> e <i>trans</i> – $\beta$ -ocimenos	1 – 3%

Fonte: Embalagem do material.

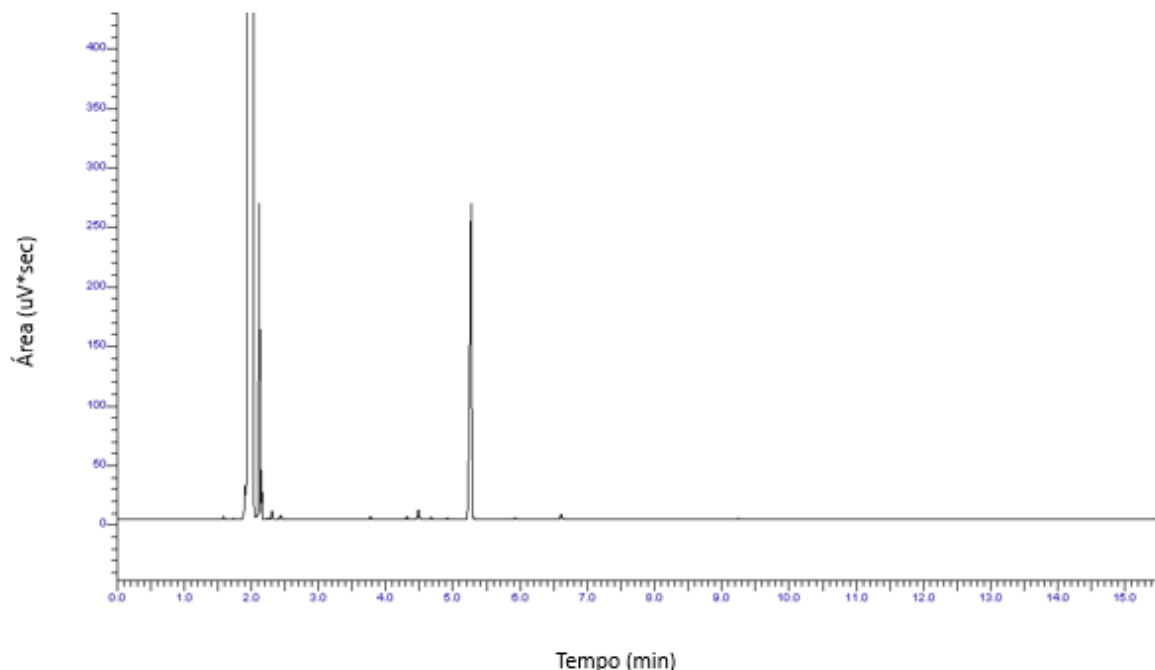
Levando os dados revelados pelo cromatograma em consideração e comparando-os com a composição fornecida pela indústria produtora do material em questão representado na Tabela 8, é possível sugerir que o pico de maior concentração seja representativo do *R*-limoneno.

Além disso, a embalagem do extrato proveniente da empresa Bysâmia – Bem Estar em Gotas descreve que também podem estar presentes compostos como

álcoois monoterpênicos (linalol,  $\alpha$ -terpineol, nerol, geraniol, citrionelol), acetatos de geraniol, nerol, citrionelilo e linalino; aldeídos (neral, citrionelal, geraniol, undecanal, decanal e nonanal); cumarinas e furanocumarinas voláteis (aurapteno, auraptenol, bergapteno, bergaptol, escoparona, citropteno); flavonoides, pectina, resina amarga, ácido cítrico, ascórbico e málico (frutos), açúcares do fruto (sacarose, dextrose e levulosa).

Já o cromatograma representado pela Figura 9 indica que foram encontrados resultados semelhantes aos já revelados pela Figura 8, mas agora para o extrato aquoso da casca da laranja da espécie *Citrus sinensis* destilado no laboratório. Na Figura 9, o maior pico foi em 5 min e 27 seg, valor esse muito próximo ao encontrado para a outra amostra. A área relativa a esse pico foi de 564112  $\mu\text{V}\cdot\text{sec}$ , sendo esse valor inferior ao obtido para o extrato da espécie *Citrus aurantium*.

Figura 9: Cromatograma do extrato extraído de *Citrus sinensis*



Fonte: Autoria própria.

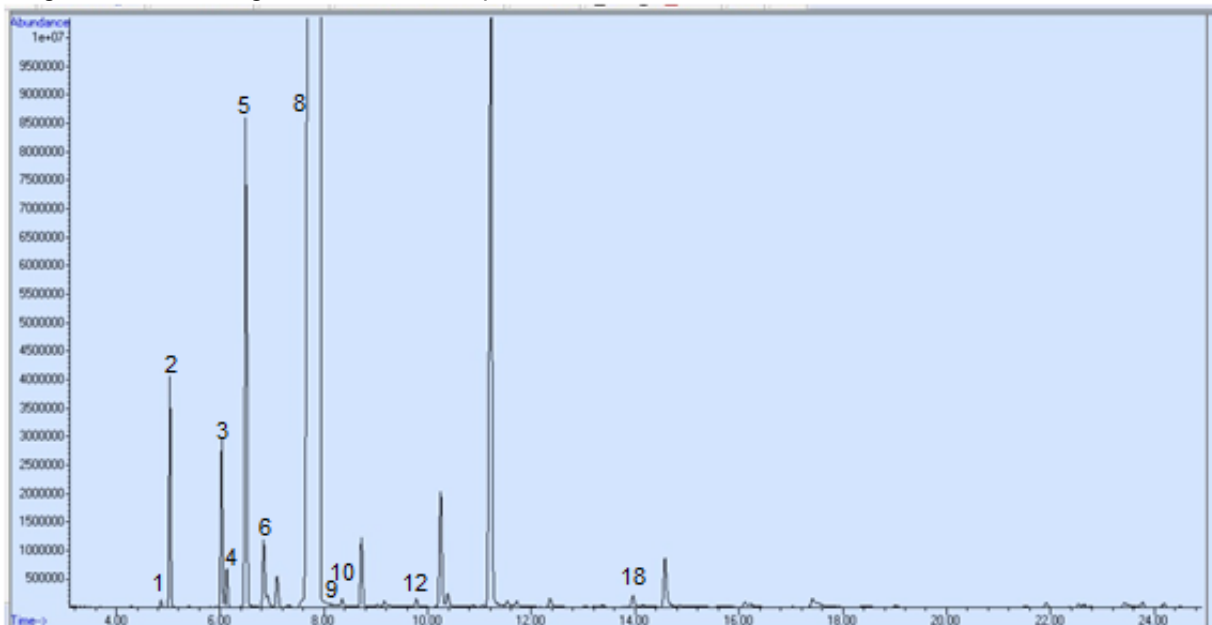
A partir de uma análise comparativa dos dois cromatogramas obtidos é possível sugerir que o pico de maior concentração e conseqüentemente, o composto de maior concentração é o *R*-limoneno.

Autores como Njoroge *et al* (2005), Gomes *et al* (2010) e Chen *et al* (2014) também já evidenciaram a supremacia do *R*-limoneno em relação aos demais compostos presentes no óleo e no extrato obtido das cascas de laranja, entretanto, para comprovar a composição majoritária de *R*-limoneno nos extratos aquosos obtidos neste trabalho, bem como os outros compostos ali presentes, realizou-se a análise em CG/MS. Os dados estão dispostos no item a seguir.

#### 4.3.2 Análise por CG/MS

Os resultados obtidos da análise por CG/MS estão demonstrados nas Figuras 10 e 11, sendo a primeira delas referente à análise do extrato aquoso da casca de laranja da espécie *Citrus aurantium* comercial e a outra da espécie *Citrus sinensis* destilado. Ambas demonstram um pico que se sobressaiu aos demais na análise dos dois extratos.

Figura 10: Cromatograma do extrato aquoso de *Citrus aurantium*



Fonte: Autoria própria.

As Tabela 9 revela as quantidades de cada composto identificado presente no extrato.



Tabela 9: Resultado do CG-MS para o extrato aquoso de *Citrus aurantium*

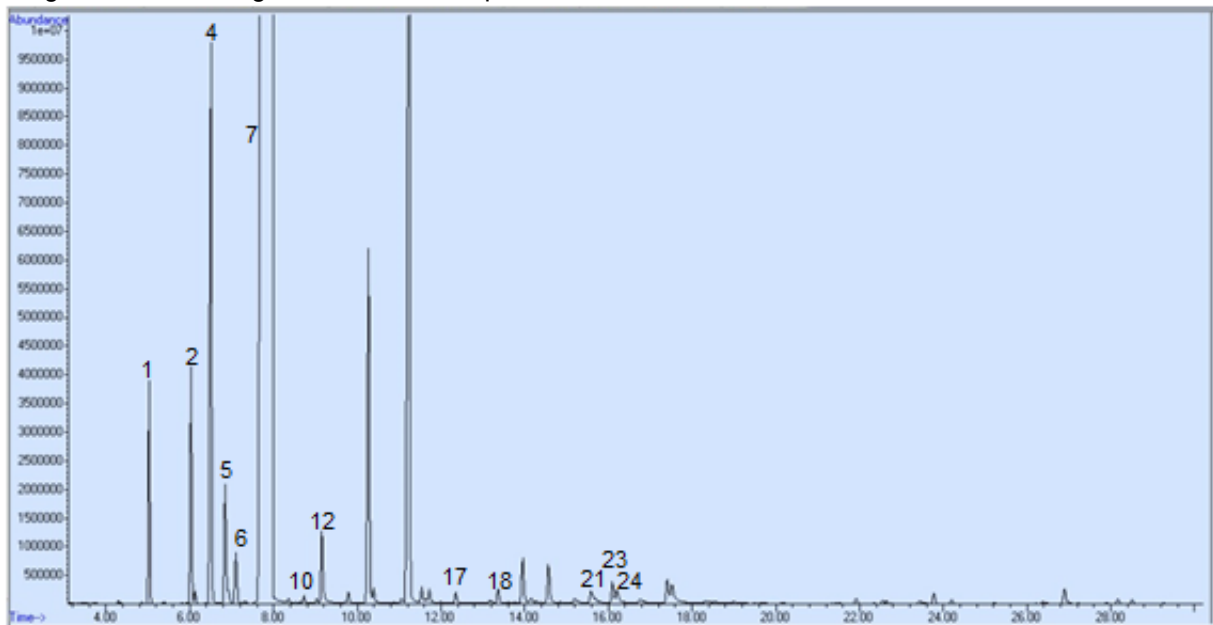
Pico	Composto	Tempo de retenção (min)	IRLe	IRLI	Área %
1	$\alpha$ -tujeno	4,409	925	924	0,0
2	$\alpha$ -pineno	4,561	932	932	0,6
3	sabineno	5,482	972	969	0,5
4	$\beta$ -pineno	5,573	976	974	0,1
5	mirceno	5,918	991	988	1,9
6	octanal	6,271	1004	998	0,3
8	limoneno	7,205	1032	1024	95,4
9	E- $\beta$ -ocimeno	7,663	1046	1044	0,0
10	$\gamma$ -terpineno	8,003	1056	1054	0,2
11	terpenoleno	9,024	1087	1086	0,0
12	linalol	9,472	1100	1095	0,4
13	nonanal	9,647	1104	1100	0,1
18	decanal	13,687	1204	1201	0,2
Total					99,7

Fonte: Autoria própria.

Na Tabela 9, IRLI corresponde ao índice de retenção linear presente na literatura. O IRLe corresponde ao índice de retenção linear experimental e RT é o tempo de retenção. Os picos que não estão apresentados nessa tabela são aqueles que não foram possíveis de identificar ou quantificar. Os picos representados pelos números 1, 9 e 11 da Figura 10 resultaram em valores extremamente pequenos e, por esse motivo, foram arredondados pelo próprio programa que calcula as áreas para o valor zero.

De acordo com os dados apresentados evidencia-se o *R*-limoneno como sendo a substância de maior presença, sendo que corresponde a 95,4% da composição do extrato aquoso da espécie *Citrus aurantium*.

Já para o extrato aquoso da espécie *Citrus sinensis* extraído no laboratório, encontrou-se o mesmo pico majoritário, porém em intensidade relativamente menor, o que indica menor concentração de *R*-limoneno na amostra, como apresentado na Figura 11.

Figura 11: Cromatograma do extrato aquoso de *Citrus sinensis*

Fonte: Autoria própria.

Na Tabela 10, apresenta-se a composição obtida para essa espécie e, novamente, o IRLI corresponde ao índice de retenção linear presente na literatura, o IRL<sub>e</sub> corresponde ao índice de retenção linear experimental e o RT é o tempo de retenção. Os picos que não estão apresentados nessa tabela são aqueles que não foram possíveis de identificar ou quantificar. Novamente, alguns picos resultaram em uma área igual a zero, ou seja, foram quantificados, mas com uma área muito pequena e tiveram seu valor arredondado pelo *software*.

Tabela 10: Resultado do CG-MS para o extrato aquoso da espécie *Citrus sinensis*

Pico	Composto	Tempo de retenção (min)	IRLe	IRLI	Área %
1	α-pineno	4,561	932	932	0,4
2	sabineno	5,481	972	969	0,5
3	β-pineno	5,574	976	974	0,0
4	mirreno	5,919	991	988	1,8
5	octanal	6,264	1004	998	0,4
6	σ-3-careno	6,475	1010	1008	0,2
7	limoneno	7,237	1033	1024	94,2
8	γ-terpineno	8,009	1056	1054	0,0
10	octanol	8,444	1069	1063	0,2
12	linalol	9,476	1100	1095	1,1
14	cis-oxido de limoneno	10,736	1131	1132	0,0

(continuação)

15	trans-óxido de limoneno	10,913	1136	1137	0,0
16	citronelal	11,540	1151	1148	0,0
17	terpinen-4-ol	12,482	1175	1174	0,1
18	$\alpha$ -terpineol	13,038	1188	1186	0,1
19	decanal	13,677	1204	1201	0,1
21	neral	15,196	1239	1235	0,1
22	carvona	15,288	1241	1269	0,0
23	geranial	16,484	1269	1264	0,1
24	aldeído perila	16,556	1271	1269	0,1
Total					99,4

Fonte: Autoria própria.

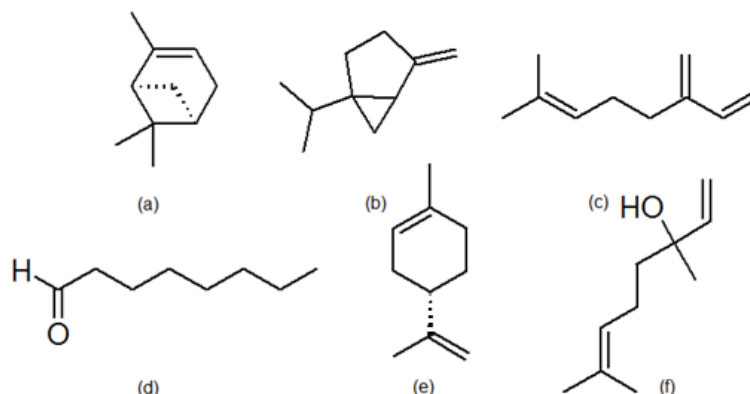
Pelos dados expostos na Tabela 10, é possível evidenciar a presença majoritária do *R*-limoneno que representou 94,2 % da composição total do extrato analisado. Ainda, encontrou-se compostos como o linalol e o mircenol com quantidades significativas quando comparado aos demais compostos presentes.

Dessa forma, avaliando os resultados das análises de CG-MS representados nas Tabelas 9 e 10 é possível verificar que há a diferença entre a composição dos extratos aquosos das duas espécies avaliadas, sendo o mais relevante nesse caso o linalol que para o extrato da espécie *Citrus aurantium* apresentou composição de 0,4% e para a espécie *Citrus sinensis*, o valor foi de 1,1%. Essa diferença pode afetar diretamente as propriedades dos compostos. O composto majoritário permanece sendo o *R*-limoneno em ambos os extratos avaliados, mas, como já citado, a composição pode variar de acordo com a espécie de laranja utilizada, o método de extração, época de colheita e nível de maturação do fruto, o que explica a composição diferente encontrada nas duas espécies estudadas.

Ainda assim, a composição revelada pela análise CG/MS de ambos os extratos está semelhante a já relatada por autores como Njoroge *et al* (2005), e Chen *et al* (2014), os quais quantificaram e qualificaram os compostos presentes nos óleos obtidos da casca de laranja.

Os principais compostos encontrados neste trabalho, ou seja, aqueles que possuem uma porcentagem mais significativa em ambos os extratos estão apresentados na Figura 12 e serão os compostos utilizados para análises posteriores.

Figura 12: Estrutura química dos principais componentes dos extratos aquosos de laranja: (a)  $\alpha$ -pineno; (b) sabineno; (c) mircenol; (d) octanal; (e) R-limoneno e (f) linalol.



Fonte: Autoria própria.

#### 4.4 ESTUDO DA DEGRADAÇÃO

A degradação de óleos essenciais e dos seus extratos pode ser verificada por vários métodos e entre eles está a espectrofotometria ultravioleta e visível (UV-Vis) que é um dos métodos analíticos mais utilizados nas determinações analíticas em diversas áreas. É aplicada tanto para determinação de compostos inorgânicos como para compostos orgânicos (HOLLER, SKOOG; CROUCH, 2009), já que a absorção da radiação visível e ultravioleta depende do número e do arranjo dos elétrons nas moléculas ou íons absorventes. Como consequência, o pico de absorção pode ser correlacionado com o tipo de ligação que existe na espécie que está sendo estudada (GOMES, 2015).

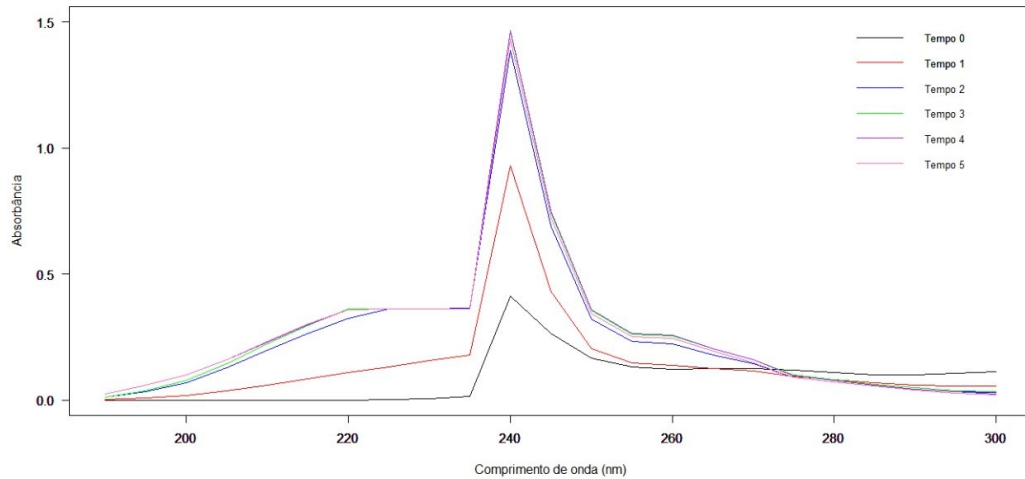
A espectrofotometria de absorção é baseada na medida de transmitância ou de absorbância de soluções contidas em suportes transparentes com caminho óptico conhecido. A quantidade de energia absorvida é proporcional à concentração da espécie na solução, conforme a lei de *Beer-Lambert* (GOMES *et al*, 2008). Com isso, as duas metodologias foram utilizadas para o estudo da degradação perante a luz.

##### 4.4.1 Fotodegradação

A degradação por meio da exposição à luz pode ser observada a partir dos espectros formados com as amostras submetidas a degradação pelo tempo total de

duas horas. Por meio da Figura 13 e da Tabela 11, é possível observar que o comprimento de onda do máximo de absorção ( $\lambda_{\text{máx}}$ ) encontra-se em 240 nm.

Figura 13: Acompanhamento da fotodegradação do extrato aquoso de *Citrus aurantium* pelo método Uv-Vis.



Fonte: Autoria própria.

Tabela 11: Evolução da absorbância com a fotodegradação do extrato aquoso de *Citrus aurantium*

Tempo (minutos)	Absorbância
Inicial	0,412
20	0,929
40	1,388
60	1,463
80	1,466
100	1,431

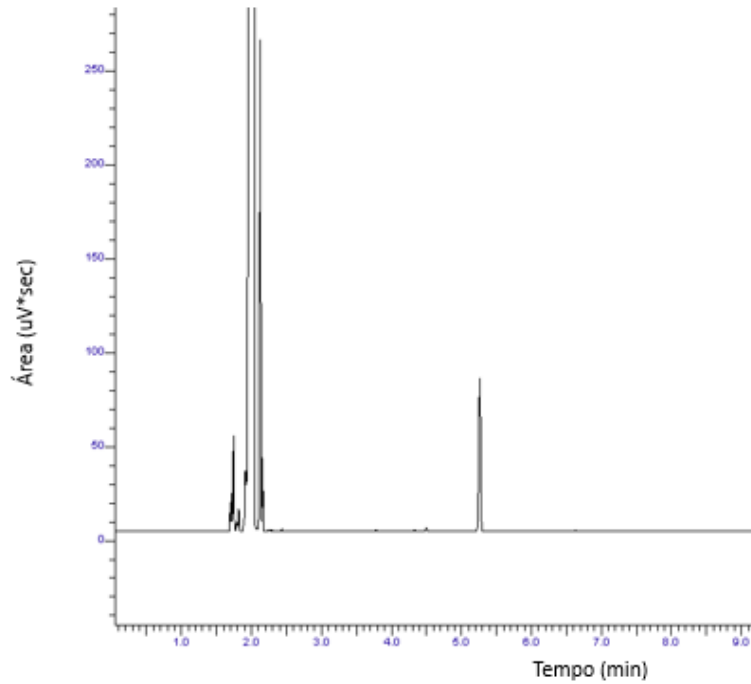
Fonte: Autoria própria.

Pelos dados apresentados é possível observar que a absorbância da amostra aumentou à medida que o extrato ficava mais tempo exposto à luz, sendo que apresentou seu valor máximo após 80 minutos de exposição.

O comportamento esperado é uma redução da absorbância à medida que o extrato aquoso ou que o óleo é degradado, visto que reduziria a quantidade presente do principal composto. Dessa forma, como ocorreu exatamente o contrário realizou-se a análise do extrato aquoso degradado também por CG/FID, utilizando as mesmas condições já citadas no item 3.3.3.1. Os cromatogramas apresentados a

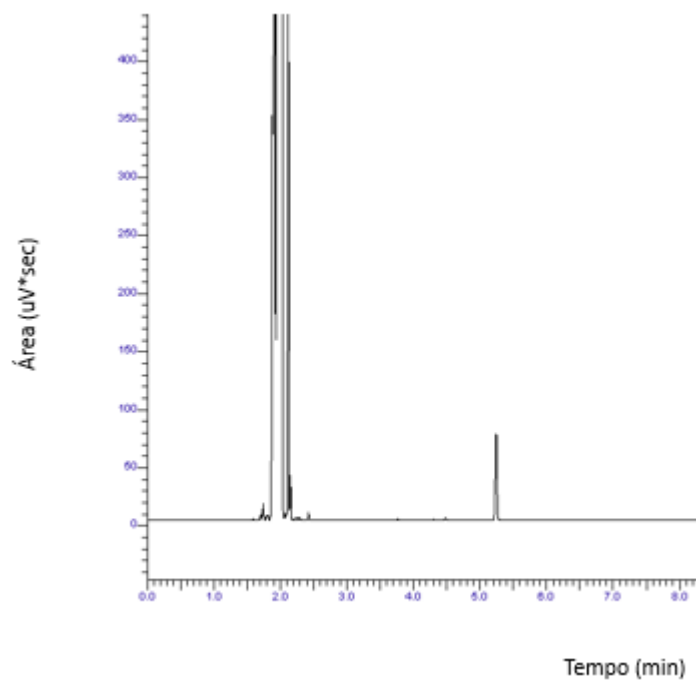
seguir (Figuras 14 e 15) correspondem aos resultados dessas análises, respectivamente.

Figura 14: Pico do composto principal da *Citrus aurantium* após uma hora de degradação



Fonte: Autoria própria.

Figura 15: Pico do composto principal da *Citrus aurantium* após duas horas de degradação

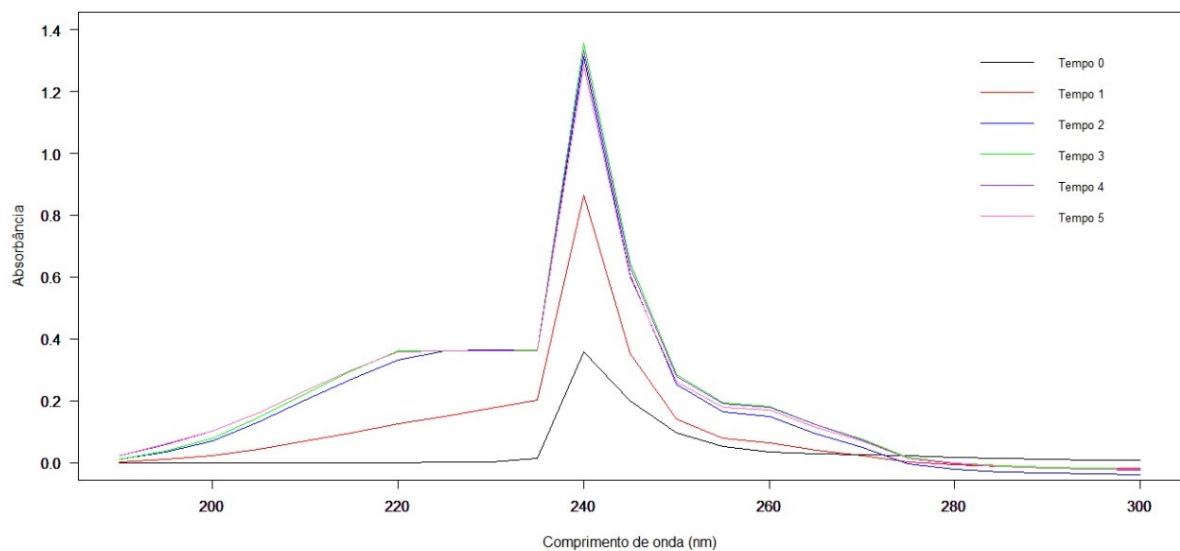


Fonte: Autoria própria.

Analisando os cromatogramas é possível evidenciar que após 1 h de degradação ocorreu uma brusca redução na área do componente principal do extrato aquoso de *Citrus aurantium*, já que a área resultou em 146427 uV\*sec e após 2 h de degradação ficou em 130533 uV\*sec, o que comprova que o mesmo foi degradado. Esses valores representam uma redução de 88% e 89,35% da área do pico, respectivamente. Sabe-se que a área é diretamente proporcional a concentração do composto, ou seja, quando a área diminui, a concentração diminui também.

As análises foram repetidas para o extrato da espécie *Citrus sinensis* e estão representadas pela Figura 16 e pela Tabela 12.

Figura 16: Acompanhamento da fotodegradação do extrato aquoso de *Citrus sinensis* pelo método UV-Vis



Fonte: Autoria própria.

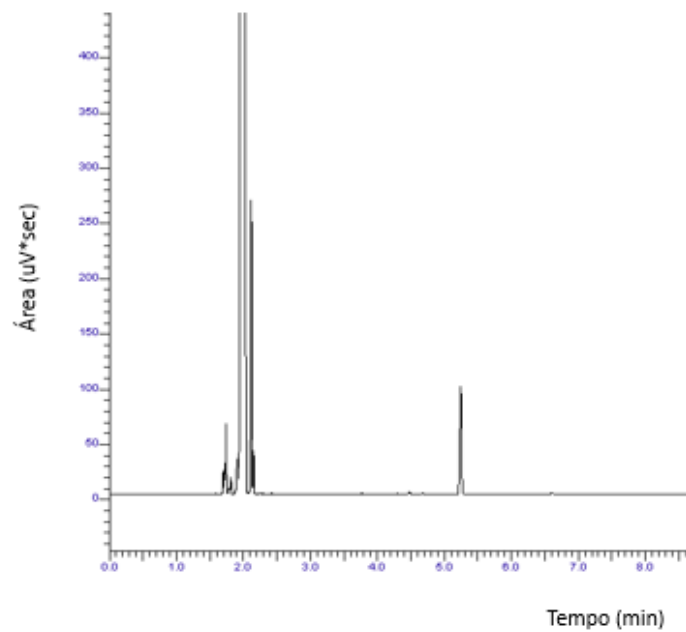
Tabela 12: Evolução da absorvância com a fotodegradação do extrato aquoso da espécie *Citrus sinensis*

Tempo (minutos)	Absorvância
Inicial	0,358
20	0,865
40	1,311
60	1,356
80	1,332
100	1,282

Fonte: Autoria própria.

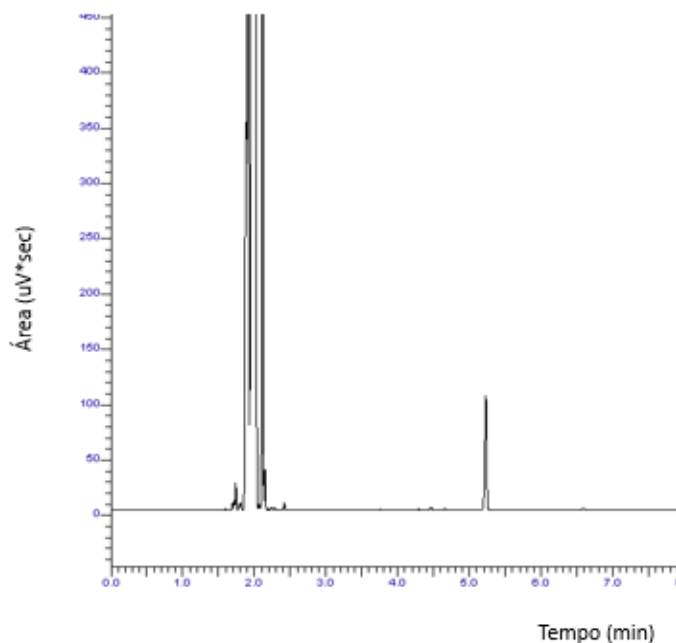
Novamente a absorvância aumentou conforme a degradação acontecia, tendo seu valor máximo obtido após 60 minutos de exposição à luz. Assim, fez-se também a análise no cromatógrafo a gás. Os cromatogramas obtidos após uma hora e após duas horas de exposição a luz estão representados nas Figuras 17 e 18, respectivamente.

Figura 17: Pico do composto principal da *Citrus sinensis* após uma hora de degradação



Fonte: Autoria própria.

Figura 18: Pico do composto principal da *Citrus sinensis* após duas horas de degradação



Fonte: Autoria própria.



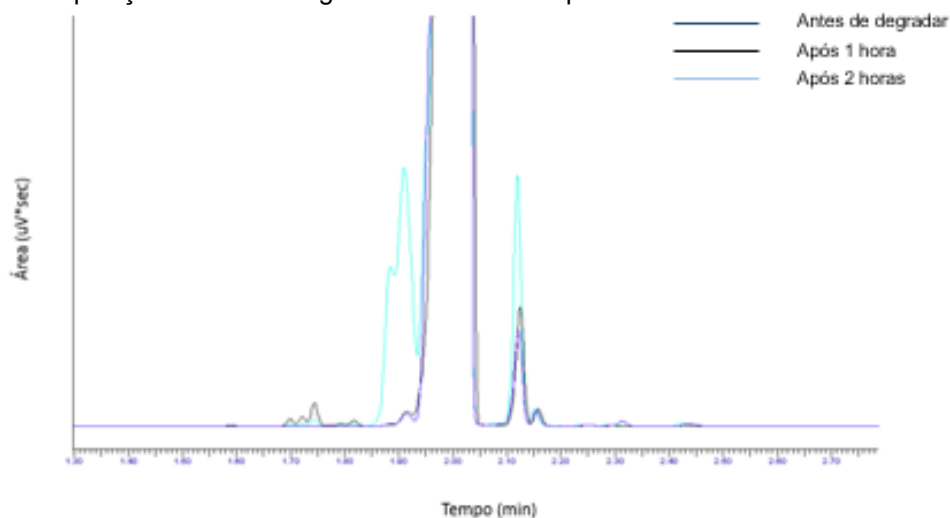
Analisando os cromatogramas é possível evidenciar que novamente o extrato foi degradado, visto que a redução da área do composto principal foi significativa. Após uma hora de degradação a área resultou em 175572 uV\*sec, o que equivale a uma redução de aproximadamente 69% e após duas horas de degradação a área resultou em 186234 uV\*sec, o que representa uma redução de 66 % quando comparada a área inicial do composto não degradado.

A suposição de ocorrência de evaporação dos compostos que poderiam ocasionar a diminuição da concentração dos compostos do extrato aquoso pode ser descartada visto que a temperatura da amostra foi controlada utilizando termômetro de mercúrio, e a mesma não ultrapassou 60°C e, os recipientes utilizados para acondicionamento das amostras durante os experimentos foram devidamente vedados para evitar a ocorrência desse risco.

Ao sobrepor os cromatogramas obtidos dos extratos sem degradar e após a degradação, representados pelas Figuras 19 e 20, é possível notar a diferença e o surgimento de alguns picos antes inexistentes. Esse é um indício de que pode estar formando outros compostos que são absorvidos no mesmo comprimento de onda, e que por isso a absorbância aumentou mesmo com o extrato estando degradado.

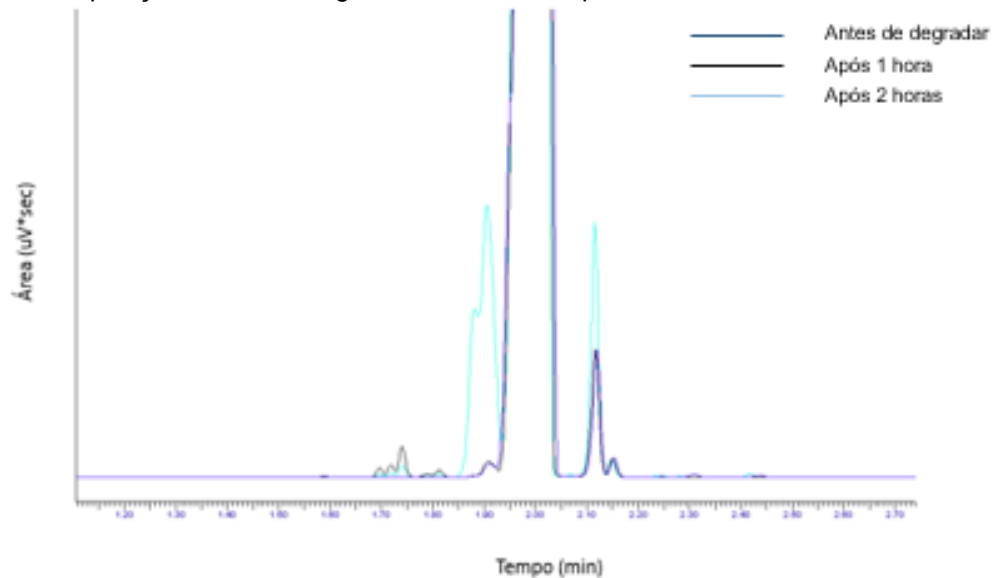
Nas Figuras 19 e 20, o cromatograma em azul escuro corresponde à análise do extrato sem ser degradado, o cromatograma em preto corresponde à análise do extrato após 1 h de degradação e o azul claro após 2 h de degradação perante a luz.

Figura 19: Sobreposição dos cromatogramas do extrato aquoso de *Citrus aurantium*



Fonte: Autoria própria.

Figura 20: Sobreposição dos cromatogramas do extrato aquoso de *Citrus sinensis*



Fonte: Autoria própria.

Nas figuras 19 e 20 é possível observar que muito próximo ao pico do solvente foram formados picos que não existiam ou possuíam uma intensidade muito menor, corroborando com a sugestão que a absorbância da amostra aumentou durante a fotodegradação devido à formação de produtos de degradação.

Apesar de evidenciada a degradação do extrato aquoso pelo método quantitativo de análise utilizado, foi necessária uma investigação de o porquê a absorbância aumentava se a concentração do seu principal composto estava diminuindo.

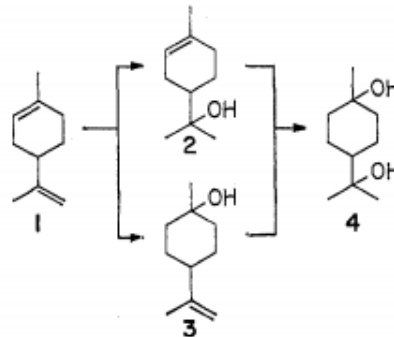
Há algumas hipóteses para que isso tenha acontecido. A mais forte delas refere-se à possibilidade da degradação formar outros compostos que não estavam presentes anteriormente, mas que absorvem a luz em um comprimento de onda semelhante ao do composto principal (*R*-limoneno).

Ainda, pesquisas indicam a possibilidade de que a incidência de energia sobre a molécula de limoneno a faça reagir de outra forma. Segundo Kropp (1970), que pesquisou a fotoquímica dos cicloalcanos, uma fotoprotonação nesses compostos, ou seja, a ligação de um próton a um átomo devido a uma incidência energética pode oferecer uma vantagem sintética única de permitir a protonação seletiva de um ciclohexeno ou hepteno de uma molécula complexa na presença de outras ligações duplas contidas num ou noutro anel maior ou um ambiente acíclico.

Em relação ao limoneno, Kropp (1970) observou a protonação concorrente de ambas as ligações duplas, o que geraria a ocorrência de uma molécula

dirradicalar, proporcionando uma mistura de produtos, incluindo  $\alpha$ - (2) e  $\beta$ -terpineol (3) e terpin (4). Esta possibilidade é apresentada pela Figura 21.

Figura 21: Produtos resultantes da formação de um dirradical



Fonte: KROPP (1970)

#### 4.5 ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

A presença de atividade antimicrobiana em compostos provenientes de matrizes vegetais já é conhecida e pode trazer muitos benefícios ao considerar a substituição de compostos sintéticos que fazem esse papel. Neste trabalho, a atividade antimicrobiana dos extratos aquosos obtidos da casca de laranja foi avaliada pelo método do halo de inibição, proposto por Bauer *et al* (1966), sendo um dos métodos mais simples e confiáveis para avaliação da sensibilidade aos antimicrobianos. Seus resultados são interpretados de acordo com o que está descrito na Tabela 13.

Tabela 13: Interpretação dos halos de inibição

Halo de inibição (mm)	Interpretação
$\geq 18$	S (sensível)
15 - 17	I (intermediário)
$\leq 14$	R (resistente)

Fonte: Normas de Desempenho para Testes de Sensibilidade Antimicrobiana: 15° Suplemento Informativo

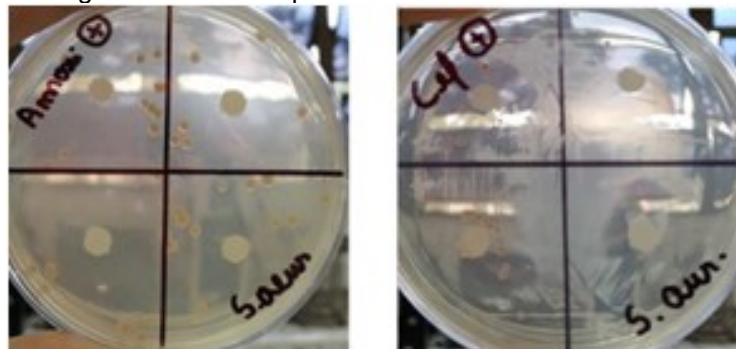
Segundo as normas de desempenho para testes de sensibilidade antimicrobiana (M100-S15 Vol. 25 No. 1), um resultado "sensível" significa que o patógeno pode ser inibido pelas concentrações da substância antimicrobiana. Um

resultado "intermediário" indica que o resultado deve ser considerado equivocado e, se o microrganismo não apresentar sensibilidade a outras drogas clinicamente alternativas, o teste deve ser então repetido. Um resultado "resistente" indica que as concentrações alcançáveis da substância antimicrobiana são insuficientes para serem inibitórias e que outra terapia deverá ser escolhida.

A fim de comprovar o crescimento microbiano e a sua sensibilidade frente aos agentes antimicrobianos largamente utilizados (antibióticos) procedeu-se com a realização do controle positivo, que consiste em avaliar o comportamento dos antibióticos selecionados frente aos microrganismos escolhidos e também foi realizado o controle negativo do experimento, que consiste em deixar os microrganismos crescerem sem nenhum fator que pudesse prejudicar seu crescimento.

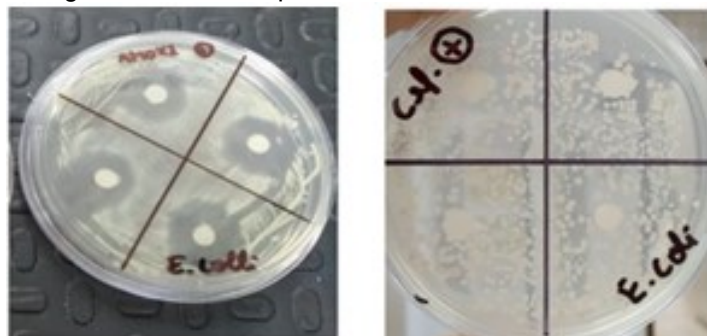
As Figuras 22, 23 e 24 apresentam o controle positivo realizado com os microrganismos gram positivos (*Bacillus subtilis* e *Staphylococcus aureus*) e gram negativo (*Escherichia coli*) utilizando os antibióticos amoxicilina e cefalexina.

Figura 22: Controle positivo referente a *S. aureus*



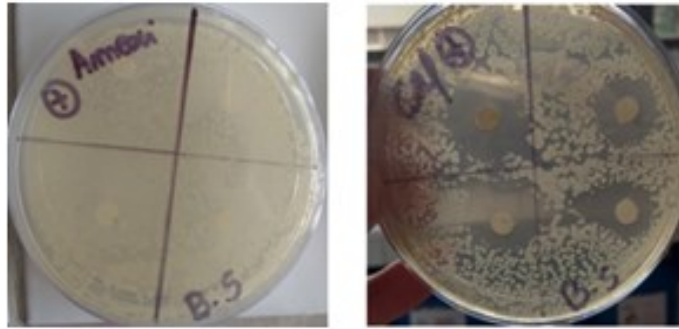
Fonte: Autoria própria.

Figura 23: Controle positivo referente a *E. coli*



Fonte: Autoria própria.

Figura 24: Controle positivo referente a *B. subtilis*



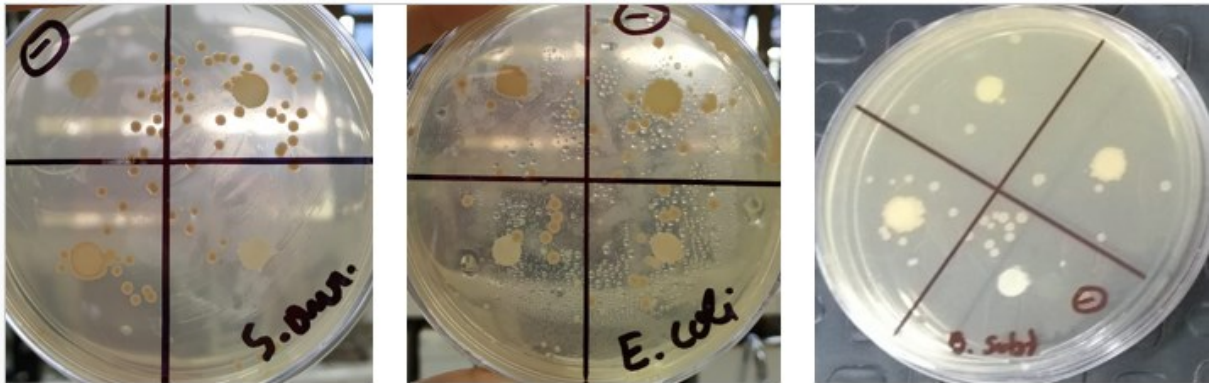
Fonte: Autoria própria.

A amoxicilina é um antibactericida da classe dos  $\beta$ -lactâmicos eficiente contra uma diversa gama de microrganismos, sendo eles, por exemplo, gram positivos como *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus viridans*, *Staphylococcus aureus* e gram negativos como *Haemophilus influenzae*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, espécies de *Salmonella*, espécies de *Shigella*, *Bordetella pertussis*, espécies de *Brucella* e *Neisseria gonorrhoeae* (MELO; DUARTE; SOARES, 2012). Já a cefalexina é um antibiótico semi-sintético do grupo das cefalosporinas, tendo sua eficiência comprovada contra microrganismos gram positivos como *Estreptococos*, *Estafilococos* *Streptococcus pneumoniae* e gram negativos como *Haemophilus influenzae*, *Klebsiella spp*, *Moraxella catarrhalis* e *Proteus mirabilis* (FURP, 2014).

A partir da Figura 24, é possível evidenciar que o microrganismo *Bacillus subtilis* é resistente à amoxicilina, já que não pode ser observada a formação do halo de inibição. O mesmo aconteceu com a *E. coli*, que não foi inibida na presença do antibiótico cefalexina, conforme ilustrado na Figura 23.

A Figura 25 exhibe os dados obtidos no controle negativo executado para os três microrganismos em estudo. Nela é possível observar que houve o crescimento de todos os microrganismos nas suas respectivas placas.

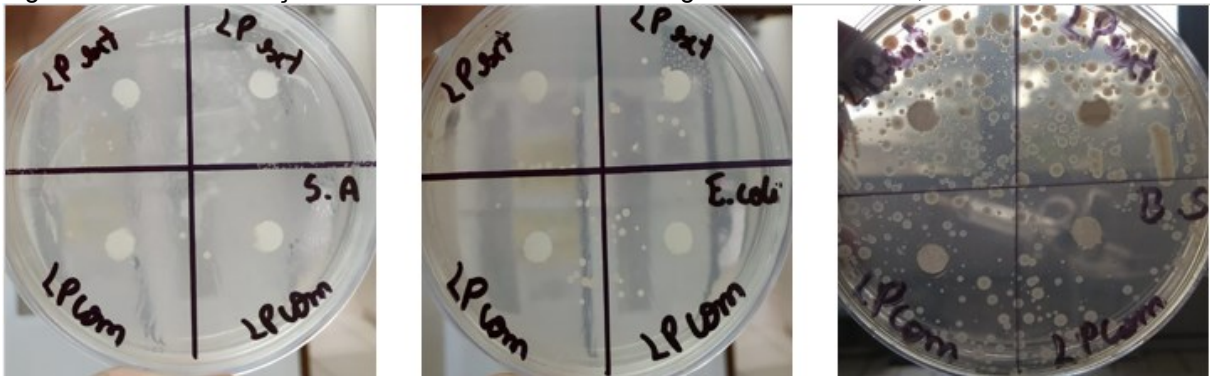
Figura 25: Controle negativo referente aos microrganismos *S. aureus*, *E. coli* e *B. subtilis*



Fonte: Autoria própria.

Já a Figura 26 mostra o estudo da atividade antimicrobiana onde utilizou-se o extrato aquoso nos discos de papel filtro para testar se havia ou não inibição frente aos microrganismos utilizados através da formação do halo de inibição.

Figura 26: Halo de inibição dos extratos frente aos microrganismos *S. aureus*, *E. coli* e *B. subtilis*



Fonte: Autoria própria.

A Tabela 14 demonstra os resultados dos halos de inibição obtidos para cada um dos microrganismos utilizados no estudo:

Tabela 14: Estudo da atividade antimicrobiana dos extratos de laranja das espécies *Citrus sinensis* e *Citrus aurantium*

Microrganismo	Média do diâmetro dos halos de inibição (mm)			
	<i>Citrus sinensis</i>	<i>Citrus aurantium</i>	Cefalexina	Amoxicilina
<i>S. aureus</i>	42	25	20	23
<i>E. coli</i>	15	22	*	38
<i>B. subtilis</i>	0	14	16	*

Fonte: Autoria própria.

\*Nesses casos não houve inibição do antibiótico para o microrganismo.

Baseando-se nos dados da Tabela 14, que contemplam o diâmetro dos halos de inibição, e nos dados da Tabela 13, que revelam a interpretação dos halos, é possível dizer que apenas para o microrganismo *Bacillus subtilis* não houve uma inibição significativa, já que o halo formado com os dois extratos foi inferior a 17 mm, o que classifica os microrganismos de intermediário a resistente ao extrato aquoso em estudo.

Em relação ao microrganismo *E. coli*, este possuiu um halo de inibição intermediário com a utilização do extrato extraído da espécie *Citrus sinensis*. Nos demais casos pode-se observar um halo de inibição superior a 18 mm, o que evidencia que o microrganismo é sensível ao extrato aquoso, sendo ele portanto considerado um agente antimicrobiano frente a este microrganismo.

Já a cepa de *S. aureus* pode ser considerada sensível aos dois extratos em estudo, já que apresentou halos de inibição superiores a 20 mm em ambos os casos, sendo os valores inclusive superiores àqueles encontrados com a utilização de antibióticos.

Assim, é possível concluir que os extratos avaliados podem ser considerados agentes antimicrobianos frente a alguns microrganismos. Entretanto, para que seu uso como agente antimicrobiano para a indústria alimentícia seja recomendado são necessários mais testes que comprovem a eficiência frente aos microrganismos específicos comumente presentes no alimento proposto.

Também, não é possível generalizar a eficiência desses agentes em relação a um grupo específico de bactérias (gram positivas ou negativas), visto que nessa pequena amostragem já pode-se observar um comportamento diferente entre microrganismos pertencentes ao mesmo grupo, já que a *Bacillus subtilis* e *Staphylococcus aureus*, apesar de ambas serem gram positivas, a primeira delas não pode ser considerada como sensível aos óleos estudados, e a segunda obteve grandes halos de inibição.

Autores como Heberle *et al* (2016) avaliaram a atividade antimicrobiana do extrato aquoso da casca laranja da espécie *Citrus sinensis* frente ao microrganismo *S. aureus*, e também evidenciou uma grande atividade antimicrobiana.

Também Goulart *et al* (2018) avaliaram a atividade antimicrobiana frente às bactérias da família *enterobactereacea*, estando entre elas a *E. coli* e também

encontrou resultados satisfatórios, entretanto, sugeriu que fossem realizados mais estudos para propor sua utilização como agente antimicrobiano.

Por fim, Fazio *et al* (2018) evidenciaram a ocorrência de baixa atividade antimicrobiana do extrato aquoso da casca laranja frente ao microrganismo *B. subtilis*. Este trabalho também sugere a utilização do efeito do sinergismo para aumentar a eficiência antimicrobiana, onde a combinação de diferentes óleos se mostrara como mais potentes agentes antimicrobianos do que quando utilizados sozinhos, como por exemplo, o resultado que encontrou ao combinar o óleo de laranja com o óleo de limão siciliano, tendo aumentado em quase 100% o halo de inibição em relação ao encontrado apenas com o óleo de laranja.

#### 4.6 ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

A atividade antioxidante dos extratos aquosos obtidos da casca de laranja foi medida a partir de um método baseado na captura de peróxido de hidrogênio.

A partir dos valores de absorbância encontrados para as amostras, grupo de controle e para o branco pode-se calcular o percentual de peróxido de hidrogênio capturado e sua consequente atividade antioxidante para os dois extratos em estudo. Para o extrato aquoso obtido da espécie *Citrus aurantium* encontrou-se o valor de 19,2% e para a espécie *Citrus sinensis* 24,9% de peróxido de hidrogênio capturado.

Segundo a classificação estabelecida por Melo *et al.* (2008), que considera como forte, moderada e fraca a capacidade de sequestro aquela que atingir o percentual de 70%, entre 50 e 70% e abaixo de 50%, respectivamente, esses valores de 19,2% e 24,9% caracterizam os extratos como fracos agentes antioxidante.

A partir dos resultados apresentados é possível perceber que o extrato aquoso extraído da espécie *Citrus sinensis* apresentou percentual de sequestro do peróxido de hidrogênio levemente superior ao obtido para o óleo da espécie *Citrus aurantium*, ainda que, não sejam considerados estatisticamente diferentes, ao nível de 95% de confiança. No entanto, a pequena diferença pode ser explicada pela diferença da composição dos dois extratos em estudo, visto que Jayaprakasha e



Patil (2007) relatam que a alteração da composição das laranjas pode ocasionar alteração da capacidade antioxidante.

Além disso, o composto majoritário presente nesses extratos (*R*-limoneno) é instável e suscetível à ocorrência de várias reações que podem formar radicais e estes, podem vir a reagir com outras substâncias e formar produtos indesejáveis, afetando a atividade antioxidante do óleo.

Assim, o óleo essencial ou o extrato pode até apresentar melhor atividade antioxidante, entretanto, através desse método que utiliza como amostra uma emulsão de peróxido de hidrogênio, óleo essencial e a solução tampão, não é possível garantir essa eficiência, já que o próprio peróxido de hidrogênio possui fracas ligações e pode se decompor facilmente quando submetido a perturbações, como por exemplo, ao calor, liberando oxigênio molecular e calor. Também, esse composto pode sofrer decomposição catalítica causada pelo efeito de metais, luz UV, e outras impurezas (MATTOS *et al.*, 2003), situações essas que na presença do *R*-limoneno podem ser o iniciador que esse composto precisa para formar outras substâncias.

Mesmo assim, os resultados obtidos com a utilização dessa nova metodologia, que define o extrato aquoso das cascas de laranja como um fraco agente antioxidante, vão de encontro com os resultados obtidos por Gomes *et al.* (2010), que avaliaram o óleo essencial de laranja da mesma espécie através do método DPPH e do método de cooxidação do  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico. No estudo, os autores encontraram valores de atividade antioxidante inferiores a 15%, confirmando os resultados obtidos nesse trabalho.

#### 4.7 ESTUDO DA TOXICIDADE

Foi realizada a avaliação da toxicidade dos extratos aquosos, considerando os principais compostos encontrados pela análise em CG-MS nas duas espécies em estudo, a fim de verificar o possível efeito tóxico desses compostos à saúde humana. Assim, os compostos avaliados foram o *R*-limoneno,  $\alpha$ - pineno, sabineno, mirceno, octanal e linalol. Utilizaram-se duas plataformas para avaliar a toxicidade *in silico* dos óleos e os resultados encontram-se nos tópicos a seguir.

#### 4.7.1 Estudo da toxicidade *in silico* por meio da plataforma ProTox-II

A plataforma ProTox-II contém um banco de dados e apresenta os resultados baseados em probabilidade de acontecimentos de ligação com um receptor específico, DL50, além da semelhança e precisão do teste baseando-se em moléculas já conhecidas.

A Tabela 15 indica os resultados obtidos para o grau de toxicidade que vai de 1 a 5, sendo o número 1 representativo de muito tóxico e 5 de pouco tóxico e a DL50 que representa a concentração necessária para apresentar letalidade a 50% dos indivíduos expostos ao componente.

Tabela 15: Resultados obtidos a partir da análise toxicológica com o ProTox-II

Composto	DL50(mg/Kg)	Grau
$\alpha$ -pineno	3700	5
Sabineno	5000	5
Mirceno	5000	5
Octanal	730	4
( <i>R</i> )- limoneno	4400	5
Linalol	2200	5

Fonte: Autoria própria.

Das moléculas analisadas com o auxílio da plataforma, nenhuma delas apresentou efeitos em relação à hepatocidade, carcinogenicidade, mutagenicidade, imunogenicidade ou citotoxicidade, com elevada precisão. Também, o sabineno, o mirceno e o linalol apresentaram-se inativos para efeitos toxicológicos e sem possibilidade de ligação com nenhum receptor proteico.

Outra molécula analisada foi o  $\alpha$ -pineno, a qual, segundo a plataforma, apresentou alta probabilidade de ligação com a proteína ciclo-oxigenase-1 (COX-1), proteína essa que é uma enzima que age sobre as respostas inflamatórias frente a determinados estímulos nocivos (PIRES *et al.*, 2009).

Para o *R*-limoneno, que é o composto que se encontra em maior concentração dentro do óleo essencial de laranja e no seu extrato, a plataforma indicou provável ligação também com a COX-1, mas não apresentou efeitos toxicológicos maiores ou ligação com outros receptores proteicos.

O composto mais tóxico dos analisados, segundo essa plataforma, é o octanal que indicou alta probabilidade de ligação com o receptor andrógeno, o qual é uma importante proteína que existe no núcleo de determinadas células, à qual se ligam os hormônios masculinos como a testosterona, tendo função fundamental para a manutenção dos caracteres sexuais masculinos secundários (CORREA *et al.*, 2005). Além disso, indicou média probabilidade de se ligar à amina oxidase A, também conhecida como MAO-A, que é uma proteína que possui papel de catalisar a desaminação oxidativa de várias aminas biogênicas no cérebro e em tecidos periféricos pela produção de peróxido de hidrogênio (SHIH *et al.*, 1999). Entretanto, ainda sim seria necessário o consumo de aproximadamente 10 L de óleo essencial para apresentar efeitos tóxicos a uma pessoa de 60 Kg.

De acordo com o exposto, em geral, o extrato do óleo essencial de laranja e o próprio óleo essencial é classificado com nível 5 de toxicidade, o que o classifica como produto improvável de causar dano agudo (NBR 14725-2:2009).

#### 4.7.2 Estudo da toxicidade *in silico* por meio da plataforma pkCSM

Com a plataforma pkCSM é possível realizar a codificação de padrões de distância entre átomos, os quais são usados para representar a molécula visando treinar modelos preditivos (PIRES *et al.*, 2015) e apresenta a toxicocinética da molécula no organismo.

Todos os componentes analisados pela plataforma pkCSM apresentaram baixa solubilidade em água e alta taxa de absorção intestinal (mais de 90%). A maioria dos compostos apresentou-se mais facilmente distribuído na fração ligada, e a taxa de excreção variou entre as substâncias, sendo, portanto, necessário avaliar a possibilidade de acúmulo das substâncias separadamente.

A Tabela 16 indica a fração de componente encontrada na forma ligada, a taxa de excreção e a dose máxima diária tolerada (MRTD) fornecida pela plataforma.

Tabela 16: Resultados obtidos a partir da análise toxicológica com o pkCSM

Composto	Distribuição (%)	Excreção (mL/min/Kg)	MRTD (mg/Kg/dia)
$\alpha$ -pineno	57,5	1,10	4,71
Sabineno	71,9	1,18	1,14
Mirceno	61,1	2,74	5,45
Octanal	53,9	33,9	4,11
(R)-limoneno	52,0	1,63	5,98
Linalol	56,6	2,79	5,20

Fonte: Autoria própria.

De acordo com os dados expostos, é possível concluir que somente compostos com alta fração de distribuição na forma não ligada combinada a baixa taxa de excreção poderia vir a causar algum dano aos tecidos. Essa situação pode ser observada com o *R*-limoneno e com o  $\alpha$ -pineno, entretanto, ambos compostos também apresentam alta dose diária tolerada, o que minimiza os possíveis efeitos toxicológicos desses compostos no organismo humano. Ainda, para que uma pessoa de 60 Kg apresentasse algum efeito toxicológico seria necessário que ela consumisse cerca de 62 mL do extrato aquoso em um único dia, o que se apresenta como totalmente inviável, dessa forma, descartando o risco a saúde quanto a sua aplicação.

Assim, todos os resultados levam a concluir que seria necessário um grande consumo de extrato aquoso da casca de laranja para que os efeitos tóxicos fossem observados, o que é completamente inviável devido à baixa disponibilidade desses materiais e do seu elevado custo.

Na literatura não foram encontrados estudos semelhantes que avaliassem a toxicidade *in silico* do extrato aquoso obtido das cascas de laranja. Entretanto, autores, como Gomes, Leite-Júnior e Souza (2020) e Everton, Araújo e Santos (2020), estudaram a toxicidade do extrato obtido de *Citrus sinensis* por hidrodestilação contra *Artemia salina* utilizando diferentes ensaios e ambos chegaram à conclusão de que o extrato aquoso de laranja dessa espécie é atóxico contra organismos vivos.

## 5 CONCLUSÃO

A partir da realização desse trabalho de pesquisa em relação ao extrato aquoso proveniente da casca de laranja das espécies *Citrus sinensis* e *Citrus aurantium* foi possível comprovar o aumento da eficiência ao submeter a matriz vegetal a um pré-tratamento enzimático quando comparado aos métodos comumente utilizado para extração.

Também, foi possível evidenciar através de análises físico-químicas, sendo elas quantitativas e qualitativas a grande semelhança dos extratos aquosos obtidos da destilação da matriz vegetal de cítricos com os óleos essenciais obtidos por prensagem mecânica e a presença majoritária do composto limoneno, sendo que em ambos os casos ultrapassou 90% da composição, sendo, portanto, muitas das características dos óleos e dos seus extratos associadas a ele.

Ainda, comprovou-se a fácil degrabilidade do óleo e do seu extrato perante a luz e foram avaliadas características como a atividade antimicrobiana, antioxidante e a toxicologia desses materiais a fim de sugerir a sua aplicação nas mais diversas áreas de interesse, como alimentícia e cosmética, garantindo a segurança da sua aplicação.

## 6 SUGESTÃO DE TRABALHOS FUTUROS

Considerando os dados obtidos nessa pesquisa, sugere-se para trabalhos a quantificação e qualificação dos extratos após a sua degradação, bem como o estudo de suas propriedades a fim de verificar se a atividade antioxidante ou antimicrobiana é afetada devido a degradação do extrato.

Ainda, sugere-se uma pesquisa mais aprofundada da atividade antimicrobiana dos óleos, abrangendo uma maior gama de microrganismos que são comumente encontrados como patógenos em alimentos, visando a aplicação desse composto como aditivo alimentar.

Por fim, propõe-se avaliar a toxicologia também *in vitro*, a fim de comparar os dados obtidos com aqueles fornecidos pelo estudo *in silico* e comprovar a segurança do extratos aquosos obtidos da casca de laranja para utilização.

## REFERÊNCIAS

ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS - NBR 5785: Óleos essenciais: determinação do índice de refração, 1985. Acesso em: 23 de jun. de 2019.

ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS - NBR 14725-2: 2009 de Produtos químicos — Informações sobre segurança, saúde e meio ambiente Parte 2: Sistema de classificação de perigo (2009). Acesso em 23 de abril de 2020.

ALVES, G. M. *Método fundamentado em Processamento Digital de Imagens para Contagem Automática de Unidades Formadoras de Colônias*, 2006, 125f. *Dissertação de Mestrado* – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2006.

ALVES, P.R B. MELO, B. *Cultura dos Citrus*. Universidade Federal de Uberlândia – Instituto de Ciências Agrárias. (2003) Disponível em: < <http://www.fruticultura.iciag.ufu.br/citros2.htm>>. Acesso em 19 de mar. de 2020.

ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. RDC nº2 de 17 de Janeiro de 2007. Disponível em: < [http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/RDC\\_02\\_2007\\_COMP.pdf/c966caff-1c19-4a2f-87a6-05f7a09e940b](http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/RDC_02_2007_COMP.pdf/c966caff-1c19-4a2f-87a6-05f7a09e940b)>. Acesso em 11 de jul. de 2019.

ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Nota Técnica Nº 278/2013. Disponível em: < <http://www.saude.gov.br/images/pdf/2014/agosto/28/Cefalexina.pdf>>. Acesso em 15 de mar. de 2020.

ARAUJO, E. A. *et al.* Aspectos coloidais da adesão de micro-organismos. *Quím. Nova*, São Paulo , v. 33, n. 9, p. 1940-1948, 2010 .

BAGETTA, G. *et al.* *Neuropharmacology of the essential oil of bergamot*. *Fitoterapia*, v. 81, n. 6, p. 453-61, Sep 2010. ISSN 0367-326X.

BAJPAI, V. K., BAEK, K.-H., e KANG, S. C. *Control of Salmonella in foods by using essential oils: a review*. *Food Research International*, 45, 722-734, March 2012.

BALSAN, G. A. *Caracterização de uma celulase comercial visando a hidrólise de resíduos agroindustriais*. 2011. 96 f. *Dissertação de Mestrado* - Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões (URI), Erechim/RS, 2011.

BANERJEE, P. *et al.* *ProTox-II- prediction of Toxicity of Chemicals*, 2018. Disponível em:< [http://tox.charite.de/protox\\_II/](http://tox.charite.de/protox_II/)>. Acesso em: 23 de Jun de 2020.

BANERJEE, P. *et al.* *ProTox-II: a webserver for the prediction of toxicity of chemicals*. *Nucleic Acids Res*, 46(W1):W257-W263, Jul 2018.

BAPTISTELLA, L. H. B., *et al.* Preparação do (+)- $\pm$ -terpineol a partir do (+)-limoneno: monoterpenos de odor agradável em um projeto para química orgânica experimental. *Quím. Nova*, São Paulo, v. 32, n. 4, p. 1069-1071, 2009.

BARREIROS A. L. B. S.; DAVID J. M.; DAVID J. P. *Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo*. *Quím. Nova*, v. 29, 113-123, 2006.

BAUER, A. W., *et al.* *Antibiotic Susceptibility Testing by a Standardized Single Disk Method*, *American Journal of Clinical Pathology*, Volume 45, Issue 4\_ts, Pages 493–496, April 1966.

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

CARDOSO, M. H. W. M., BASTOS, L. H.P., NEVES, T. S., ABRANTES, S. *Implementation of MSPD technique to determination of pesticides residues in oranges*. *Ciência e tecnologia de alimentos*, v. 24, n. 2, p. 298-302, June 2004.

CASSINI, J. *Utilização de enzimas para a obtenção de óleos essenciais e cumarinas da casca de Citrus latifolia Tanaka*. 2010. 78f. *Dissertação de Mestrado* - Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul/RS, 2010.

CHABRAND, R.M., GLATZ, C. E. *Destabilization of the emulsion formed during the enzyme-assisted aqueous extraction of oil from soybean flour*. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 45, p. 28–35, 2009.

CHEN, Y. *et al.* *Effect of Second Cooling on the Chemical Components of Essential Oils from Orange Peel (Citrus sinensis)*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 62, n. 35, p. 8786-90, Sep 2014.

COELHO, B. E. S. *et al.* *Atributos físico-químicos de frutos de laranja 'Pêra' produzidos sob sistemas de cultivo orgânico e convencional*. *Revista Brasileira de Meio Ambiente*, v.5, n.1. 128-137, Abril 2019.

CORREA, R. V. *et al.* *Insensibilidade completa aos andrógenos em pacientes brasileiras causada pela mutação P766A no gene do receptor androgênico*. *Arq Bras Endocrinol Metab*, São Paulo, v. 49, n. 1, p. 98-102, Fev. 2005 .

CORREIA, S. J. *et al.* *Flavonóides, norisoprenóides e outros terpenos das Folhas de Tapirira guianensis*. *Química Nova*. v. 31, nº 8, p. 2056-2059, 2008.

*European pharmacopeia*. 8. Ed, Strasbourg: *Council of Europe*, 2416p., 2014.

EVERTON, G.O., ARAÚJO, R.J.P., SANTOS, A.B.S., *et al.* *Caracterização química, atividade antimicrobiana e toxicidade dos óleos essenciais da Pimenta dioica L. (pimenta da Jamaica) e Citrus sinensis L. Osbeck (laranja doce)*. *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, V. 49, n. 3, 2020.



FAZIO, M. L. S., *et al.* Ação antimicrobiana de óleos essenciais de laranja 5f, laranja 10f, limão siciliano e mandarina verde. Revista Interciência IMES Catanduva - V.1, Nº1, Catanduva/SP, 2018.

FELIPE, L. O., BICAS, J. L. Terpenos, aromas e a química dos compostos naturais. Química Nova. V. 39, nº2, p. 120-130, 2017.

FERREIRA, J. L. S. *et al.* Avaliação da toxicidade *in silico* do monoterpene a-felandreno. III Congresso Brasileira de Ciências da Saúde, 2018.

FURP – FUNDAÇÃO PARA O REMÉDIO POPULAR. Governo do Estado de São Paulo, 2014.

GAMA, E. V. S. *Biomassa, óleo essencial e nutrição de Lippia Alba (Mill) N. E. Br. em função da adubação com compostos orgânicos inoculados e sem inoculação de actinomicetos.* 2011. 93p. Dissertação de Mestrado - Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, 2011.

GEANKOPLIS, C. J. *Transport process and unit operations.* 3ed. Englewood Cliffs: PrenticeHall, 1998.

GERCHMAN, D. *Deposição e caracterização de filmes finos fabricados através da técnica de polimerização por plasma de d-limoneno,* 2019, 44f. Tese de doutorado - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2019.

GIRARD, E. A, KOEHLER, H. S, NETTO, S. P. Volume, biomassa e rendimento de óleos essenciais do craveiro (*Pimenta pseudocaryophyllus*). Rev. Acad., Curitiba, v. 5, n. 2, p. 147-165, abr./jun. 2007.

GOMES, F. P. Curso de Estatística Experimental. 15° Edição. Editora: Universidade de S. Paulo, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 1990.

GOMES, M. S., *et al.* Caracterização química do óleo essencial extraído das cascas de laranja e atividade antioxidante utilizando dois métodos de análise. In: Congresso Brasileiro de Química, 50°, 2010, Cuiabá/MT. Anais eletrônicos. Disponível em: <<http://www.abq.org.br/cbq/2010/trabalhos/7/7-422-8220.htm>>. Acesso em: 24 de maio de 2020.

GOMES, M. S. *et al.* Uso de *scanner* em espectrofotometria de absorção molecular: aplicação em experimento didático enfocando a determinação de ácido ascórbico. Quím. Nova, v. 31, n. 6, p. 1577-1581, São Paulo, 2008

GOMES, P. B. *Caracterização de materiais: uma abordagem das possibilidades de algumas técnicas instrumentais,* 2015, 35f. Trabalho de conclusão de curso - Universidade Federal de São João del-Rei. São João del-Rei, 2015.

GOMES, P. R. B., LEITE-JÚNIOR, J. D. C., SOUZA, D.A.G., *et al.* Estudo da composição química, toxicidade e atividade moluscicida do óleo essencial *Citrus sinensis* (L.) Osbeck, Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm., Vol. 49(1), 28-43, 2020.

GOULART, A. L. R. M., *et al.* Atividade antibacteriana do óleo essencial extraído da casca da laranja pera frente às bactérias da família *enterobactereacea*. *Acta Biomedica Brasiliensia*, v. 9, n. 2, Rio de Janeiro, 2018.

GUTIERREZ, J.; BARRY-RYAN, C.; BOURKE, P. *The antimicrobial efficacy of plant essential oil combinations and interactions with food ingredients*. *International Journal of Food Microbiology*, v. 124, n. 1, p. 91-97, May 2008.

HEBERLE, T. *et al.* Atividade antimicrobiana do óleo essencial de laranja. In: Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos: Alimentação: a árvore que sustenta a vida. XXV, 2016, Gramado/RS.

HENDRICKSON, J. B.; CRAM, D. J.; HAMMOND, G. S.; *Organic chemistry*, 3<sup>rd</sup> ed., *Mcgraw-Hill Book Company*: New York, 1970.

HOLLER, F. J.; SKOOG, D. A.; CROUCH, S. R. *Princípios de análise instrumental*. 6 ed. Porto Alegre: Bookman, 2009

HOLLINGSWORTH, R. G. *Limonene, a Citrus Extract, for control of Mealybugs and Scale insects*. *Journal of Economic Entomology*, v.98, n°.3, p.772-779, June 2005.

HUSSAIN, A. I. *et al.* *Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of essential oil of spearmint (Mentha spicata L.)*. *J Essent Oil Res* 22: 78-84, Pakistan, 2010.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Censo de 2017: Produção agrícola Municipal, 2017.

*International Organization for Standardization*. ISO 9235:2013: Aromatic natural raw materials, 2013. Disponível em: <<https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso:9235:dis:ed-3:v1:en>>. Acesso em 28 de jul. de 2020.

ITA - INSTITUTO TECNOLÓGICO DE AERONÁUTICA. Experiências e explicações físicas e químicas. São José dos Campos/SP, 2008. Disponível em: <<http://www.fis.ita.br/labfis45/>> Acesso em 23 de jun. de 2019.

JAYAPRAKASHA, G. K.; PATIL, B. S. *In vitro evaluation of the antioxidant activities in fruit extracts from citron and blood orange*. *Food Chemistry*, v. 101, n. 1, p. 410-418, 2007.

JUGE, N. *Plant protein inhibitors of cell wall degrading enzymes*. Review Article. *Trends in Plant Science*, v. 11, p. 359-367, 2006

KALEMBA, D.; KUNICKA, A. *Antibacterial and Antifungal Properties of Essential Oils*. *Current Medicinal Chemistry*, v. 10, n. 10, p. 813-829, May 2003.

KROPP, P. J. *Photochemistry of Cycloalkenes. VII. Limonene*. *The Journal of Organic Chemistry*, 35 (7), 2435-2436, Ohio, January 1970.

LARANJA. 2019. Disponível em <<https://hortifrutigranjeiros.com.br/curiosidades/laranja/>>. Acesso em: 23 de Jun. de 2019.

LEÃO, M. *Análise do óleo essencial da laranja doce Citrus sinensis (L.) Osbeck obtidos das cascas secas e frescas através do métodos de extração por hidrodestilação, 2015, 49f.* Trabalho de Conclusão de Curso – Universidade de Santa Cruz do Sul, Santa Cruz do Sul, 2015.

LIMA, V. L. E. Os fármacos e a quiralidade: uma breve abordagem. Quím. Nova, São Paulo, v. 20, n. 6, p. 657-663, Dec. 1997.

LIMA, F. B., PLACEDES, J., CARDOSO, C.R. Avaliação do rendimento de hidrodestilação para a produção de óleo essencial das cascas de Citrus sinensis (L.) Osbeck. Rev. Bras. Cien., Tec. e Inov, Minas Gerais, v. 4, n.3, p. 257-266, Out-Dez/2019.

LOPES, A. *et al.* Estudo da Qualidade e da Fotodegradação dos Óleos Essenciais Comerciais de Capim Limão (*Cymbopogon citratus*). In: Congresso Brasileiro de Química, 55<sup>o</sup>, 2016, Goiânia/GO.

MAGALHÃES, P. O., *Purificação de hemicelulases e de uma  $\beta$ -Glicosidase de Ceriporiopsis subvermispura produzidas em condições de biopolpação, 2005, 141f.* Tese de doutorado - Faculdade de Engenharia Química de Lorena. Departamento de Biotecnologia. Lorena – SP, 2005.

MAPA - MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Projeções do Agronegócio: Brasil 2017/18 a 2027/28 projeções de longo prazo. Secretaria de Política Agrícola. – Brasília: MAPA/ACE, 2018.

MAROSTICA JUNIOR, M. R.; PASTORE, G. M. Biotransformação de limoneno: uma revisão das principais rotas metabólicas. Química Nova [online], vol.30, n.2, p. 382-387, São Paulo, Abril 2007.

MATOS, C. E. Diretrizes e boas práticas para aplicação e validação de modelos in silico no Brasil com fins regulatórios. INTERTOX, São Paulo, 2015. Disponível em: <[http://formsus.datasus.gov.br/novoimgarq/29206/5287799\\_410075.pdf](http://formsus.datasus.gov.br/novoimgarq/29206/5287799_410075.pdf)> Acesso em 18/09/2020.

MATTOS, I. L. *et al.* Peróxido de hidrogênio: importância e determinação. Quím. Nova, São Paulo, v. 26, n. 3, p. 373-380, Maio 2003.

MEDEIROS, H. H. B. R., *Fracionamento do Óleo de Laranja utilizando um Sistema Híbrido de Evaporação, 2014, 169f.* Tese de Doutorado – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2014.

MELO, R. C. A de; Plantas Medicinais, Óleos essenciais e Aromas. Revista eletrônica Nutritime, v. 2, n<sup>o</sup>2, p. 193 – 200, março/abril de 2005.

MELO, V. V., DUARTE, I. de P., SOARES, A. Q. Guia de Antimicrobianos – 1.ed. Universidade Federal de Goiás. Goiânia, 2012. Disponível em: <[http://www.saudedireta.com.br/docsupload/1415789307Guia\\_de\\_Antimicrobianos\\_d\\_o\\_HC-UFG.pdf](http://www.saudedireta.com.br/docsupload/1415789307Guia_de_Antimicrobianos_d_o_HC-UFG.pdf)>. Acesso em 15 de mar. de 2020.

MELO, E. A. *et al.* Teor de fenólicos totais e capacidade Antioxidante de polpas congeladas de frutas. Alimentos e Nutrição, Araraquara v.19, n.1, p. 67-72, 2008.

MONTANARI, R. M. *Composição química e atividades biológicas dos óleos essenciais de espécies de Anacardiaceae, Siparunaceae e Verbenaceae, 2010, 173f.* Tese de Doutorado – Universidade Federal de Viçosa – UFV, Viçosa, MG. 2010.

MORAES, H. H. Q., *Otimização experimental da extração do óleo essencial de gengibre (Zingiber officinale), 2012, 133f.* Dissertação de Mestrado - Universidade Federal do Pará – Belém, 2012.

NETO, J. X. L. *Estudo em complexos fármaco-receptor utilizando bioquímica quântica, 2019, 155f.* Tese de doutorado – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2019.

NEVES, M. F.; TROMBIN, V. G. Anuário da citricultura, 2017. 1ª Edição. Disponível em: <[http://www.citrusbr.com/download/biblioteca/CitrusBR\\_Anuario\\_2017\\_alta.pdf](http://www.citrusbr.com/download/biblioteca/CitrusBR_Anuario_2017_alta.pdf)> Acesso em 11 de jul. de 2019

NJOROGE, S.M. *et al; Essential oil constituents of three varieties of Kenyan sweet oranges (Citrus sinensis).* Flavour and Fragrance Journal, 20(1), p. 80–85, 2005.

Normas de Desempenho para Testes de Sensibilidade Antimicrobiana: 15º Suplemento Informativo. (M100-S15 Vol. 25 No. 1). Disponível em: [http://bvsm.s.saude.gov.br/bvs/publicacoes/metodo\\_ref\\_testes\\_diluicao\\_modulo4.pdf](http://bvsm.s.saude.gov.br/bvs/publicacoes/metodo_ref_testes_diluicao_modulo4.pdf). Acesso em 24 de jan. de 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, VII, Palmas/TO, 2012.

PAKDELA, H.; PANTEAA, D.; ROY, C. *Production of d-limonene by vacuum pyrolysis of used tires.* Journal of Analytical and Applied Pyrolysis, v.57, n.1, p.91-107, 2001.

PAVARINI, D.P. *Variabilidade temporal e intraespecífica dos constituintes voláteis das folhas de Lychnophora ericoides Mart, 2011, 126f.* Dissertação de Mestrado - Universidade de São Paulo – Ribeirão Preto, 2011.

PIRES, C. A.; PANCOTE, C. G.; TOLEDO, L. G.; COX: Alvo farmacológico dos aines. União das Faculdades dos Grandes Lagos – UNILAGO, 2009.

PIRES, D. E. V.; ASCHER, D.B. pkCSM. University of Melbourne, 2015. Disponível em: < <http://biosig.unimelb.edu.au/pkcsm/prediction>>. Acesso em: 15 de Jun de 2020.

PIRES, D. E. V.; BLUNDELL, T. L.; ASCHER, D.B.; *pkCSM: predicting small-molecule pharmacokinetic properties using graph-based signatures. Journal of Medicinal Chemistry*, 58 (9), p. 4066–4072, 2015.

PISOSCHI, A. M, NEGULESCU, G. P. *Methods for Total Antioxidant Activity Determination: A Review. Biochemistry and Analytical Biochemistry*, v. 01, 1-10, January 2012.

ROSENTHAL, A.; PYLE, D.L.; NIRANJAN, K. *Review: aqueous and enzymatic processes for edible oil extraction. Enzyme and Microbial Technology*, v. 19, n. 6, p. 402- 420, November 1996.

ROY, P., KULKARNI, A.P. *Oxidation of ascorbic acid by lipoxygenase: effect of selected chemicals. Food Chemical Toxicology, Oxford*, v.34, n.6, p.563-570, 1996.

RUCH, R. J; CHENG S. J; KLAUNIG J. E. *Prevention of cytotoxicity and inhibition of intercellular communication by antioxidant catechins isolated from Chinese green tea. Carcinogenesis*. 10(6):1003-8. Jun 1989.

SANTOS, A. S. *et al.* Descrição de Sistema e de Métodos de Extração de Óleos Essenciais e Determinação de Umidade de Biomassa em Laboratório. Comunicado Técnico da EMBRAPA, ISSN 1517-2244. Belém/PA. Novembro 2004.

SANTOS, A. S. Óleos essenciais: uma abordagem econômica e industrial. Rio de Janeiro: Inter ciências, 2011.

SANTOS, P. B. P., *Preparação e Caracterização Físico-Química de Complexos de Limoneno em  $\alpha$  e  $\beta$  Ciclodextrina*, 2014, 122f. Dissertação de Mestrado - Universidade Federal de Sergipe – São Cristóvão, 2014.

SANTOS, A. C. A., SERAFINI, L. A., CASSEL, E. Estudo de processos de extração de óleos essenciais e bioflavonóides de frutas cítricas. 1ª Ed. Caxias do Sul: Editora da Universidade de Caxias do Sul (EDUCS), p. 19- 29, 2003.

SARTOR, R. B. *Modelagem, simulação e otimização de uma unidade industrial de extração de óleos essenciais por arraste a vapor*, 2009, 99f. Dissertação de Mestrado - Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Departamento de Engenharia Química, 2009.

SCHREY A.K., NICKEL-SEEBER J., DRWAL M.N., ZWICKER P., SCHULTZE N., HAERTEL B., PREISSNER R. *Computational prediction of immune cell cytotoxicity. Food Chem. Toxicol.* 2017; 107:150–166.

SHIH, J. C., CHEN, K., e RIDD, M. J. *MONOAMINE OXIDASE: From genes to Behavior. Annual Review of Neuroscience*, v. 22, p. 197-217. California 1999.

SOWBHAGYA, H. B., PURNIMA, K. T. FLORENÇA, S. P., RAO, A. G. A., SRINIVAS, P. *Evaluation of enzyme-assisted extraction on quality of garlic volatile oil*. Food Chemistry, v. 113, n. 1234-1238, 2009.

SILVA, J. *et al.* *Analgesic and antiinflammatory effects of essential oils of Eucalyptus*. Journal of Ethnopharmacology, v.89, n.2, p.277- 283, December 2003.

SILVA, L. E. *Abordagem ambiental aliada ao estudo da extração do óleo essencial de Pentacalia desiderabilis (Velloso) Cuatrec por arraste a vapor, 2018, 119f.* Dissertação de Mestrado – Escola Politécnica da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS). Programa de pós-graduação em engenharia e tecnologia de materiais, 2018.

SILVA, L. V.; MENDES, M. F.; COELHO, G. L. V.; Extração do óleo essencial da pimenta rosa (*Schinus molle*) usando hidrodestilação e *soxhlet*. In: Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica, VI, Rio de Janeiro, 2005.

SILVEIRA, J. C., BUSATO, N. V., COSTA, A. O.S., COSTA, E.F. Levantamento e análise de métodos de extração de óleos essenciais. Enciclopédia Biosfera – Centro Científico Conhecer. Goiânia, v. 8, n.15, p.2038, 2012.

SIMÕES C.A.M. *et al.* Farmacognosia da planta ao medicamento. 6.ed. Porto Alegre: UFRGS; Florianópolis: UFSC, 2002.

SOCIEDADE NACIONAL DE AGRICULTURA. Óleos essenciais: uma fonte de divisas a ser mais explorada no Brasil. Revista A Lavoura. Edição nº 699/2013.

SOLOMONS, T. W. G.; Química orgânica 1, 7ª ed., Editora Livros Técnicos e Científicos: Rio de Janeiro, 2001.

SOLÓRZANO-SANTOS, F.; MIRANDA-NOVALES, M. G. *Essential oils from aromatic herbs as antimicrobial agents. Current Opinion in Biotechnology*, v. 23, n. 2, p. 136- 141, April 2012.

STAHL, W., SIES, H. *Antioxidant defence: vitamins E and C and carotenoids. Diabetes*, New York, v.46, p.S14-S18, 1997. Supplement 2.

STASHENKO, E. E. *et al.* *Changes in chemical composition of catalytically hydrogenated orange oil (Citrus sinensis)*. Journal of chromatography A, v. 752, n. 1, p. 217 -222, November 1996.

SURBURG, H.; PANTEN, J.; *Common Fragrance and Flavor Materials: Preparation, Properties and Uses*, 5<sup>th</sup> ed., Wiley-VCH Verlag GmbH & Co., 2006.

TAYLOR, B. *Fruit and Juice Processing*. IN: ASHURST, P. R. *Chemistry and Technology of Soft Drinks and Fruit Juices*. Hereford (UK): Blackwell Publishing Ltd., p.35-66, 2005.

TITA, M. L. *Identificação dos componentes do óleo essencial de laranja (Citrus sinensis L. Osbeck) e proposição de procedimentos industriais para a obtenção de*

*produtos diferenciados, 2011, 102f.* Dissertação de Mestrado - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos/SP, 2011.

TRANCHIDA, P. Q. *et al.* *Analysis of citrus essential oils: state of the art and future perspectives: a review.* *Flavour Fragrance Journal*, 27(2): 98–123, November 2011.

TRANCOSO M.D. *et al.* Óleos essenciais: extração, importância e aplicações no cotidiano. In: Congresso Brasileiro de Química, 53<sup>o</sup>, Rio de Janeiro, 2013.

TOMCHINSKY, B.; MING, L. C. As plantas comestíveis no Brasil dos séculos XVI e XVII segundo relatos de época. *Rodriguésia*, v. 70. Rio de Janeiro, 2019.

TORRES-ALVAREZ, C. *et al.* Chemical composition, antimicrobial, and antioxidant activities of orange essential oil and its concentrated oils, *CyTA - Journal of Food*, 15:1, 129-135, 2017.

UNITED NATIONS COMMODITY TRADE STATISTICS DATABASE (COMTRADE). UN Comtrade Database, 2018. Disponível em: < <https://comtrade.un.org/labs/data-explorer/> > Acesso em: 29 de Jun 2019.

VALADARES, M.C. *Avaliação de Toxicidade Aguda: Estratégias Após a “Era do Teste DL50”*. *Revista Eletrônica de Farmácia*. v. 3, n 2, p. 93-98, 2006.

VALE, T. G. *et al.* *Central effects of citral, myrcene and limonene, constituents of essential oil chemotypes from Lippia alba (Mill.) N.E. Brown.* *Phytomedicine*, v. 9, n. 8, p. 709 -714, 2002.

VIEGAS JÚNIOR, C. Terpenos com atividade inseticida: uma alternativa para o controle químico de insetos. *Química Nova*. v. 26, n<sup>o</sup> 3, p. 390-400, São Paulo, Maio 2003.

VIEIRA, R. *Estudo da Fotossensibilidade do Óleo Essencial de Rosmarinus officinalis Acompanhada por Espectroscopia UV-VIS, 2010, 45f.* Trabalho de Conclusão de Curso – Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), Toledo/PR, 2010.

VILHENA, C. S. *Avaliação do processo de obtenção de óleo de buriti por diferentes métodos de extração, 2013, 75f.* *Dissertação de Mestrado – Universidade Federal do Pará, Belém/PA, 2013.*

WANG, Y. *et al.*, 2015. *In silico ADME/T modelling for rational drug design.* *Q. Rev. Biophys.* 2015; 48:488–515

WU, J., JOHNSON, L.A., JUNG, S. *Demulsification of oil-rich emulsion from enzyme-assisted aqueous extraction of extruded soybean flakes.* *Bioresource Technology*, v. 100, p.527–533, 2009.