



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS



## **Composição química dos óleos essenciais de seis novos híbridos de citros obtidos a partir do cruzamento de tangerinas e laranjas**

**Graduanda:** Marina Cassab Azevedo

**Orientador:** Prof. Dr. Stanislaw Bogusz Junior

**São Carlos-SP**

**2020**

2020

MARINA CASSAB AZEVEDO

Composição química dos óleos essenciais de seis novos  
híbridos de citros obtidos a partir do cruzamento de tangerinas  
e laranjas

Monografia apresentada ao curso de  
Bacharelado em Química - Habilitação:  
Tecnológica - Ênfase: Alimentos, da  
Universidade de São Paulo, como requisito  
para a obtenção do grau de Bacharel.

Orientador: Prof. Dr. Stanislaw Bogusz Junior

São Carlos - SP

2020

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Assinatura: *Marina Cassab Azevedo*  
Data: *25/11/2020*

*Ficha Catalográfica elaborada pela Seção de Referência e Atendimento ao Usuário da SBRMQSC*

Azevedo, Marina Cassab

Composição química dos óleos essenciais de seis novos híbridos de citros obtidos a partir do cruzamento de tangerinas e laranjas / Marina Cassab Azevedo. — São Carlos, 2020.  
47 f.

Monografia (Bacharelado em Química) — Instituto de Química de São Carlos / Universidade de São Paulo, 2020.

Orientador: Prof. Dr. Stanislaw Bogusz Junior

1. Química analítica. 2. Cromatografia gasosa. 3. Espectrometria de massas. 4. Citros. 5. Óleos essenciais. I. Título.

Sônia Alves - CRB: 4280/8



## AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais e a minha irmã por terem me apoiado em todas as escolhas da minha vida e possibilitado a realização dessa graduação, ao meu parceiro Luiz Eduardo pela companhia, paciência e apoio durante todo esse período e ao meu melhor amigo Nick, que sempre esteve ao meu lado, apoiando, torcendo e amando.

Agradeço aos professores do Instituto de Química de São Carlos, que contribuíram para minha formação pessoal e profissional e em especial ao Prof. Dr. Stanislau Bogusz Junior que foi um ótimo orientador no trabalho e nas questões da vida.

Agradeço aos meus colegas de laboratório, pela companhia e ajuda durante esse projeto.

Agradeço aos pesquisadores do Centro de Citricultura Sylvio Moreira pela gentil doação das amostras de citros.

Agradeço a editora *Taylor & Francis* e a revista *Journal of Essential Oil Research* pela gentil autorização de apresentar nesta monografia parte dos dados que previamente publiquei no artigo intitulado: Essential oil profiling of six new citrus hybrids from Murcott tangor and Pera sweet Orange.

Agradeço também a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa fornecida (2017/07961-7) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES).

## EPÍGRAFE

"Os aromas dos óleos essenciais nos trazem memórias, despertam nossos sentidos, acalmam nossos pensamentos, nos trazem felicidade e ajudam a definir nossa auto-imagem."

Diane Ackerman

## RESUMO

O objetivo desta pesquisa foi avaliar o rendimento e a composição dos óleos essenciais de seis novos híbridos de citros obtidos a partir do cruzamento de Tangerina Murcott (*Citrus reticulata* Blanco x *Citrus sinensis*) e Laranja-Pêra (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck). As amostras foram fornecidas pelo Centro de Citricultura Sylvio Moreira de Cordeirópolis – SP. Os óleos essenciais da casca dos frutos foram obtidos por hidrodestilação e analisados por cromatografia gasosa (GC-FID) e cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS). Os teores dos óleos essenciais dos híbridos variaram de 0,59% a 0,34%, sendo a amostra TMXLP16 a que apresentou o maior rendimento de óleo essencial. No entanto, ao se observar a produtividade de frutos por hectare os híbridos que apresentaram maior produtividade de óleos essenciais foram TMXLP44 (36 L por hectare) e TMXLP294 (21 L por hectare). O composto majoritário em todas as amostras foi o limoneno (>80%), seguido pelo linalol, sendo que a amostra TMXLP294 foi a que apresentou o maior teor deste álcool terpênico (>13%). O óleo essencial da amostra TMXLP44 foi o que apresentou a maior complexidade apresentando o maior número de componentes (64), enquanto que o híbrido com o menor número de compostos voláteis foi o TMXLP372 (41). A análise de componentes principais (PCA) dos óleos essenciais revelou que a amostra que mais diferiu dos parentais foi a TMXLP44, enquanto que os híbridos que mais se assemelharam aos parentais Tangerina Murcott e Laranja-Pêra foram TMXLP372 e TMXLP294, respectivamente. Os novos híbridos capazes de fornecer óleos essenciais com maior valor comercial são o TMXLP294, que apresentou maior quantidade de linalol, e o TMXLP44, que apresentou o maior rendimento de óleo essencial por hectare.

**Palavras chave:** Química analítica, cromatografia gasosa e espectrometria de massas, óleos essenciais, citros, novos híbridos.

## ABSTRACT

The objective of this research was to evaluate the yield and the composition of the essential oils of six new citrus hybrids obtained from the Murcott Tangor (*Citrus reticulata* Blanco x *Citrus sinensis*) and Orange-Pear (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) crosses. For this, samples of citrus fruits were obtained from the Centro de Citricultura Sylvio Moreira, Cordeirópolis city, São Paulo, Brazil. The essential oils of the fruit peel were obtained by hydrodistillation and analyzed by gas chromatography (GC-FID) and gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS). The essential oil yields of the hybrids varied from 0.59% to 0.34%, being sample TMXLP16 the one that presented the highest yield of essential oil. However, observed fruit yield per hectare the hybrids that presented higher yields of essential oils were TMXLP44 (36 L per hectare) and TMXLP294 (21 L per hectare). The major compound in all samples was the limonene (> 80%), followed by linalool, and the sample TMXLP294 presented the highest content of this terpene alcohol (> 13%). The essential oil of the TMXLP44 sample was the one with the highest number of components (64), whereas the hybrid with the lowest number of volatile compounds was TMXLP372 (41). The principal components analysis (PCA) of essential oils revealed that TMXLP44 is the sample differs the most from the parents, whereas the hybrids that most look like the parents (Murcott Tangor and Orange-Pear) are TMXLP372 and TMXLP294, respectively. The hybrids capable of providing essential oils with higher commercial value are: TMXLP294, which presented higher amounts of linalool, and TMXLP44, which presented the highest yield of essential oil per hectare.

**Key-words:** Analytical chemistry, gas chromatography and mass spectrometry, essential oils, citrus, new hybrids.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Principais partes de um fruto cítrico. ....	14
Figura 2 - Ilustração de um sistema de hidrodestilação. ....	15
Figura 3 - Operação de um extrator de suco de laranja tipo espremedor. ....	16
Figura 4 - Estruturas químicas de alguns componentes presentes em óleos essenciais de <i>Citrus reticulata</i> Blanco.....	17
Figura 5 - Via biossintética geral pela qual são produzidos os blocos construtores dos componentes dos óleos essenciais: o ácido mevalônico e o ácido chiquímico. ....	18
Figura 6 - Rota biossintética de produção dos terpenóides pela associação de blocos construtores de cinco carbonos.....	19
Figura 7 - Rota biossintética de produção de alguns monoterpenóides. ....	20
Figura 8 - Rota biossintética de alguns sesquiterpenos. ....	21
Figura 9 - Formação de $\beta$ -ionona e $\beta$ -damascenona a partir da degradação do $\beta$ -caroteno. ....	22
Figura 10 - Fotografia dos frutos Tangerina Murcott ( <i>Citrus reticulata</i> Blanco x <i>Citrus sinensis</i> ) e Laranja-Pêra ( <i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck) e os novos híbridos obtidos pelo cruzamento destes parentais: TMXLP16, TMXLP44, TMXLP88, TMXLP281, TMXLP294, TMXLP372.....	24
Figura 11 - Fotografia do aparato de hidrodestilação tipo Clevenger modificado para extração de óleos essenciais. ....	25
Figura 12 - Comparação dos cromatogramas dos óleos essenciais de todas as amostras investigadas por GC-FID.. ....	29
Figura 13 - Cromatograma do óleo essencial do híbrido TMXLP44.....	29
Figura 14 - Comparação entre as porcentagens relativas para os compostos limoneno e linalol nas amostras investigadas.....	34
Figura 15 - Comparação entre as porcentagens relativas dos cinco terpenos mais abundantes nas amostras de óleo essencial exceto o limoneno e o linalol.....	35
Figura 16 - Gráfico de escores PC1 x PC2. ....	38
Figura 17 - Gráfico de escores PC3 x PC4. ....	38



Figura 18 - Gráfico das variáveis ou dos pesos (loadings graph) dos dois primeiros componentes principais da PCA dos compostos voláteis presentes nos óleos essenciais das oito amostras de citros estudadas. ....40

Figura 19 - Gráfico das variáveis ou dos pesos (loadings graph) dos dois primeiros componentes principais da PCA dos compostos voláteis presentes nos óleos essenciais das oito amostras de citros estudadas.. ....41

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Requisitos de qualidade de óleos essenciais de tangerinas ( <i>Citrus reticulata Blanco</i> ) pelas normas da International Standard Organization (ISO) e pela Farmacopéia Européia (FE). .....	23
Tabela 2. Rendimento de óleo essencial para as amostras de Tangerina Murcott ( <i>Citrus reticulata Blanco</i> x <i>Citrus sinensis</i> ) e Laranja-Pêra ( <i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck) e os novos híbridos obtidos pelo cruzamento destes parentais: TMXLP16, TMXLP44, TMXLP88, TMXLP281, TMXLP294, TMXLP372. ....	27
Tabela 3. Produtividade de óleo essencial em litros por hectare para os parentais e os seis novos híbridos de citros. ....	28
Tabela 4. Caracterização dos componentes dos óleos essenciais dos parentais Laranja-Pêra ( <i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck) e Tangerina Murcott ( <i>Citrus reticulata Blanco</i> x <i>Citrus sinensis</i> ) e seus seis híbridos: TMXLP16, TMXLP44, TMXLP88, TMXLP281, TMXLP294 e TMXLP372. ....	31

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
2.1. O que são óleos essenciais.....	13
2.2. Principais métodos para obtenção de óleos essenciais de citros.....	13
2.3. Biossíntese de terpenóides .....	16
3. OBJETIVOS.....	23
3.1. Objetivo Geral.....	23
3.2. Objetivos Específicos .....	23
4. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL .....	24
4.1. Amostras .....	24
4.2. Extração dos óleos essenciais .....	24
4.3. Análise dos óleos essenciais por GC-FID e GC-MS .....	26
4.4. Análises estatísticas e quimiometria.....	26
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	27
5.1. Rendimento de extração e produtividade de óleo essencial .....	27
5.2. Análise dos óleos essenciais por GC-FID e GC-MS .....	28
5.3. Análise de componentes principais .....	37
6. CONSIDERAÇÕES ADICIONAIS.....	42
7. CONCLUSÕES.....	42
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	44
ANEXO.....	47

## 1. INTRODUÇÃO

O Brasil apresenta um importante papel na produção mundial de citros, sendo o maior produtor de suco de laranja (*Citrus sinensis*) e o sexto maior produtor de tangerinas (*Citrus reticulata*).<sup>1,2</sup> Essa produção ocorre principalmente no Estado de São Paulo, onde encontra-se cerca de 77% da produção de laranjas do país e 40% da produção nacional de tangerinas.<sup>3</sup> Em relação a esses citros especificamente, estima-se que existam aproximadamente 52 mil hectares de tangerinas e 590 mil hectares de laranjas cultivados no país, com uma produção de 996 mil toneladas anuais de tangerina e 16,7 milhões de toneladas de laranja.<sup>2,3</sup> Considerando este volume de produção, é evidente que o cultivo de tangerinas e laranjas possui uma relevante importância socioeconômica para o Brasil, uma vez que o setor emprega um grande número de pessoas de forma direta e indireta.<sup>4</sup> Além disso, até agosto de 2017, o país exportou mais de 220 mil toneladas de suco de laranja concentrado congelado movimentando um montante de U\$ 402.883.637 em exportações.<sup>5</sup>

No entanto, a citricultura vem passando por sérios problemas em função do surgimento de pragas e doenças que atacam as lavouras, e que podem comprometer a produtividade citrícola. A principal doença fúngica que acomete os citros é a Mancha Marrom de Alternária (MMA), causada pelo fungo *Alternaria alternata* f. sp. *citri*. O principal sintoma da MMA em citros pode ser observado em folhas, ramos e frutos e é caracterizado pela presença de manchas marrons, que causam a rejeição dos frutos acometidos pela doença por parte do consumidor, o que gera perda de valor comercial dos frutos.<sup>6</sup>

Para contornar esse problema, pesquisas de melhoramento genético de citros têm sido desenvolvidas para produzir novos híbridos resistentes ao MMA. Para isso, foi realizado um cruzamento controlado entre um parental Tangerina Murcott (*Citrus reticulata* Blanco x *Citrus sinensis* (L.) Osbeck) suscetível a MMA e um parental Laranja-Pêra (*C. sinensis* (L.) Osbeck) resistente ao MMA. Este experimento foi iniciado na primavera de 1997 no Centro de Citricultura Sylvio Moreira do Instituto Agrônomo de Cordeirópolis (IAC), SP, Brasil. Em um primeiro momento, os pesquisadores obtiveram 312 plantas zigóticas, que foram identificadas quanto a sua progênia, através de marcadores morfológicos e moleculares. Então, estas plantas foram submetidas a testes envolvendo avaliações de campo para doenças e características agronômicas de produtividade, em diferentes regiões edafoclimáticas

do estado de São Paulo. Ao final de mais de vinte anos de avaliações, foram selecionados seis novos híbridos resistentes ao MMA e com potencial para comercialização. Na presente pesquisa, estes novos híbridos, juntamente com seus parentais, foram avaliados quanto ao rendimento e a composição química dos seus óleos essenciais, para que se pudesse conhecer seu potencial para produção de óleos essenciais de alto valor agregado.

## **2. QUÍMICA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS**

### **2.1. O que são óleos essenciais**

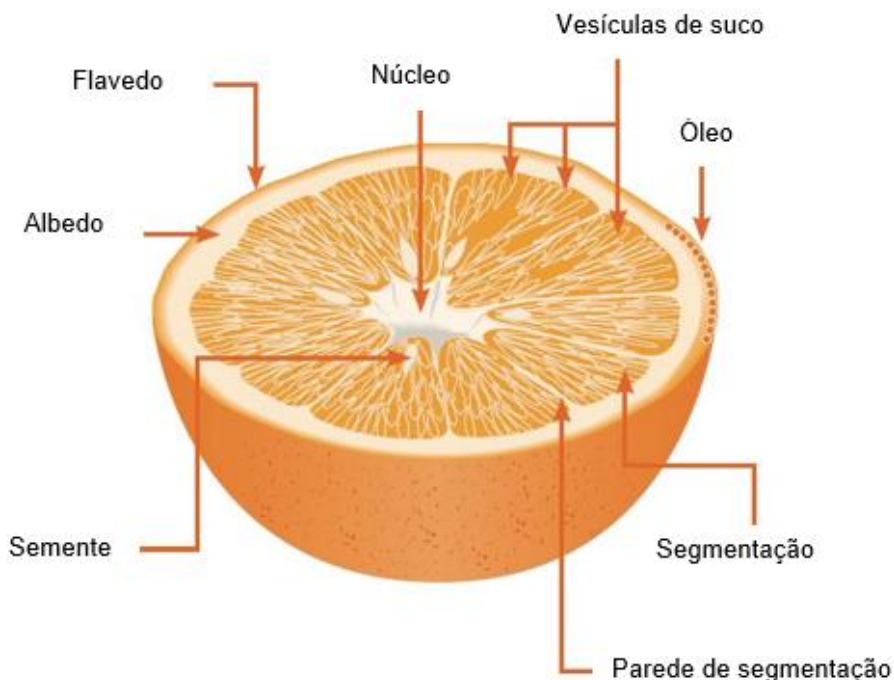
Os óleos essenciais são uma mistura complexa de constituintes voláteis biossintetizados por organismos vivos.<sup>7</sup> De acordo com a Organização Internacional de Normalização (ISO), os óleos essenciais são definidos como o produto obtido a partir de matéria-prima vegetal por extrações que envolvem métodos físicos, como a destilação com água ou vapor d'água, a prensagem mecânica do epicarpo de citros à temperatura ambiente ou, por fim, a destilação à seco. Após a extração, os óleos essenciais são separados da fase aquosa por meios físicos, como é o caso da sua diferença de densidade em relação a água.<sup>8</sup>

Os óleos essenciais são geralmente líquidos oleosos aromáticos que possuem como principal atributo o odor concentrado da planta da qual foi obtido. Geralmente são solúveis em solventes orgânicos, límpidos e raramente coloridos. Ademais, são constituídos principalmente de monoterpenos e sesquiterpenos, bem como de seus derivados oxigenados que incluem aldeídos, cetonas, ácidos, alcoóis e ésteres.<sup>9</sup>

### **2.2. Principais métodos para obtenção de óleos essenciais de citros**

De uma forma geral, os procedimentos de obtenção de óleos essenciais consistem na liberação do conteúdo presente nos tecidos vegetais para o meio externo. Assim, é de suma importância entender a localização dos óleos essenciais no vegetal. Dessa forma, temos que os frutos cítricos podem ser segmentados em duas partes principais, a casca e polpa (Figura 1). A casca por sua vez é dividida em albedo e flavedo, sendo que o flavedo é a parte externa rica em glândulas produtoras de óleos essenciais, enquanto que o albedo se localiza abaixo da camada da casca, sendo rico em pectina. Assim, os óleos essenciais dos frutos cítricos se acumulam no flavedo e, para extraí-los, é necessário promover a ruptura das glândulas secretoras localizadas no flavedo.<sup>10</sup>

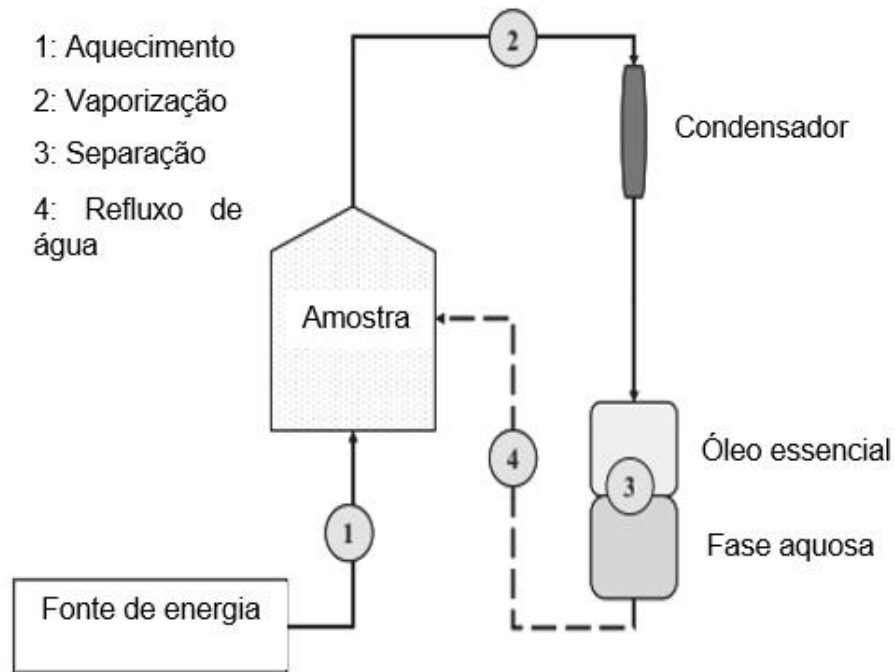
Figura 1 - Principais partes de um fruto cítrico.



Fonte: Adaptado de *The Orange Book*.

Um dos métodos mais comuns de extração dos óleos essenciais, e que também foi o utilizado nesta pesquisa, é a hidrodestilação (Figura 2). Na hidrodestilação de citros, o flavedo é armazenado em um recipiente onde será exposto à água quente ou ao vapor d'água, que em função da alta temperatura, promove a liberação e o arraste dos compostos voláteis do tecido vegetal. O vapor d'água, contendo os voláteis, passa então para um condensador onde é resfriado, voltando ao estado líquido. Por diferença de densidade o óleo essencial é separado da água. Na hidrodestilação, o tecido vegetal pode ser aquecido junto com a água para geração do vapor ou pode ficar separado da água, sendo exposto apenas aos vapores gerados pelo aquecimento da água. Em processos mais modernos, e também mais dispendiosos, pode-se associar ultrassom para auxiliar no rompimento dos tecidos vegetais (cavitação) e assim maximizar a extração e o arraste dos óleos essenciais.<sup>10</sup>

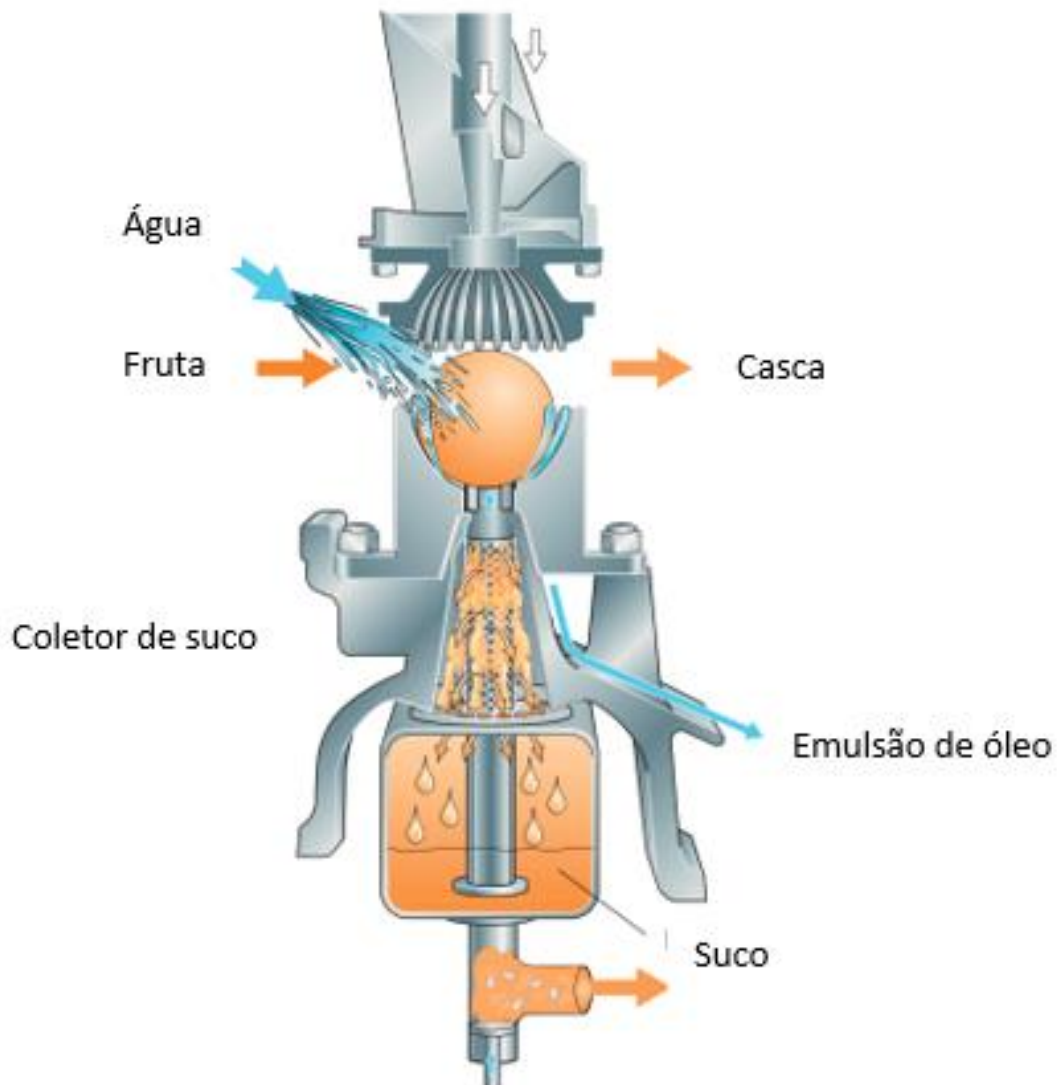
Figura 2 – Ilustração de um sistema de hidrodestilação.



Fonte: Adaptado de Sawamura (2010).

Outro método muito utilizado para a obtenção de óleos essenciais de citros é a prensagem mecânica; que é a mesma utilizada durante a prensagem dos frutos para a obtenção do suco (Figura 3). Essa extração ocorre principalmente nas indústrias de sucos de frutas cítricas. Neste caso, o óleo essencial é obtido como subproduto da fabricação do suco de citros. O processo ocorre através do esmagamento completo do fruto por prensas, que promovem a liberação do suco e dos óleos essenciais simultaneamente. Este processo gera uma emulsão de água, suco e óleos essenciais que são separados após uma etapa de centrifugação.<sup>11</sup>

Figura 3 - Operação de um extrator de suco de laranja tipo espremedor.



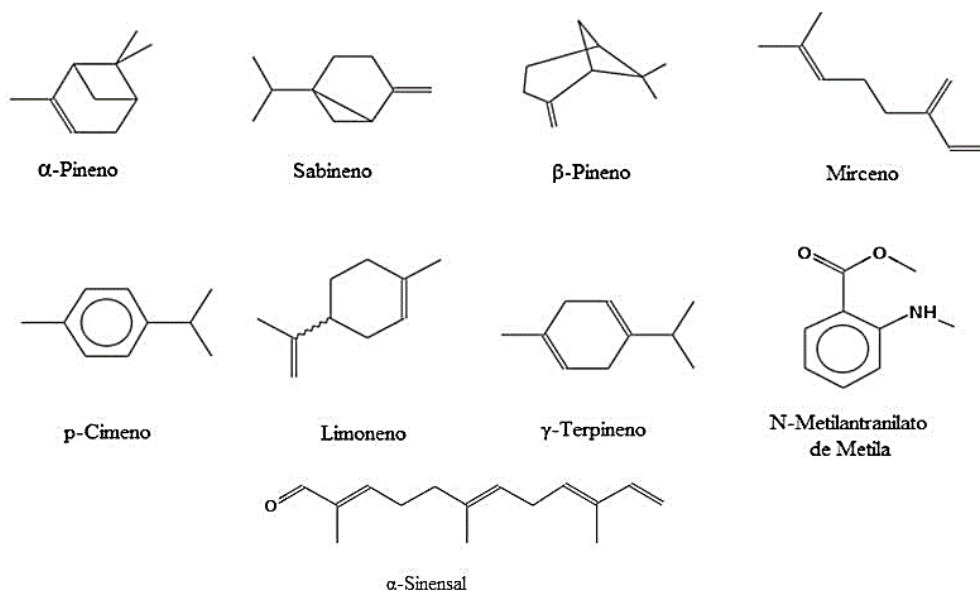
Fonte: Adaptado de *The Orange Book*.

### 2.3. Biossíntese de terpenóides

Na Figura 4, podem ser observadas as estruturas químicas de alguns dos compostos de interesse em óleos essenciais de citros. Estes compostos são produzidos através do metabolismo secundário das plantas, especialmente através das vias bioquímicas dos terpenóides e, em alguns casos, através da via do ácido chiquímico. Os terpenóides são o grupo de substâncias mais comum nos óleos essenciais de citros.<sup>12</sup>



Figura 4 - Estruturas químicas de alguns componentes presentes em óleos essenciais de *Citrus reticulata* Blanco.

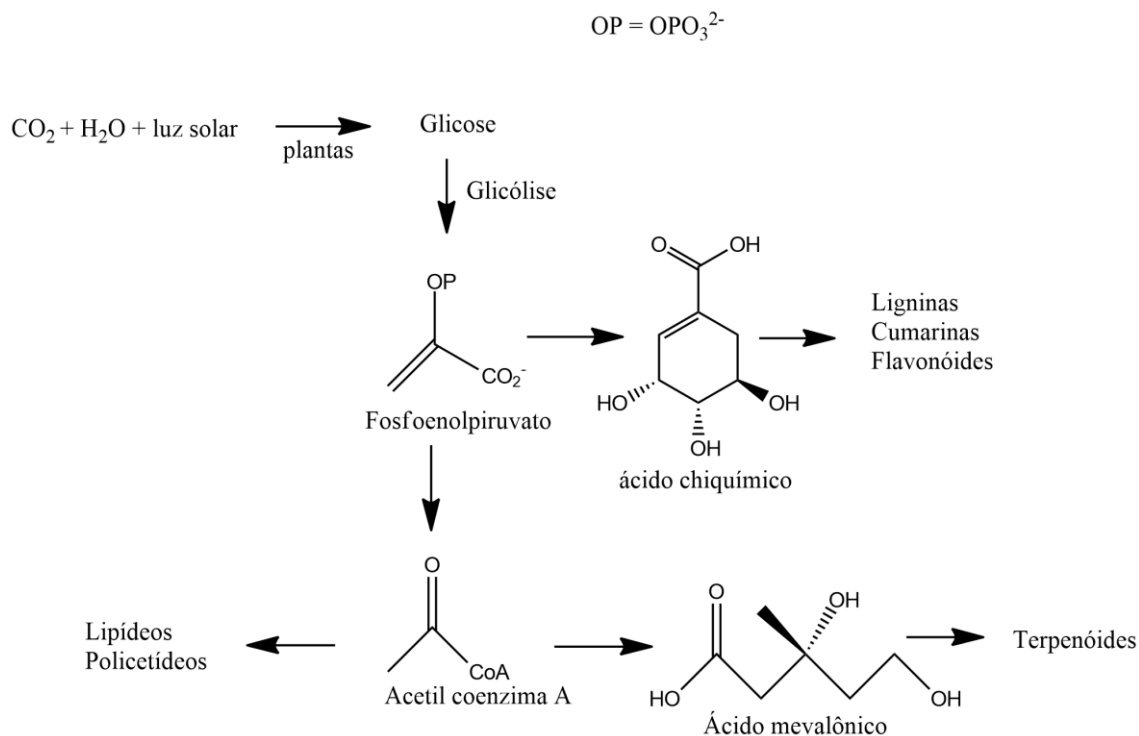


Fonte: adaptado de NIST Chemistry WebBook.

A biossíntese dos terpenóides começa com o processo de fotossíntese, no qual as plantas convertem o dióxido de carbono e a água em glicose.<sup>7,13</sup> A glicose formada pode, através da glicólise, fornecer esqueletos carbonados para a produção de fosfoenolpiruvato, que é o bloco construtor para a produção do ácido chiquímico e do ácido mevalônico.<sup>7,12</sup> Na Figura 5, pode ser visualizada a via biossintética geral pela qual são produzidos os blocos construtores dos componentes dos óleos essenciais, isto é, o ácido mevalônico e o ácido chiquímico.

O ácido mevalônico formado sofre então biotransformações relativas à eliminação do álcool terciário seguido de descarboxilação, que produz o isopentenil pirofosfato e o prenil pirofosfato. O acoplamento dessas duas unidades de 5 carbonos dá origem ao geranyl pirofosfato de 10 carbonos. Em seguida, outros acoplamentos do isopentenil pirofosfato podem gerar compostos contendo 15, 20, 25 ou mais unidades de carbono.<sup>7,14</sup>

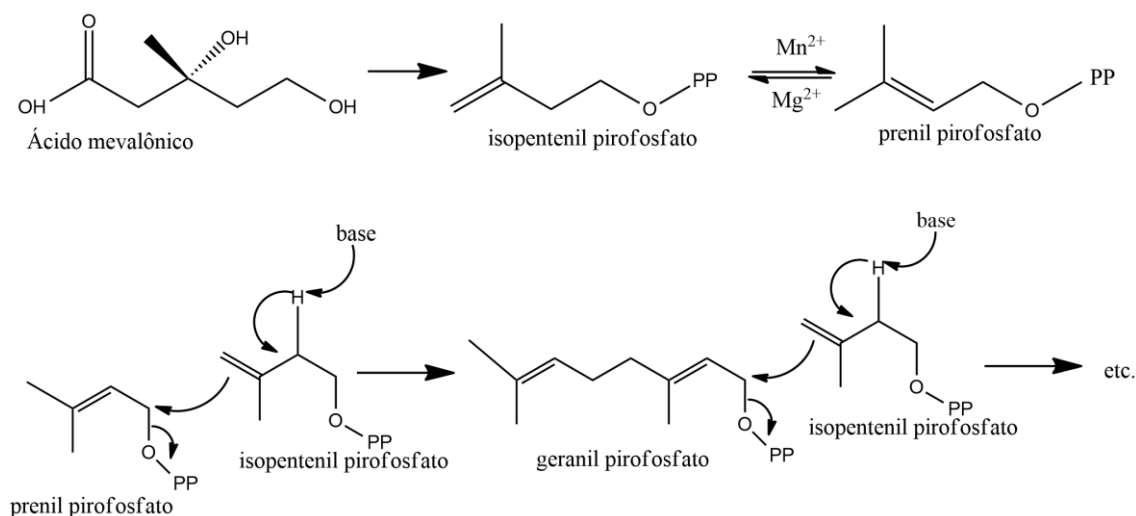
Figura 5 - Via biossintética geral pela qual são produzidos os blocos construtores dos componentes dos óleos essenciais: o ácido mevalônico e o ácido chiquímico.



Fonte: adaptado de Mann (1995) e Baser & Buchbauer (2010).

Assim, os terpenóides sempre apresentarão número de carbonos múltiplos de 5. Por exemplo, os hemiterpenos, que apresentam apenas uma unidade de isopreno apresentam 5 átomos de carbono; os monoterpenos, que apresentam duas unidades de isopreno possuem 10 átomos de carbono; e os sesquiterpenos que apresentam três unidades de isopreno possuem 15 átomos de carbono.<sup>12</sup> Em resumo, a biossíntese dos componentes dos óleos essenciais ocorre pelo acoplamento de unidades isopreno para formação dos terpenóides. A rota biossintética de produção dos terpenóides pela associação de blocos construtores de cinco carbonos é apresentada na Figura 6.

Figura 6 - Rota biossintética de produção dos terpenóides pela associação de blocos construtores de cinco carbonos.

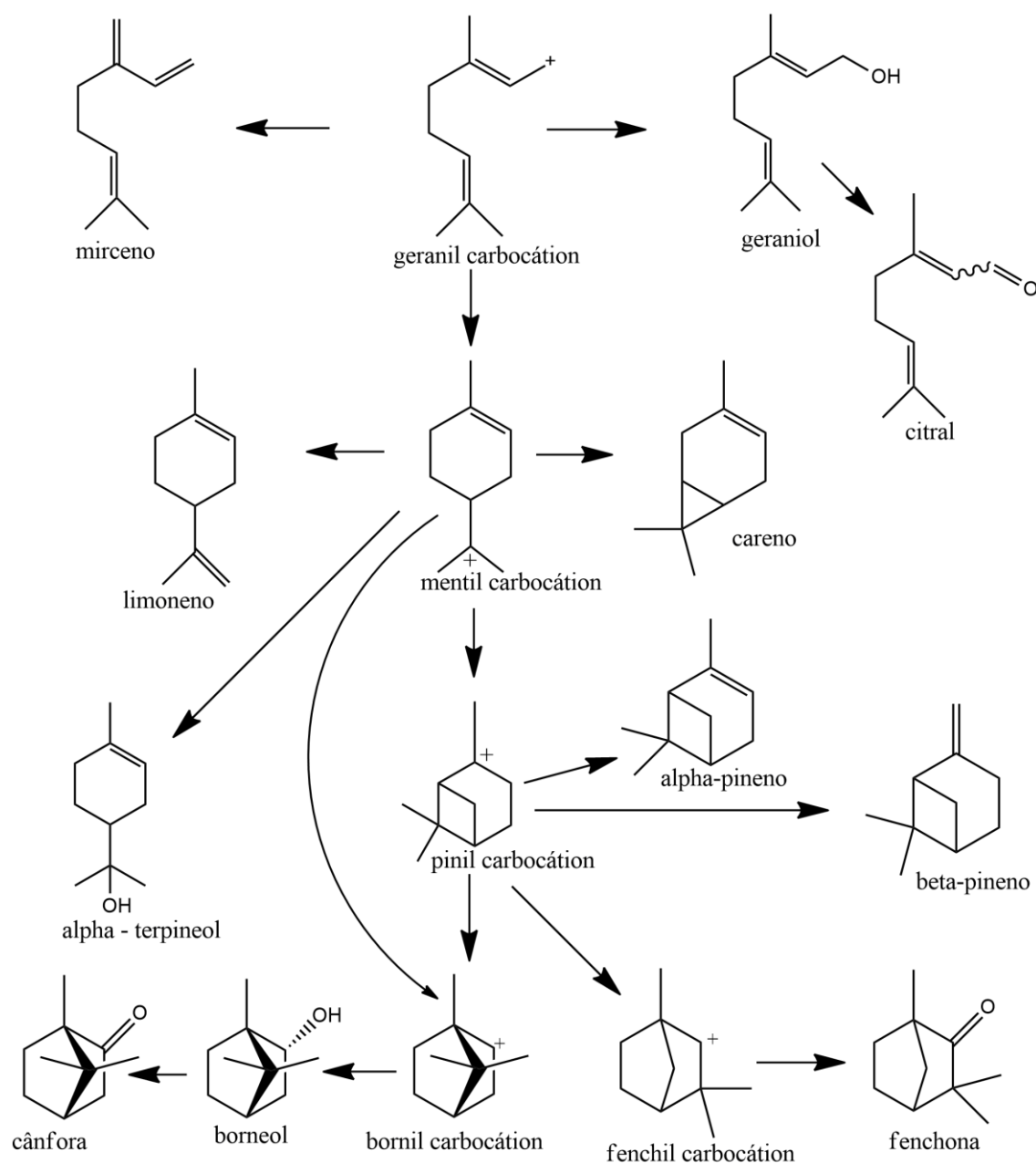


Fonte: adaptado de Mann (1995) e Baser & Buchbauer (2010).

Por fim, a partir do geranyl pirofosfato produzido na rota biossintética anterior é possível chegar aos monoterpenóides, conforme ilustrado na Figura 7. Por exemplo, a quebra heterolítica da ligação carbono-oxigênio gera o geranyl carbocátion, e a reação do geranyl carbocátion com a água produz o terpeno geraniol que pode ser oxidado ao terpeno citral.<sup>12</sup> Alternativamente, a perda de um próton do geranyl carbocátion produz o terpeno mirceno.<sup>7,12</sup> Além disso, uma adição eletrofílica intramolecular do geranyl carbocátion produz um carbocátion monocíclico, e se houver a eliminação de um próton, forma-se o limoneno.<sup>7</sup> A partir do limoneno, pode ocorrer a formação do  $\alpha$ -terpineol através da adição de água.

Partindo-se do carbocátion monocíclico, uma segunda adição intramolecular produz o pinil carbocátion, que pode perder um próton e produzir o  $\alpha$ -pineno e/ou o  $\beta$ -pineno. O pinil carbocátion também pode ser gerado a partir de um rearranjo do mentil carbocátion. O careno pode ser produzido por reações similares. Enquanto que o rearranjo de Wagner-Meerwein do pinil carbocátion produz o bornil carbocátion que em presença de água gera o borneol. Esse, quando submetido a uma oxidação, produz a cânfora. Alternativamente, o rearranjo de Wagner-Meerwein produz o esqueleto carbonado fenchil, o qual pode produzir a fenchona.<sup>7</sup>

Figura 7 - Rota biossintética de produção de alguns monoterpenóides.



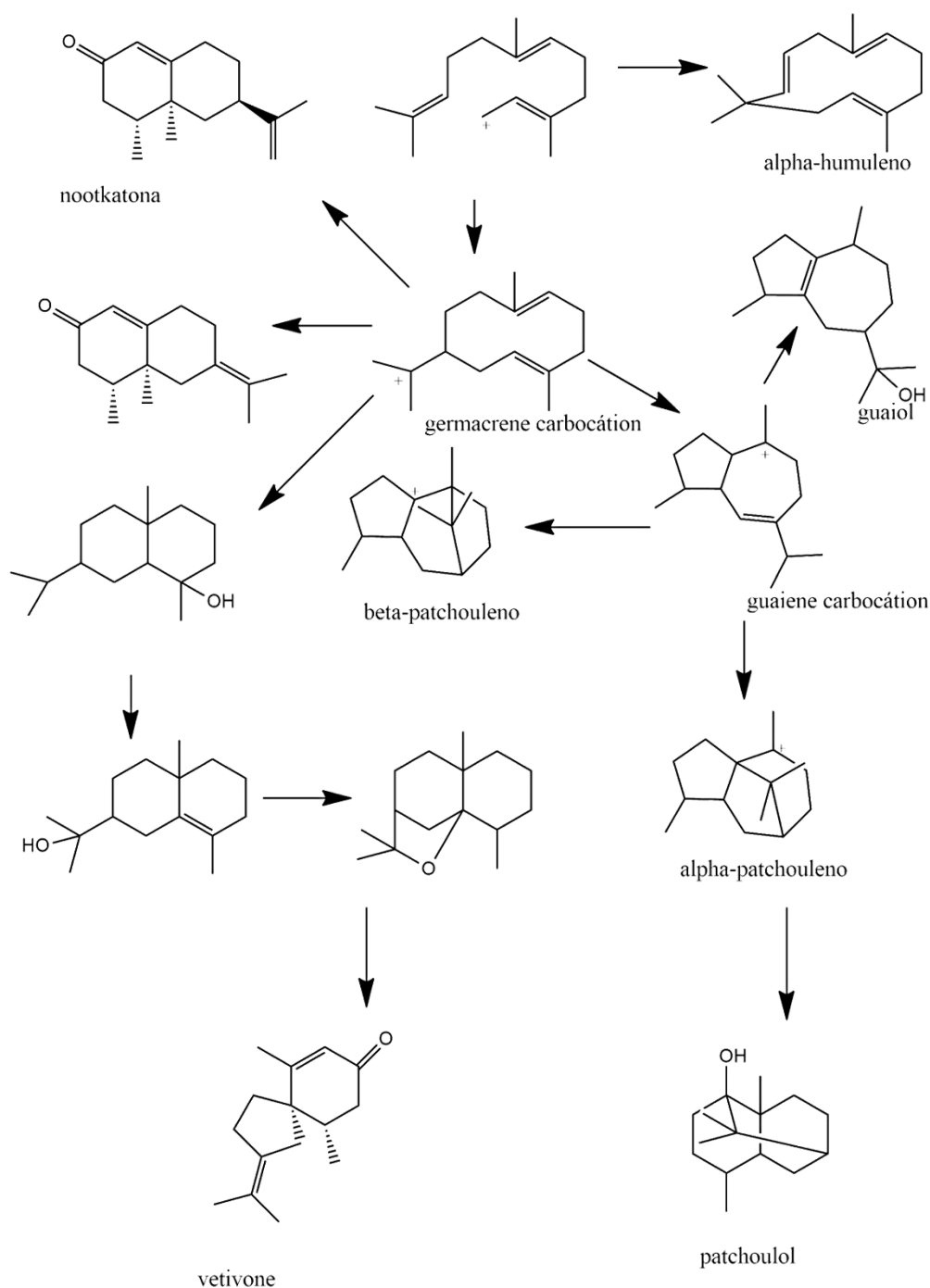
Fonte: adaptado de Mann (1995) e Baser & Buchbauer (2010).

É importante ressaltar que todas essas reações de produção de monoterpenóides são realizadas a partir de enzimas da própria planta. Assim, a composição dos óleos essenciais pode fornecer importantes informações sobre a genética da planta a partir da qual o óleo essencial foi obtido.<sup>7,12,13,14</sup>

No caso da biossíntese de sesquiterpenos, inicialmente pode ocorrer a ciclização do cátion para o C<sub>11</sub>, seguida da perda de um próton, originando o  $\alpha$ -humuleno.<sup>12</sup> A ciclização do mesmo carbocátion, porém em uma ligação diferente, produz um carbocátion com o esqueleto carbonado semelhante ao germacreno,

sendo que esse carbocátion é um intermediário na biossíntese de outros sesquiterpenos, como a nootkatona e a  $\alpha$ -vetivona.<sup>7</sup> A Figura 8 ilustra a biossíntese de sesquiterpenos.

Figura 8 - Rota biossintética de alguns sesquiterpenos.

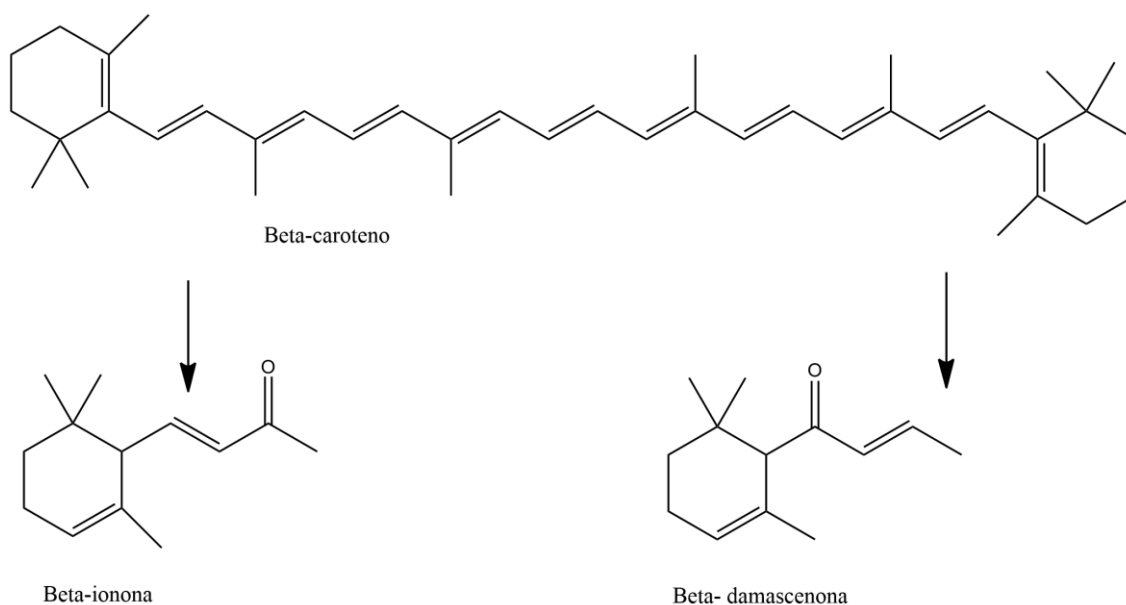


Fonte: adaptado de Mann (1995) e Baser & Buchbauer (2010).

Outra via importante para síntese de terpenóides é a degradação de carotenóides. Essa degradação pode ocorrer por ação enzimática, ou por foto e termo decomposição. Por exemplo, o  $\beta$ -caroteno quando sofre estas degradações pode

originar iononas e damascenonas. Nas iononas ocorre a oxigenação em três carbonos distantes do anel terminal, enquanto que nas damascenonas, a oxigenação ocorre no carbono próximo ao anel.<sup>7</sup> Na Figura 9, pode-se observar a formação de  $\beta$ -ionona e  $\beta$ -damascenona a partir da degradação do  $\beta$ -caroteno.

Figura 9 - Formação de  $\beta$ -ionona e  $\beta$ -damascenona a partir da degradação do  $\beta$ -caroteno.



Fonte: adaptado de Baser & Buchbauer, 2010.

Os principais constituintes dos óleos essenciais de tangerinas são terpenos como o limoneno e o  $\gamma$ -terpineno sendo que ambos apresentam importantes propriedades antibacterianas que podem ser exploradas em fitoterapia ou na formulação de produtos de limpeza.<sup>9,15,16</sup> Por outro lado, em laranjas, o principal componente é o limoneno, geralmente correspondendo a cerca de 96%.<sup>17</sup> Na Tabela 1, encontram-se alguns dos requisitos de qualidade para comercialização de óleos essenciais de tangerinas (*Citrus reticulata* Blanco) pelas normas da International Standard Organization (ISO) e pela Farmacopéia Européia.<sup>18</sup>

Tabela 1. Requisitos de qualidade de óleos essenciais de tangerinas (*Citrus reticulata* Blanco) pelas normas da International Standard Organization (ISO) e pela Farmacopéia Européia (FE).

Componente	FE (% mín - max)	ISO (% mín - máx)	Descritor de odor
$\alpha$ -pineno	1,6 a 3	2 a 3	pinho, terebintina
sabineno	< 0,3	-	pimenta, madeira,
$\beta$ -pineno	1,2 a 2,0	1,2 a 2	pinho, resina,
mirceno	1,5 a 2,0	1,5 a 2	Balsâmico
p-cimeno	< 1,0	-	cítrico, solvente
limoneno	65,0 a 75,0	65,0 a 75,0	limão, laranja
$\gamma$ -terpineno	16,0 a 22,0	14,0 a 22,0	Terebintina
antranilato de metila	0,3 a 0,6	0,3 a 0,6	floral, frutado, mel,
$\alpha$ -sinensal	-	0,1 a 0,5	cítrico, doce, frescor

Adaptado de Martins, et al., 2011.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo Geral

Conhecer o potencial de novos híbridos obtidos pelo cruzamento de Tangerina Murcott (*Citrus reticulata* Blanco x *Citrus sinensis*) e Laranja-Pêra (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) para produção de óleos essenciais com alto valor agregado.

#### 3.2. Objetivos Específicos

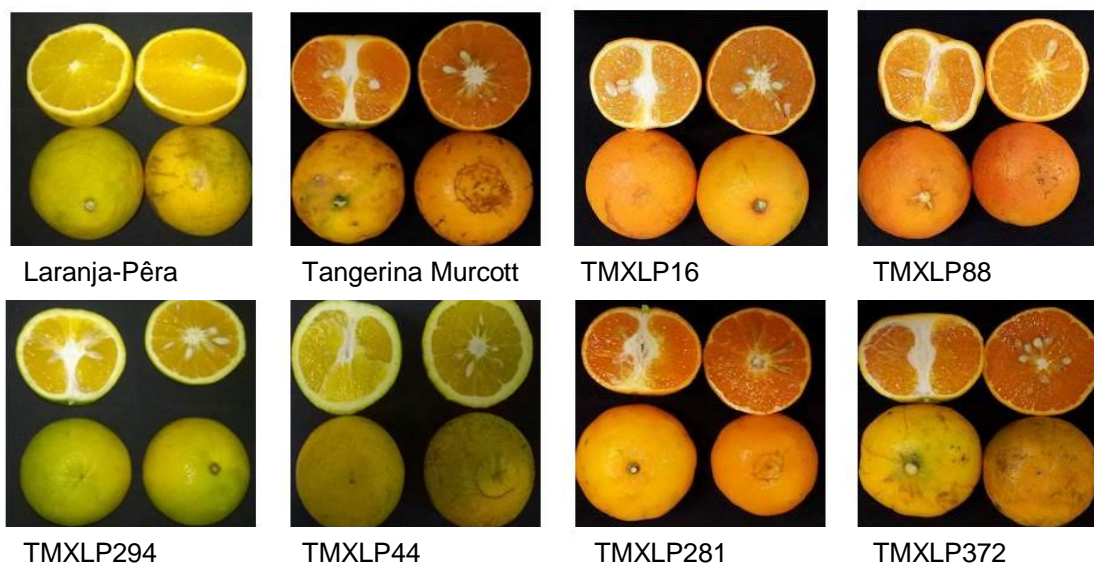
- Quantificar (% v/m) o teor de óleos essenciais da casca das novas variedades de citros (parentais e híbridos) por hidrodestilação.
- Caracterizar os óleos essenciais obtidos por GC-MS e semi-quantificar o teor dos componentes destes óleos essenciais por GC-FID.
- Correlacionar os dados qualitativos e semi-quantitativos dos óleos essenciais com as demandas do mercado consumidor indicando as potencialidades dos óleos para determinados mercados, isto é, indústria de alimentos, farmacêutica, fragrâncias, etc.
- Realizar uma análise de componentes principais nos resultados obtidos pela caracterização e quantificação dos óleos essenciais com a finalidade de discriminar os novos híbridos em relação aos seus parentais.

## 4. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

### 4.1. Amostras

Foram obtidas oito amostras de frutos cítricos junto ao Instituto Agronômico de Campinas (IAC) - Centro de Citricultura “Sylvio Moreira” de Cordeirópolis – SP. As amostras eram compostas pelos parentais de Tangerina Murcott (*Citrus reticulata* Blanco x *Citrus sinensis*) e Laranja-Pêra (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) e os novos híbridos obtidos pelo cruzamento destes parentais denominados de: TMXLP16, TMXLP44, TMXLP88, TMXLP281, TMXLP294, TMXLP372. Com a finalidade de obter uma amostra representativa de cada citro, os frutos maduros foram colhidos de forma aleatória em pelo menos 3 diferentes árvores e em diferentes alturas das copas das árvores. Uma vez colhidas, as amostras foram imediatamente transportadas para o IQSC - USP para as análises. Na Figura 10 podem ser visualizadas as fotos das frutas que foram alvo deste estudo.

Figura 10 - Fotografia dos frutos Tangerina Murcott (*Citrus reticulata* Blanco x *Citrus sinensis*) e Laranja-Pêra (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) e os novos híbridos obtidos pelo cruzamento destes parentais: TMXLP16, TMXLP44, TMXLP88, TMXLP281, TMXLP294, TMXLP372.



Fonte: Autoria própria.

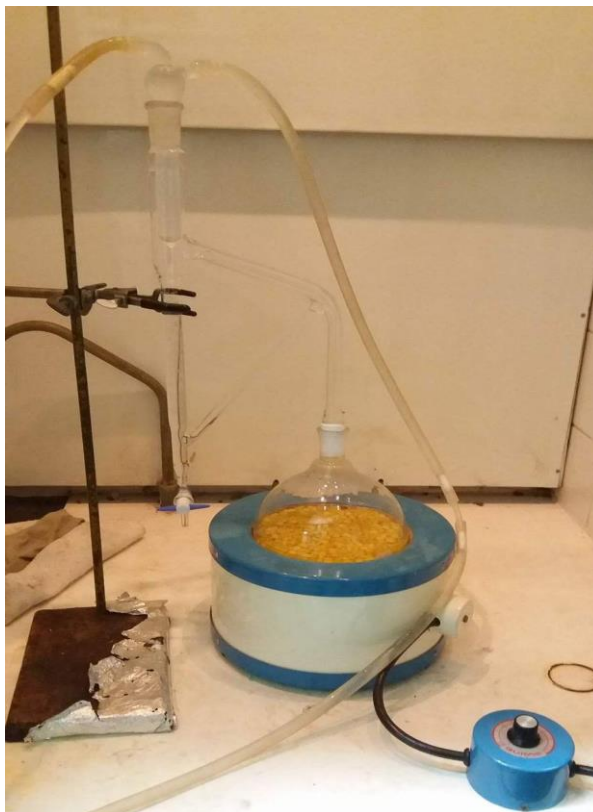
### 4.2. Extração dos óleos essenciais

Os óleos essenciais presentes nas cascas dos frutos dos parentais e dos novos híbridos foram obtidos via hidrodestilação, utilizando um aparelho do tipo



Clevenger modificado. Na Figura 11, é apresentada uma foto do aparelho de hidrodestilação utilizado nesta pesquisa.

Figura 11 - Fotografia do aparato de hidrodestilação tipo Clevenger modificado para extração de óleos essenciais.



Fonte: Autoria própria.

Para o procedimento de hidrodestilação, as cascas de, no mínimo, cinco frutos foram removidas, cortadas em pedaços pequenos de aproximadamente  $1\text{ cm}^2$  e colocadas em balão de fundo redondo de 2 L. A seguir, foram adicionados 1,5 litros de água destilada sobre as cascas. Montou-se o aparato de destilação conforme pode ser visualizado na Figura 11. O balão foi colocado sobre uma manta de aquecimento e as mangueiras de água para resfriamento e condensação do destilador foram conectadas a um banho termostático mantido a temperatura de  $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Acionou-se o aquecimento da manta e realizou-se a hidrodestilação por 1 hora. O teor de óleo essencial obtido foi quantificado (% m/v) por inspeção visual na escala graduada do destilador de Clevenger. A seguir, o óleo essencial foi recolhido utilizando uma pipeta de Pasteur e, posteriormente foi seco em sulfato de sódio anidro para eliminar resíduos de água, sendo imediatamente armazenado em atmosfera de nitrogênio, em

frasco âmbar dotado de tampa de rosca e septo PTFE/Silicone a -20 °C até o momento das análises. O tempo entre a obtenção dos óleos essenciais e as análises cromatográficas não foi superior a uma semana.

#### **4.3. Análise dos óleos essenciais por GC-FID e GC-MS**

Para as análises, os óleos essenciais foram diluídos em diclorometano (30% v/v) e injetados em um cromatógrafo a gás acoplado a um espectrômetro de massas quadrupolar (GC-MS), marca Shimadzu, modelo GC-2010 plus, dotado de uma coluna capilar de sílica fundida VF-5MS (30 m x 0,25 mm, d.i. x 0,25 µm), sob as seguintes condições cromatográficas: injetor a 220 °C operando em modo split 1:150 por 1,0 min; gás de arraste hélio a 0,6 mL/min; rampa de temperatura do forno: iniciando a 60 °C, com incremento de 2 °C/min até 170 °C; seguido de um incremento de 15° C/min até 240°C; interface a 240 °C, fonte de ionização por elétrons +70 eV, 35-350 m/z. Uma solução de n-alcanos (C<sub>7</sub>-C<sub>30</sub>) foi injetada no GC-MS sob as mesmas condições da amostra, para se obter os índices de retenção de temperatura programada (LTPRI—*linear temperature programmed retention index*) dos compostos voláteis.

A identificação tentativa dos analitos foi realizada comparando-se os LTPRI e os espectros de massa obtidos para a amostra com os espectros de massa e LTPRI da literatura (NIST, 2008), com similaridade de, no mínimo, 85 % para os espectros de massa, e variação máxima nos LTPRI de  $\pm 10$ . A confirmação da identidade dos analitos foi realizada pela co-injeção de padrões autênticos sempre que estes estavam disponíveis.

Para a determinação semi-quantitativa (% relativa de área) dos componentes do óleo essencial foi utilizado um cromatógrafo a gás acoplado a um detector de ionização em chama (GC-FID) marca Shimadzu modelo GC-2010 plus, sob as mesmas condições de análise descritas para o GC-MS. Para esta última análise, os fatores de resposta diferencial do detector de ionização em chama foram considerados como iguais a 1. Todas as análises cromatográficas foram realizadas em triplicata.

#### **4.4. Análises estatísticas e quimiometria**

As médias obtidas para os resultados de área e % relativa de área dos componentes dos óleos essenciais, obtidos por GC-FID, foram comparados utilizando-se ANOVA e teste de Tukey, com nível de confiança de 95%. A análise

estatística foi realizada utilizando o software Statistica 7.0 (Statsoft, USA). Além disso, foi realizada uma Análise de Componentes Principais (PCA) para melhor visualização do comportamento das amostras em relação aos componentes dos óleos essenciais, bem como suas correlações. A PCA foi realizada utilizando o software Matlab v.7.12 (Mathworks, USA).

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Rendimento de extração e produtividade de óleo essencial

O rendimento de extração dos óleos essenciais para cada citro investigado foi quantificado e expresso em % v/m, isto é, mL de óleo essencial por 100 g de casca. Os resultados de rendimento podem ser visualizados na Tabela 2.

Tabela 2. Rendimento de óleo essencial para as amostras de Tangerina Murcott (*Citrus reticulata* Blanco x *Citrus sinensis*) e Laranja-Pêra (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) e os novos híbridos obtidos pelo cruzamento destes parentais: TMXLP16, TMXLP44, TMXLP88, TMXLP281, TMXLP294, TMXLP372.

Amostras	Rendimento (mL/100 g)
L. Pêra	0,48
T. Murcott	0,39
TMXLP16	0,59
TMXLP44	0,35
TMXLP88	0,34
TMXLP281	0,47
TMXLP294	0,35
TMXLP372	0,38

Fonte: Autoria própria.

Percebe-se que a amostra que apresentou o maior rendimento de extração foi a TMXLP16 (0,59 mL/100g), enquanto que a TMXLP88 foi a que apresentou o menor rendimento (0,34 mL/100g).

No entanto, na Tabela 3 podem ser observados os resultados de produtividade de óleo essencial por hectare para cada um dos citros investigados considerando-se a % de casca por fruto e o rendimento de extração dos óleos essenciais.

Tabela 3. Produtividade de óleo essencial em litros por hectare para os parentais e os seis novos híbridos de citros.

Variedade	kg fruto/ hectare	% de casca no fruto	kg casca/ hectare	% óleo essencial (mL/100g)	Produtividade (L/hectare)
L. Pêra	24420	18,17	4437	0,48	21
T. Murcott	10082	12,35	1245	0,39	5
TMXLP16	15614	17,19	2684	0,59	16
TMXLP44	36537	28,5	10413	0,35	36
TMXLP88	19055	27,88	5312	0,34	18
TMXLP281	20026	17,01	3406	0,49	17
TMXLP294	24235	24,23	5872	0,35	21
TMXLP372	6012	15,87	954	0,38	04

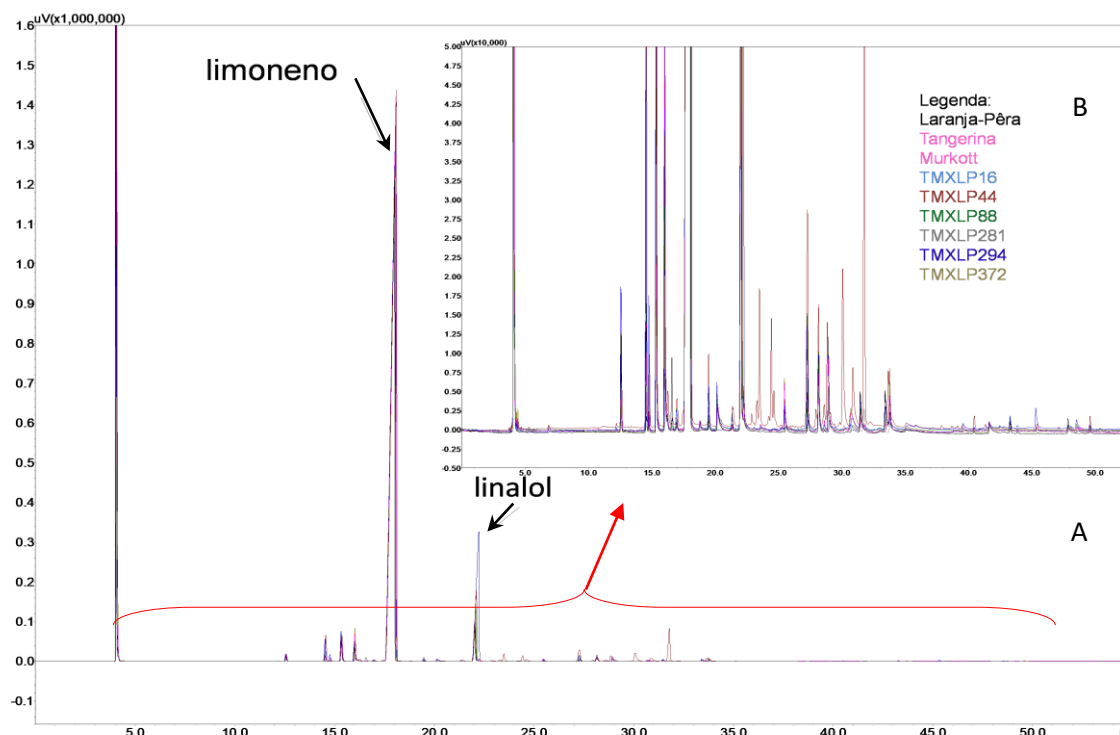
Fonte: Autoria própria.

É possível observar que o híbrido que produziu a maior quantidade de litros de óleo essencial por hectare é TMXLP44 (36 L/ha), seguida do parental Laranja-Pêra e do híbrido TMXLP294 (21 L/ha). Considerando-se apenas o rendimento de extração (% v/m) e a produtividade (L/hectare) é possível afirmar que os híbridos TMXLP44 e TMXLP294 são os mais interessantes para propagação com a finalidade de produção de óleo essencial de citros.

## 5.2. Análise dos óleos essenciais por GC-FID e GC-MS

As oito amostras tiveram seus óleos essenciais extraídos, quantificados, e injetados no GC-MS e no GC-FID. Na Figura 12, podem ser visualizados os cromatogramas de GC-FID. Pode-se facilmente perceber que os parentais e os seis híbridos apresentam um perfil cromatográfico muito distinto.

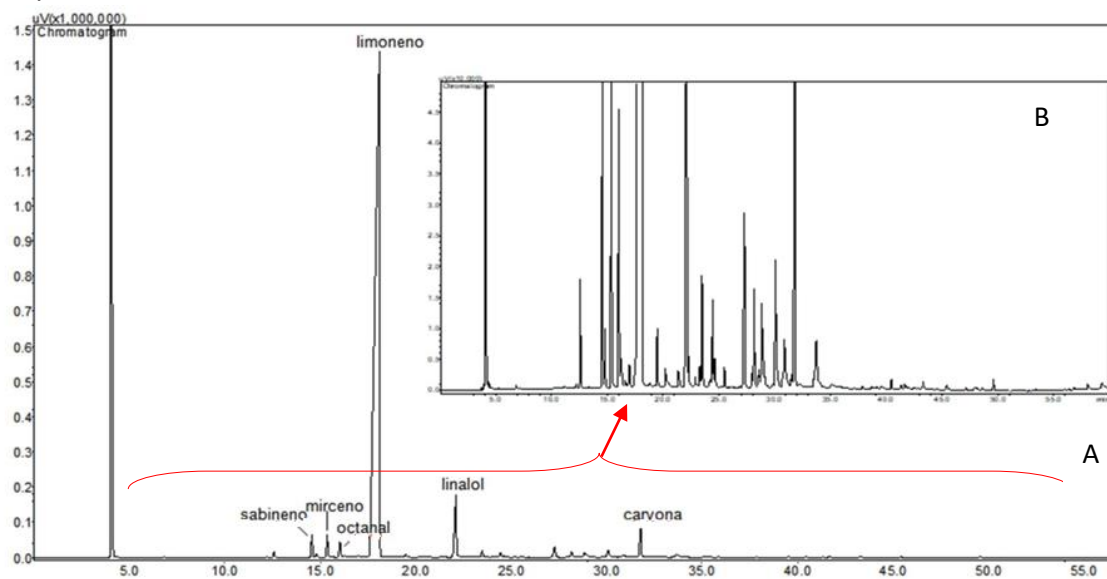
Figura 12 - Comparação dos cromatogramas dos óleos essenciais de todas as amostras investigadas por GC-FID. Destaque para os compostos majoritários limoneno e linalol. A = cromatograma total; B= ampliação do cromatograma A, a partir de 5 minutos até 55 min.



Fonte: Autoria própria.

Por outro lado, na Figura 13 é ilustrado o cromatograma do híbrido TMXLP44, bem como a posição dos compostos com porcentagem relativa maior que 0,90%.

Figura 13 - Cromatograma do híbrido TMXLP44. Destaque para os compostos majoritários: sabineno, mirceno, octanal, limoneno, linalol e carvona. A = cromatograma total; B= ampliação do cromatograma A, a partir de 5 minutos até 55 min.



Fonte: Autoria própria.

As amostras foram avaliadas de forma qualitativa e semi-quantitativa, sendo que, se considerarmos todas as amostras, foram encontrados um total de 74 compostos voláteis diferentes. Estes compostos podem ser agrupados segundo suas classes químicas em terpenos (35%), álcoois (22%), aldeídos (19%), ésteres (11%), cetonas (7%), óxidos (4%) e alcanos (2%). O número de componentes encontrados e a predominância dos terpenos em óleos essenciais de citros são dados corroborados por referências da literatura.<sup>15,19</sup> Na Tabela 4, são apresentados os compostos identificados nos óleos essenciais e suas respectivas semi-quantificações por GC-FID.

Para as amostras estudadas, a porcentagem de componentes identificados corresponde respectivamente a 99,78% em Laranja-Pêra, 99,76% em Tangerina Murcott, 99,83% em TMXLP16, 98,84% em TMXLP44, 99,81% em TMXLP88, 99,64% em TMXLP281, 99,82% em TMXLP294 e 99,74% em TMXLP372. A amostra com o maior número de componentes identificados foi a TMXLP44, apresentando 64 compostos voláteis. Por outro lado, as amostras que apresentaram o menor número de componentes identificados foram a Tangerina Murcott e o híbrido TMXLP372, com apenas 41 compostos voláteis identificados.

Quando comparamos a composição dos óleos essenciais das amostras, verificamos diferenças consideráveis nas suas semi-quantificações. Em todas as amostras, o composto majoritário foi o limoneno, variando de 83,52% (para a amostra TMXLP294), a 92,37% (para a Tangerina Murcott). O limoneno é um hidrocarboneto cíclico insaturado que pertence à família dos terpenos.<sup>12</sup> Esse composto é abundantemente encontrado nos óleos essenciais de citros.<sup>15,19</sup> Sua fórmula molecular é  $C_{10}H_{16}$  e apresenta aroma com notas de frutas cítricas.<sup>15,18</sup> Ele tem sido utilizado na indústria alimentícia como aditivo em bebidas e gomas de mascar devido às suas propriedades flavorizantes. Além disso, pode ser utilizado na fabricação de fragrâncias e também como inseticida natural.<sup>15</sup>

Tabela 4. Caracterização dos componentes dos óleos essenciais dos parentais Laranja-Pêra (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) e Tangerina Murcott (*Citrus reticulata* Blanco x *Citrus sinensis*) e seus seis híbridos: TMXLP16, TMXLP44, TMXLP88, TMXLP281, TMXLP294 e TMXLP372.

Composto	LTPRI <sub>calc.</sub>	LTPRI <sub>Lit.</sub>	Δ	L. PERA	MURCOTT	TMXLP16	TMXLP44	TMXLP88	TMXLP281	TMXLP294	TMXLP372
nonano <sup>B</sup>	901	900	-1	-	-	tr	tr	-	-	-	-
heptanal <sup>B</sup>	908	902	-6	-	-	-	tr	-	-	-	-
α-thujeno <sup>B</sup>	926	932	6	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
α-pineno <sup>A</sup>	934	942	8	0,29b	0,29b	0,32a	0,30a,b	0,32a	0,29b	0,19d	0,24c
campheno <sup>B</sup>	951	954	3	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
sabineno <sup>B</sup>	974	979	5	0,36d	0,28e	1,05b	1,18a	0,62c	0,66c	0,04g	0,16f
β-pineno <sup>A</sup>	981	984	3	0,03d,e	0,05c	0,33a	0,18b	0,05c	0,05c	0,04d	0,03e
mirceno <sup>B</sup>	991	992	1	1,47a	1,38a,b	1,47a	1,26c	1,46a	1,33b,c	1,16d	1,32b,c
octanal <sup>A</sup>	1008	1003	-5	1,11d	1,51b	0,95e	0,91e	1,23c,d	1,31c	0,18f	1,79a
3-careno <sup>B</sup>	1012	1008	-4	0,28a	-	-	0,02c	-	-	0,04b	-
α-terpineno <sup>B</sup>	1020	1020	0	0,05e	0,03f	0,07c	0,10a	0,08b	0,07d	tr	0,02g
limoneno <sup>B</sup>	1037	1037	0	91,47b	92,37a	91,50b	84,93e	89,99c	88,50d	83,52f	91,38b
β-ocimeno <sup>A</sup>	1048	1050	2	tr	0,03a	0,02a	tr	0,03a	0,03a	0,03a	0,03a
γ-terpineno <sup>A</sup>	1060	1060	0	0,07e	0,05f	0,12c	0,17a	0,14b	0,11d	tr	0,03g
octanol <sup>B</sup>	1075	1074	-1	0,20b	0,14c	0,23b	0,09d	0,20b	0,27a	-	0,22b
terpinoleno <sup>B</sup>	1088	1089	1	0,07a	0,02e	0,03c	0,04b	0,03c	0,03d	0,02e	tr
óxido de linalol <sup>B</sup>	1091	1089	-2	-	-	-	tr	tr	tr	tr	-
undecano <sup>A</sup>	1100	1101	1	-	-	tr	-	-	-	-	-
linalol <sup>B</sup>	1105	1103	-2	2,92d	2,37d,e	2,04f	4,50c	4,14c	5,49b	13,60a	2,80d,e
nonanal <sup>B</sup>	1109	1104	-5	0,07c	0,13a,b	0,14a,b	0,12b	0,04c	0,17a,b	-	0,18a
1,3,8-p-mentatrieno <sup>B</sup>	1118	1119	1	-	-	-	0,04a	tr	tr	-	-
trans-p-menta-2,8-dien-1-ol <sup>B</sup>	1127	1126	-1	tr	-	tr	0,39a	tr	0,04b	tr	-
óxido de limoneno <sup>B</sup>	1137	1134	-3	-	-	-	0,03a	tr	tr	-	-
cis-p-menta-2,8-dien-1-ol <sup>B</sup>	1141	1138	-3	tr	tr	tr	0,32a	tr	0,02b	tr	tr
cânfora <sup>B</sup>	1152	1144	-8	tr	-	tr	tr	tr	tr	-	-
citronelal <sup>B</sup>	1155	1152	-3	0,04d	0,19b	0,10c	0,08c	0,02e	0,10c	0,09c	0,23a

(Continua)

## (Continuação da Tabela 4)

borneol <sup>B</sup>	1178	1175	-3	tr	tr	-	-	tr	-	tr	tr
isopinocanfona <sup>B</sup>	1181	1182	1	-	-	-	tr	-	-	-	-
nonanol <sup>B</sup>	1181	1171	-10	-	-	tr	-	-	tr	-	tr
terpinen-4-ol <sup>B</sup>	1184	1186	2	0,18d	0,12e	0,32c	0,86a	0,41b	0,28c	0,04f	0,09e
trans-p-menta-1(7),8-dien-2-ol <sup>B</sup>	1194	1184	-10	tr	tr	tr	0,06a	tr	-	tr	tr
α-terpineol <sup>A</sup>	1200	1207	7	0,33a,b	0,20d	0,24c,d	0,36a	0,30b	0,30b	0,29b	0,24c
trans-dihidrocarvona <sup>B</sup>	1204	1205	1	-	0,03b	-	0,09a	-	-	-	0,05b
decanal <sup>A</sup>	1210	1209	-1	0,24c,d	0,21d	0,25b,c,d	0,22d	0,29b,c	0,46a	0,05e	0,30b
trans-carveol <sup>B</sup>	1226	1220	-6	-	-	-	0,70a	-	-	-	-
nerol <sup>A</sup>	1230	1232	2	tr	tr	tr	-	-	-	tr	0,02a
citronelol <sup>A</sup>	1234	1236	2	0,05d	0,23b	0,12c	0,04d	0,04d	0,03d	0,03d	0,31a
cis-carveol <sup>B</sup>	1239	1230	-9	-	-	-	0,37a	-	0,07b	tr	-
neral <sup>A</sup>	1244	1242	-2	0,24a	0,05e	0,11c	0,06d,e	0,11c	tr	0,17b	0,07d
carvona <sup>A</sup>	1251	1246	-5	tr	0,03c	0,02c	1,90a	tr	0,15b	tr	0,04c
geraniol <sup>B</sup>	1261	1256	-5	tr	-	-	tr	tr	-	tr	-
trans-2-decenal <sup>B</sup>	1263	1260	-3	-	-	-	-	tr	tr	-	-
geranial <sup>A</sup>	1275	1270	-5	0,27a	0,03d,e	0,11c	0,03d,e	0,12c	tr	0,17b	0,05d
aldeído perílico <sup>B</sup>	1281	1274	-7	0,08d,e	0,16b	0,06e	0,21a	0,10c,d,e	0,14b,c	0,12b,c,d	0,24a
α-terpinen-7-al <sup>B</sup>	1294	1286	-8	-	-	-	0,03a	-	-	-	-
álcool perílico <sup>B</sup>	1301	1295	-6	tr	tr	-	0,03a	-	0,04a	-	tr
undecanal <sup>B</sup>	1313	1307	-6	tr	tr	tr	tr	-	tr	-	tr
acetato de mirtenila <sup>B</sup>	1327	1327	0	-	-	-	tr	-	-	-	-
acetato de trans-carveol <sup>B</sup>	1337	1338	1	-	-	-	tr	-	-	tr	-
α-cubebeno <sup>B</sup>	1346	1350	4	tr	-	-	tr	-	-	tr	-
acetato de α-terpenila <sup>A</sup>	1350	1351	1	-	-	tr	tr	-	-	tr	-
acetato de citronelila <sup>B</sup>	1355	1354	-1	-	tr	tr	tr	-	-	-	tr
acetato de cis-carveol <sup>B</sup>	1363	1365	2	-	-	-	0,02a	-	-	-	-
acetato de nerila <sup>B</sup>	1365	1365	0	-	0,02a,b	0,03a	-	-	-	tr	0,03a
α-copaeno <sup>B</sup>	1374	1377	3	tr	tr	tr	0,04a	tr	tr	tr	tr
acetato de geranila <sup>B</sup>	1386	1382	-4	-	-	-	-	-	-	0,04a	-

(Continua)



**Conclusão da Tabela 4**

$\beta$ -elemeno <sup>B</sup>	1389	1394	5	tr	tr	tr	tr	tr	tr	-	tr
butirato de octila <sup>B</sup>	1395	1394	-1	-	-	-	tr	-	-	-	-
dodecanal <sup>B</sup>	1416	1413	-3	-	-	-	-	tr	tr	-	-
cariofileno <sup>B</sup>	1418	1420	2	0,05a	-	0,04b,c	0,02d	0,04a,b	-	0,03c,d	-
$\alpha$ -humuleno <sup>B</sup>	1455	1456	1	tr	-	-	-	-	tr	tr	-
$\beta$ -farneseno <sup>B</sup>	1457	1459	2	tr	0,02b,c	0,08a	0,03b	tr	-	tr	tr
germacreno D <sup>B</sup>	1482	1481	-1	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
$\beta$ -selineno <sup>B</sup>	1489	1488	-1	-	-	-	tr	-	-	-	-
valenceno <sup>B</sup>	1493	1493	0	0,07a	-	-	-	-	-	0,03b	-
biciclogermacreno <sup>B</sup>	1496	1495	-1	-	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
$\alpha$ -farneseno <sup>B</sup>	1510	1511	1	tr	0,02b,c	0,04a	tr	0,03b	0,03a,b	tr	0,02b,c
$\delta$ -cadineno <sup>B</sup>	1521	1524	3	0,02b,c	tr	tr	0,04a	tr	tr	0,02b	tr
$\beta$ -sesquifelandreno <sup>B</sup>	1527	1527	0	tr	tr	tr	tr	tr	-	-	-
$\alpha$ -calacoreno <sup>B</sup>	1544	1541	-3	-	-	-	tr	-	-	-	-
nerolidol <sup>A</sup>	1569	1565	-4	tr	-	tr	tr	tr	tr	tr	-
óxido de cariofileno <sup>B</sup>	1586	1582	-4	tr	-	tr	tr	tr	-	tr	-
$\beta$ -sinensal <sup>B</sup>	1701	1706	5	tr	-	0,07a	0,03b	0,02b,c	-	tr	-
$\alpha$ -sinensal <sup>B</sup>	1759	1760	1	tr	-	0,05b	0,04b,c	0,13a	tr	tr	-

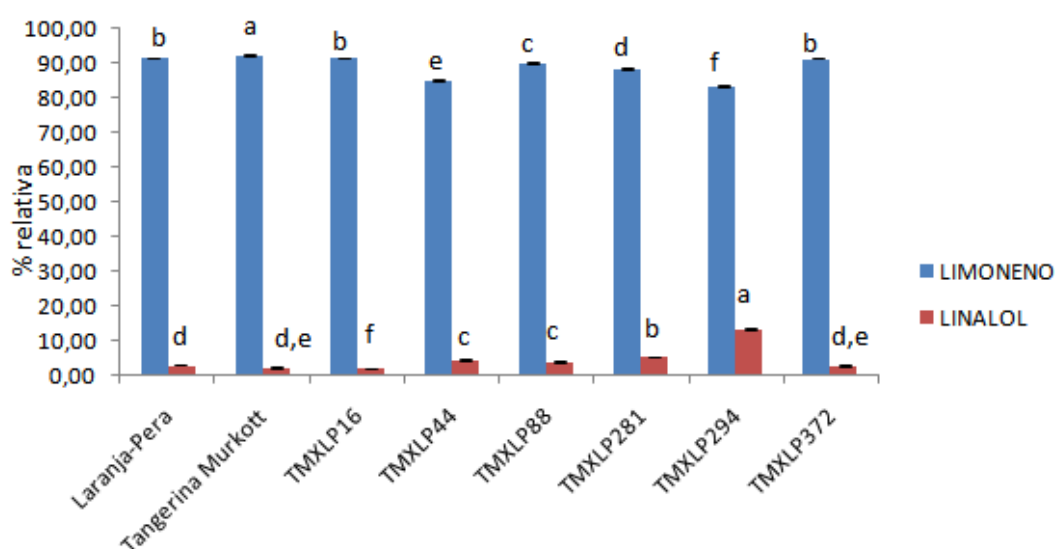
Fonte: Autoria própria.

LTPRI<sub>calc.</sub>: índice de retenção obtido experimentalmente (calculado); LTPRI<sub>lit.</sub>: índice de retenção obtido da literatura; valores expressos como % relativa de área obtidos por GC-FID; tr= nível traço ou  $\leq 0,01\%$ .  $\Delta$ = diferença entre os índices de retenção teórico e calculado (LTPRI<sub>lit.</sub> - LTPRI<sub>calc.</sub>). A= Identificação por comparação de espectro de massas e índice de retenção de acordo com padrão. B= Identificação por comparação de espectro de massas e índice de retenção de acordo com a literatura. Letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferenças significativas pelo teste de ANOVA e Tukey com  $p \leq 0,05$ . Observação: é possível verificar que na Tabela 4 existem compostos com a mesma porcentagem relativa, mas com letras diferentes no teste de Tukey. Isso é justificado pelo cálculo estatístico ser realizado com um maior número de casas decimais, enquanto que na tabela constam apenas valores com duas casas decimais.

O segundo composto encontrado como majoritário nas amostras foi o linalol, variando de 2,04% (TMXLP16) a 13,60% (TMXLP294). O linalol é um monoterpene oxigenado de fórmula molecular  $C_{10}H_{18}O$ , que apresenta descritores sensoriais com notas florais e de lavanda.<sup>12,17</sup> É considerado um composto nobre para a indústria de perfumes, aumentando muito o valor agregado do óleo essencial que o contém em quantidades apreciáveis, uma vez que a indústria consome grandes quantidades de linalol para a produção de perfumes.<sup>20</sup>

Na Figura 14, é possível visualizar as diferenças de porcentagem relativa entre o limoneno e linalol nas amostras estudadas.

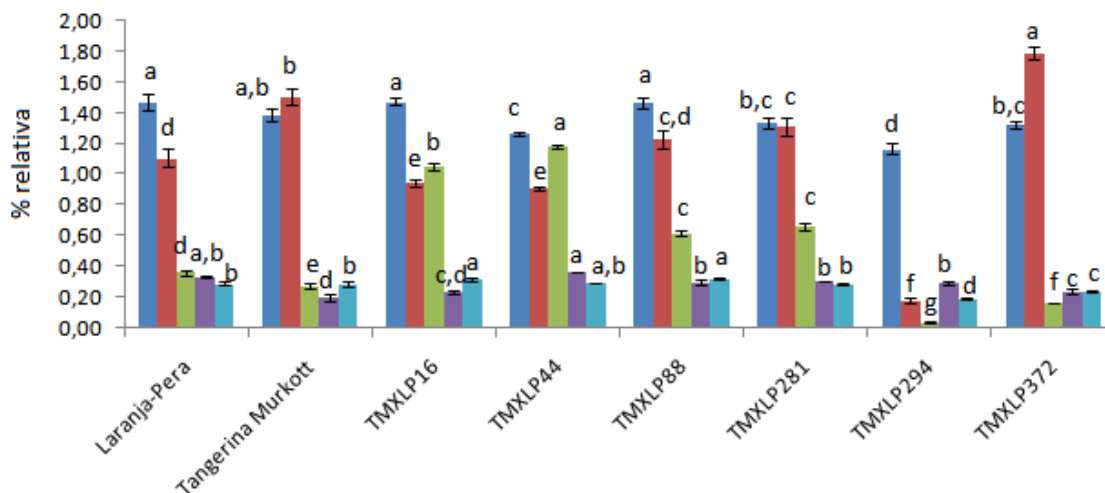
Figura 14 - Comparação entre as porcentagens relativas para os compostos limoneno e linalol nas amostras investigadas. Letras minúsculas diferentes sobre um mesmo terpeno indicam diferenças estatísticas significativas pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).



Fonte: Autoria própria

Além do limoneno e linalol, outros 5 compostos voláteis foram encontrados nos óleos essenciais com teor maior que 0,30% em pelo menos duas variedades. Estes compostos são apresentados na Figura 15.

Figura 15 - Comparação entre as porcentagens relativas dos cinco terpenos mais abundantes nas amostras de óleo essencial exceto o limoneno e o linalol. Letras minúsculas diferentes sobre um mesmo terpeno indicam diferenças estatísticas significativas pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). Legenda: Azul escuro – Mirceno, Vermelho – Octanal, Verde – Sabineno, Roxo –  $\alpha$ -Terpineol, Azul claro –  $\alpha$ -Pineno.



Fonte: Autoria própria.

O mirceno foi encontrado em quantidades de 1,16% (TMXLP294) a 1,47% (Laranja-Pêra e TMXLP16). O mirceno é um monoterpene que apresenta fórmula molecular  $C_{10}H_{16}$  e possui descritores sensoriais de bálsamo e especiarias.<sup>12,15</sup> O mirceno, assim como o linalol, quando presente em óleo essenciais de citros aumenta o valor agregado do óleo essencial, pois pode ser utilizado como matéria-prima para síntese química de obtenção de álcoois terpênicos, como o linalol e até mesmo para a síntese das vitaminas A e E. Além disso, pode ser utilizado no processo de manufatura da borracha sintética.<sup>21</sup>

O octanal pertence à classe dos aldeídos e apresenta fórmula molecular  $C_8H_{16}O$ , sendo comumente encontrado em óleos essenciais de citros.<sup>12,15, 19</sup> A maior porcentagem relativa desse composto foi encontrada no híbrido TMXLP372 (1,79%), enquanto que a menor porcentagem relativa foi verificada no híbrido TMXLP294 (0,18%). O octanal é um composto importante para o aroma do óleo essencial, sendo que o seu odor é um quesito importante para a aceitação do produto pelo consumidor, e na aplicação do óleo essencial na indústria.<sup>22</sup>

O sabineno, que é um monoterpene bicíclico e possui fórmula molecular  $C_{10}H_{16}$ , apresenta descritores sensoriais de odor de pimenta e madeira.<sup>12,15, 19</sup> Ele é utilizado comercialmente na elaboração de *blends* de óleos essenciais.<sup>23</sup> Além disso, ele pode ser usado terapeuticamente, pois apresenta atividade analgésica, anti-inflamatória e

expectorante.<sup>23</sup> Nas amostras investigadas foi encontrado principalmente na TMXLP44 (1,18%).

O  $\alpha$ -terpineol é um monoterpeno álcool que apresenta fórmula molecular  $C_{10}H_{18}O$ .<sup>12</sup> Este composto apresenta um odor agradável semelhante ao das plantas lilases (*Syringa L.*), e por esta razão é utilizado na fabricação de perfumes, sabonetes e antissépticos.<sup>12</sup> Nas amostras investigadas foi encontrado principalmente na TMXLP44 (0,36%).

Os dois isômeros do pineno ( $\alpha$  e  $\beta$ ) são monoterpenos de fórmula molecular  $C_{10}H_{16}$ .<sup>12</sup> O  $\alpha$ -pineno foi encontrado em porcentagens relativas de 0,19% a 0,32%, enquanto o  $\beta$ -pineno de 0,03% a 0,33%. Segundo Martins, et al., 2011, os descritores sensoriais do  $\alpha$ -pineno são pinho e terebintina, enquanto do  $\beta$ -pineno são pinho, terebintina e resina. Os dois isômeros do pineno são alvos frequentes de estudo devido a suas propriedades antibacterianas e antifúngicas.<sup>24,25</sup> De acordo com Moreira, et al., 2013, o isômero  $\beta$ -pineno é de grande importância econômica, e há diversas patentes sobre seu uso, sendo que até maio de 2013 na base do Instituto Nacional de Propriedade Intelectual (INPI) foram encontradas seis patentes para este terpeno (no campo resumo com palavras-chave em português); seis patentes na base europeia Espacenet (no campo título ou resumo); 41 patentes na United States Patent and Trademark Office (USPTO) (no campo resumo), e 108 na base da World Intellectual Property Organization (WIPO) (no campo folha de rosto), totalizando 161 patentes. Assim, o  $\beta$ -pineno apresenta-se como um composto de elevada aplicabilidade e, portanto, sua presença pode auxiliar no aumento do valor agregado dos óleos essenciais dos citros investigados nesta pesquisa.

Já a carvona, que só aparece em quantidades significativas no híbrido TMXLP44 (1,90%) é um monoterpeno cetônico de fórmula molecular  $C_{10}H_{14}O$ .<sup>12</sup> Ela pode ser encontrada na forma de dois isômeros, R e S. O isômero R apresenta odor de menta, e é frequentemente adicionado a cremes dentais e gomas de mascar. Já o isômero S possui um aroma de alcaravia (*Carum carvi*), e é usada na indústria de alimentos para realçar o sabor.<sup>12</sup>

Outro composto importante que foi encontrado nas amostras investigadas nesta pesquisa, porém que não foi encontrado como majoritário é o álcool perílico. Ele apresenta fórmula molecular  $C_{10}H_{16}O$  e ocorre naturalmente em plantas, sendo obtido a partir do óleo essencial de lavanda, hortelã e citros.<sup>12</sup> O álcool perílico pode ser

utilizado em produtos de limpeza e cosméticos, porém, o alvo principal de estudos com este terpeno álcool é no combate ao câncer de cérebro. Segundo Fonseca et al., 2007, estudos preliminares mostraram que, quando administrado em inalações, o álcool perílico, pela sua polaridade, é absorvido pelo sistema nervoso central podendo atuar como inibidor da telomerase, uma enzima que facilita a multiplicação de celular malignas, o que sugere seu uso em tratamento de câncer.<sup>26</sup> Nas amostras analisadas, os híbridos TMXLP44 e TMXLP281 foram os únicos que apresentaram quantidades acima do nível traço do álcool perílico, sendo encontrado em quantidades de 0,03% e 0,04%, respectivamente.

Além dos compostos discutidos até aqui, outros terpenos são também de interesse industrial, como é o caso do citronellal, usado em medicamentos sedativos e para alívio de desconforto estomacais, e o cariofileno, usado como aditivo em sabonetes e fragrâncias.<sup>12</sup> No entanto, estes terpenos foram encontrados em quantidade inferior a 0,25% nas amostras investigadas.

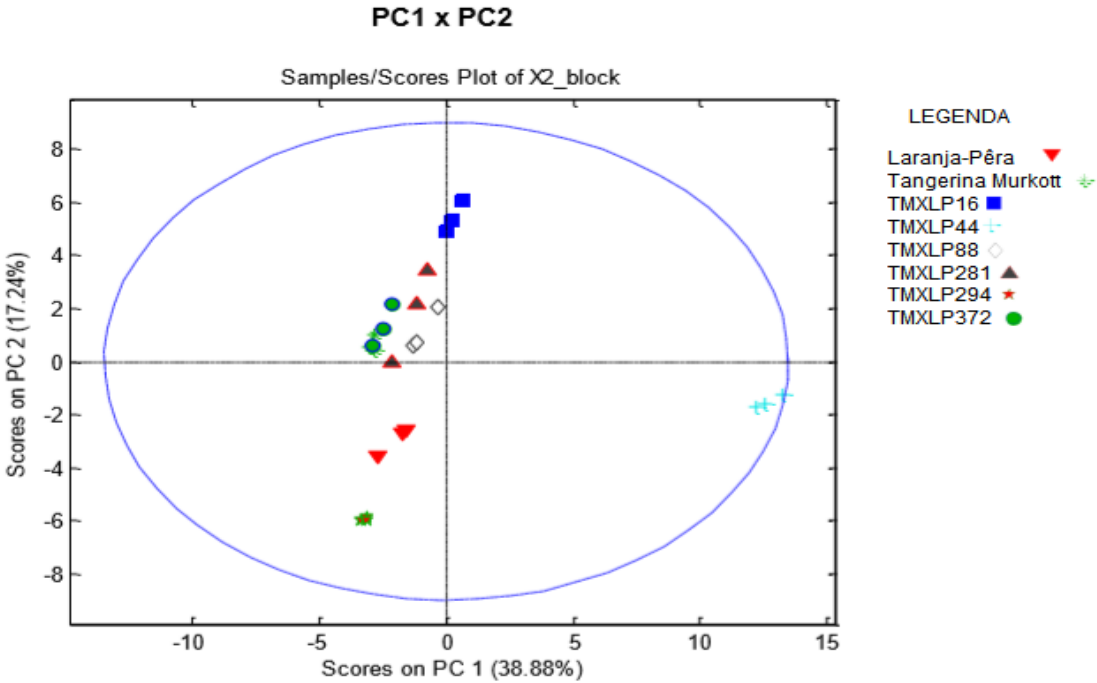
### **5.3. Análise de componentes principais**

As áreas obtidas por GC-FID dos compostos presentes nos óleos essenciais foram avaliadas através da análise de componentes principais (*PCA*) com a finalidade de se visualizar a variabilidade máxima dos grupos de amostras, identificar padrões, classificar os parentais e novos híbridos de acordo com a composição dos seus óleos essenciais e detectar *outliers*. A matriz de dados era composta de um total de 8 amostras versus 74 compostos voláteis (variáveis). Esta matriz de dados sofreu uma seleção de variáveis com redução para 65 voláteis, sendo removidos da *PCA* as variáveis que não apresentavam variância, ou que apresentam muito pouca variância. A matriz resultante teve os valores de área auto escalados, de modo que todos os compostos tivessem o mesmo peso na *PCA*. Após este pré-processamento, a matriz de dados foi então analisada utilizando o software Matlab.

A Figura 16 apresenta os scores da PC1 e da PC2 com 56,12% dos resultados explicados pela variância enquanto que a Figura 17 apresenta os scores da PC3 e da PC4 com 23,85% dos resultados explicados pela variância. O gráfico de escores mostra que o híbrido TMXLP44 é o que apresenta maior diferença em relação aos parentais e aos demais híbridos, uma vez que muitos compostos químicos foram encontrados apenas neste híbrido. A PC2 apresenta em seus extremos o híbrido

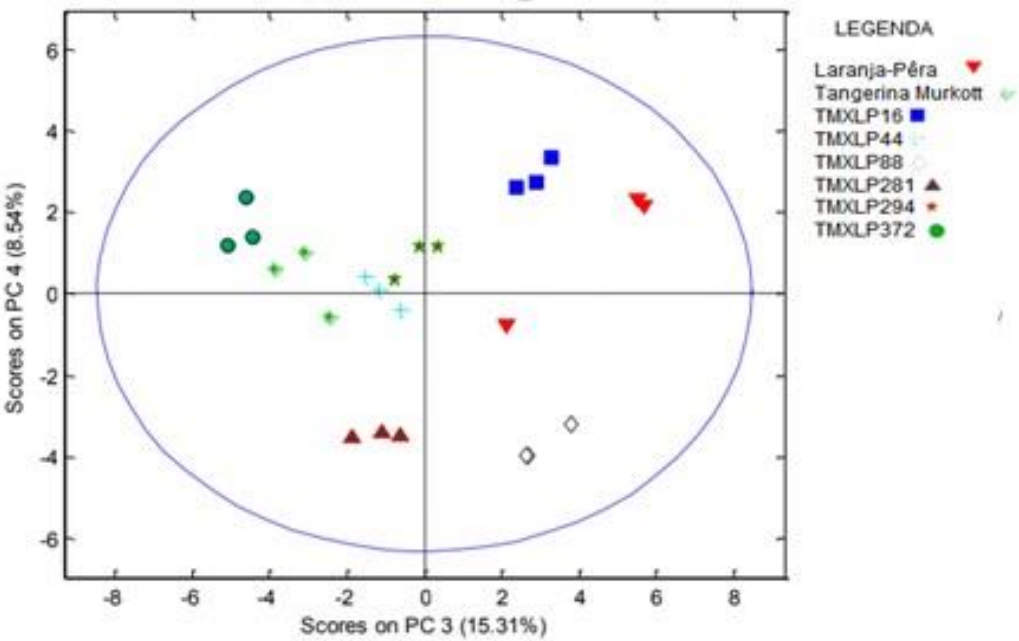
TMXLP294, que apresenta um conteúdo elevado de linalol, e o híbrido TMXLP16, que apresenta o maior conteúdo de  $\alpha$ -farneseno e valores elevados de limoneno e octanal.

Figura 16 - Gráfico de escores PC1 x PC2.



Fonte: Autoria própria.

Figura 17 - Gráfico de escores PC3 x PC4.



Fonte: Autoria própria.

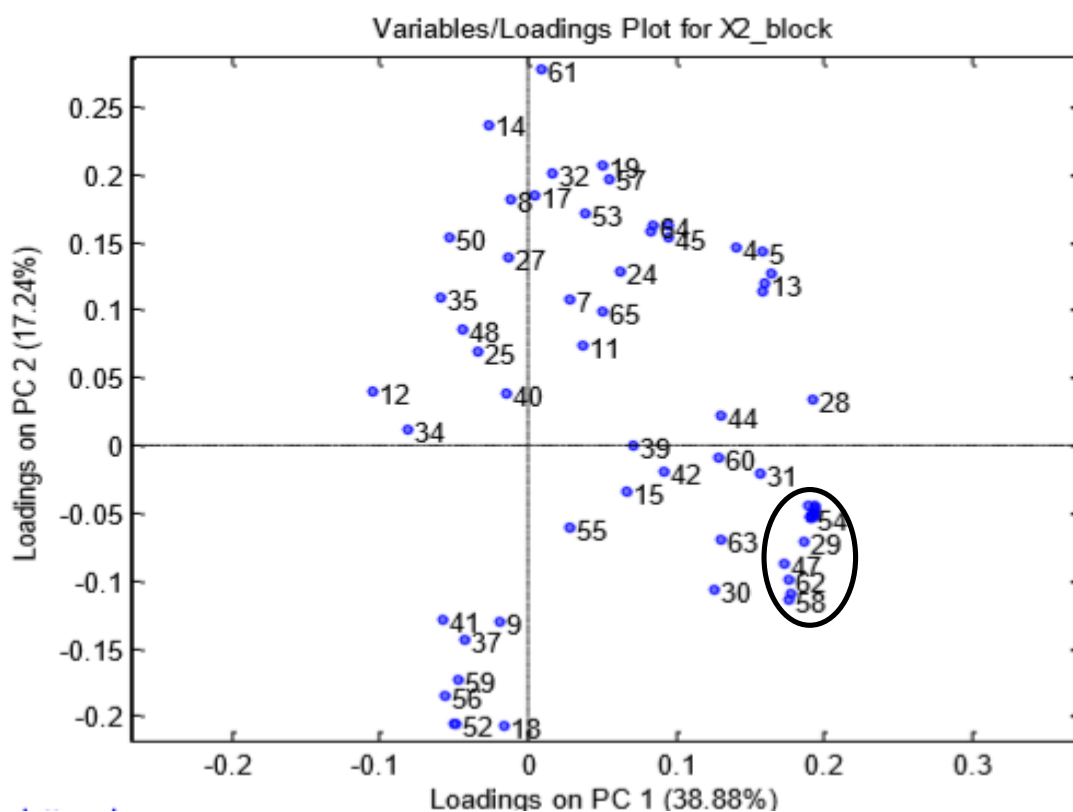
Analisando as Figuras 16 e 17 simultaneamente, é possível concluir que o híbrido TMXLP372 e o parental Tangerina Murcott são as amostras mais parecidas, uma vez que estão próximas entre si em ambas as figuras. As duas variedades estão no segundo quadrante em PC1 x PC2 e em PC3 x PC4. A amostra TMXLP281 também é parecida com a TMXLP372 e a Tangerina Murcott, pois está no mesmo quadrante em PC1 x PC2 e apresenta valores negativos em PC3. Seguindo esse raciocínio, a amostra TMXLP88 é bem parecida com a TMXLP281, pois ambas ocupam o mesmo quadrante em PC1 x PC2 e apresentam valores negativos em PC4.

As Figuras 18 e 19 apresentam os gráficos de pesos. Os compostos circulados nas figuras são aqueles que apresentam as maiores concentrações nos óleos essenciais. A PCA é responsável por decompor os valores da Tabela 4 em duas matrizes: escores (T) e pesos (P), de acordo com a equação:

$$X = T \times P^T \quad (\text{equação 1})$$

Dessa forma, enquanto a matriz de escores traz informações sobre as amostras, os pesos mostram as variáveis que estão correlacionadas entre si e as responsáveis pelo agrupamento observado nos gráficos de escores. Essa correlação entre as variáveis e as amostras é possível analisando a presença das amostras e das variáveis nos quadrantes dos gráficos de escores e de pesos. Isso ocorre porque os dados estão centrados na média e como X é o produto de T e P, se ambos apresentarem o mesmo sinal o produto X será maior para um composto específico em uma amostra específica. No entanto, essa correlação não é direta. Isto porque o percentual de variância explicada é diferente para cada PC, portanto, toda a correlação encontrada entre os gráficos deve ser verificada na matriz original.

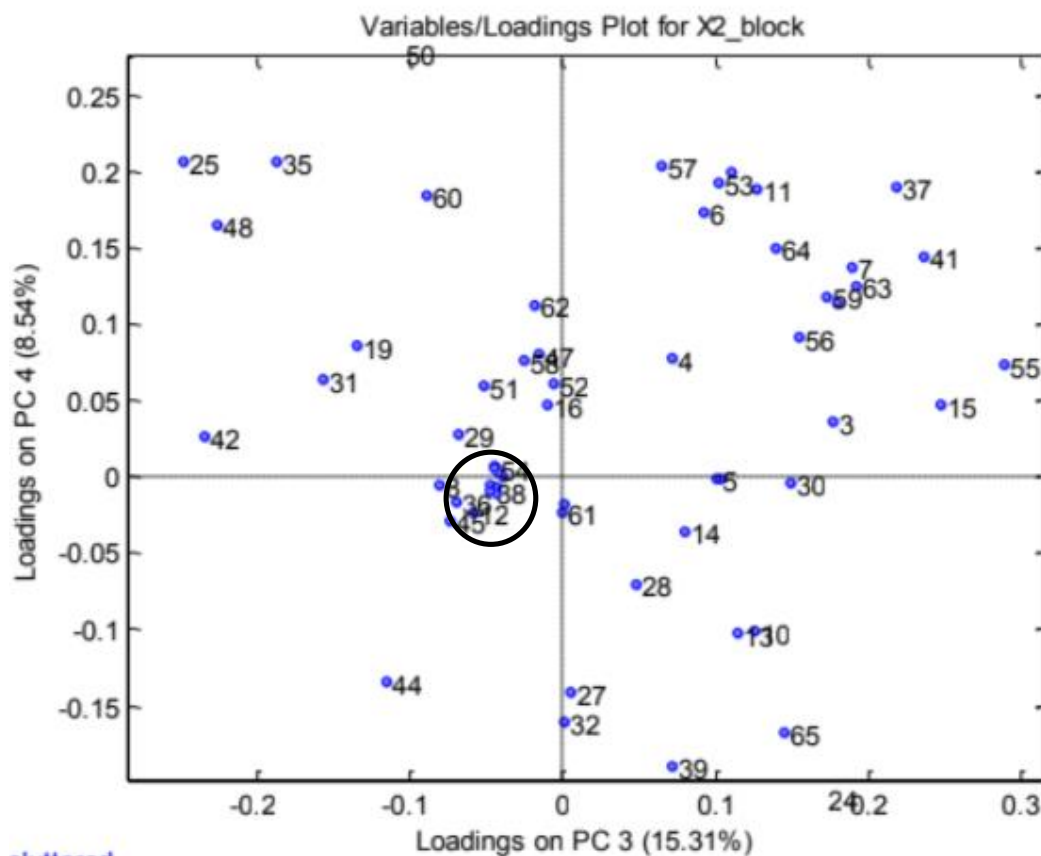
Figura 18 - Gráfico das variáveis ou dos pesos (*loadings graph*) dos dois primeiros componentes principais da PCA dos compostos voláteis presentes nos óleos essenciais das oito amostras de citros estudadas. Componentes codificados em número são: 1 heptanal, 2  $\alpha$ -tujeno, 3  $\alpha$ -pineno, 4 canfeno, 5 sabineno, 6  $\beta$ -pineno, 7 mirceno, 8 octanal, 9 careno, 10  $\alpha$ -terpineno, 11 limoneno, 12  $\beta$ -o-cimeno, 13  $\gamma$ -terpineno, 14 octanol, 15 terpinoleno, 16 óxido de linalol, 17 undecano, 18 linalol, 19 nonanal, 20 1,3,8-p-mentatrieno, 21 trans-p-menta-2,8-dien-1-ol, 22 óxido de limoneno, 23 cis-p-menta-2,8-dien-1-ol, 24 cânfora, 25 citrônella, 26 isopinocâfona, 27 nonanol, 28 terpinen-4-ol, 29 trans-p-menta-1(7),8-dien-2-ol, 30  $\alpha$ -terpineol, 31 trans-dihidrocarvona, 32 decanal, 33 trans-carveol, 34 nerol, 35 citrônello, 36 cis-carveol, 37 neral, 38 carvona, 39 geraniol, 40 trans-2-decenal, 41 geranial, 42 aldeído perílico, 43  $\alpha$ -terpinen-7-al, 44 álcool perílico, 45 undecanal, 46 acetato de trans-carveol, 47 acetato de  $\alpha$ -terpenila, 48 acetato de citrônella, 49 acetato de cis-carveol, 50 acetato de nerila, 51  $\alpha$ -copaeno, 52 acetato de geranila, 53  $\beta$ -elemeno, 54 butirato de octila, 55 cariofileno, 56  $\alpha$ -humuleno, 57  $\beta$ -farneseno, 58 germacreno D, 59 valenceno, 60 biciclogermacreno, 61  $\alpha$ -farneseno, 62  $\delta$ -cadineno, 63 óxido de cariofileno, 64  $\beta$ -sinensal e 65  $\alpha$ -sinensal.



Fonte: Autoria própria.



Figura 19 - Gráfico das variáveis ou dos pesos (*loadings graph*) dos dois primeiros componentes principais da PCA dos compostos voláteis presentes nos óleos essenciais das oito amostras de citros estudadas. Os componentes codificados em números são os mesmos da Figura 18.



Fonte: Autoria própria.

Por exemplo, as amostras TMXLP294 e Laranja-Pêra apresentam valores similares de escores na PC1 e na PC2, no terceiro quadrante. Assim, as variáveis em maiores concentrações nessas amostras serão aqueles presentes no terceiro quadrante, do gráfico de pesos. Portanto, elas se apresentam próximas na Figura 16 (gráfico de scores PC1 x PC2) por causa da grande quantidade de linalol, 3-careno, neral, geranial, acetato de geranila,  $\alpha$ -humuleno, e valenceno, Ademais, elas também estão relacionadas pela pouca quantidade dos analitos no quadrante inverso, como  $\alpha$ -pineno, sabineno, mirceno, octanal e limoneno.

Em relação à amostra TMXLP44, os componentes responsáveis separação dela, em relação ao resto do grupo, são os compostos do circulado em preto:  $\alpha$ -terpinen-7-al, acetato de trans-carveol, acetato de  $\alpha$ -terpinila, acetato de cis-carveol,  $\alpha$ -copaeno, butirato de octila, germacreno D,  $\delta$ -cadineno, trans-p-menta-2,8-dien-1-ol,

óxido de limoneno, cis-p-menta-2,8-dien-1-ol, isopinocanfona, trans-p-menta-1(7),8-dien-2-ol, cis-carveol e carvona. Esses componentes ocupam, no gráfico de pesos, o mesmo quadrante que a amostra TMXLP44 ocupa, no gráfico de escores. Expandindo a análise, o mesmo ocorre para PC3 x PC4 e por fim, pode-se confirmar o observado através dos resultados da Tabela 4.

Por último, em relação a correlação entre as variáveis, a concentração de  $\alpha$ -pineno, sabineno, mirceno e limoneno estão altamente relacionadas uma vez que elas apresentam uma posição similar tanto em PC1 x PC2 como em PC3 x PC4. Assim pode-se sugerir que elas estão conectadas por um metabolismo específico. Da mesma maneira, a quantidade de linalol aparece de forma inversamente proporcional a esses compostos. Em outras palavras, o metabolismo do híbrido TMXLP281 produz linalol preferencialmente à  $\alpha$ -pineno, sabineno, mirceno e limoneno; TMXLP44 produz preferencialmente os compostos do círculo, e TMXLP16 produz preferencialmente pineno, sabineno, mirceno e limoneno ao invés de linalol. Toda essa discussão levou em consideração a porcentagem relativa dos analitos e não a concentração absoluta. Ademais, todas as conclusões obtidas por PCA podem ser conferidas nos resultados originais da Tabela 4.

## 6. CONSIDERAÇÕES ADICIONAIS

Parte dos dados apresentados nesta monografia foram previamente publicados na revista *Journal Of Essential Oil Research* no artigo intitulado como *Essential oil profiling of six new citrus hybrids from Murcott tangor and Pera sweet Orange*, de autoria de Marina Cassab Azevedo, Stephano Marques, Mariângela Cristofani-Yaly, Fernando Alves De Azevedo, Marinês Bastianel, Renato Lajarim Carneiro e Stanislau Bogusz Junior, no volume 31, número 5, páginas 400 – 408, na edição de junho de 2018.<sup>27</sup>

## 7. CONCLUSÕES

Os teores de óleos essenciais (% v/m) nas amostras investigadas variaram de 0,34% a 0,59%, sendo a amostra TMXLP16 a que apresentou o maior rendimento de óleo essencial, o que quase a caracteriza como uma nova variedade de laranja. No entanto, considerando-se a produtividade de frutos para cada híbrido em kg/hectare, a amostra TMXLP44 foi a que apresentou a maior produtividade de óleo essencial,

isto é, 36 L/ha, seguida do híbrido TMXLP294 que apresentou uma produtividade de 21 L/ha.

Através das análises cromatográficas foi possível identificar e semi-quantificar mais de 90% dos componentes presentes nos óleos essenciais das amostras. O composto majoritário em todas as amostras foi o limoneno (>80%) enquanto que a amostra TMXLP294 foi a que apresentou a maior quantidade do álcool terpênico linalol (>13%), seguida pelas amostras TMXLP281 (>5%) e TMXLP44 (>4%). Esta composição química rica em linalol sugere um grande potencial para estes três novos híbridos para uso na indústria de perfumaria e fragrâncias.

A análise de componentes principais revelou que a amostra TMXLP44 é o híbrido que apresenta óleo essencial de composição mais distinta da composição dos óleos essenciais dos parentais e dos outros novos híbridos. Por outro lado, o óleo essencial do híbrido TMXLP372 é o mais parecido com o óleo essencial do parental Tangerina Murcott, enquanto que o híbrido TMXLP294 é o que apresenta óleo essencial com composição mais parecida a do parental Laranja-Pêra. Por fim, é importante mencionar que o fenótipo (ou seja, as características observáveis, como morfologia e estrutura, não relacionadas ao perfil químico) do híbrido TMXLP294 é muito semelhante à Laranja-Pêra e o híbrido TMXLP372 tem um fenótipo muito semelhante a Tangerina Murcott.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 FAO-OCDE. **Agricultura brasileira: perspectivas e desafios**. [S. l.], 2015. Disponível em: <http://www.fao.org.br/download/PA20142015CB.pdf>. Acesso em: 20 out. 2020.
- 2 FAO. **Faostat: statistical database**. Roma, [20--]. Disponível em: <http://faostat3.fao.org/faostat-gateway/go/to/browse/Q/QC/E>. Acesso em: 20 out. 2020.
- 3 EMBRAPA. **Laranja**. Brasília, DF, [20--]. Disponível em: [http://www.cnpmf.embrapa.br/Base\\_de\\_Dados/index\\_pdf/dados/brasil/laranja/b1\\_laranja.pdf](http://www.cnpmf.embrapa.br/Base_de_Dados/index_pdf/dados/brasil/laranja/b1_laranja.pdf). Acesso em: 20 out. 2020.
- 4 TEIXEIRA, J. P. F.; MARQUES, M. O. M.; PIO, R. M. Characterization of essential oils of nine mandarin genotypes. **Citrus Research & Technology**, Cordeirópolis, v. 35, n.1, p. 1–10, 2014.
- 5 ASSOCIAÇÃO NACIONAL DE EXPORTADORES DE SUCOS CÍTRICOS. **Laranja**. São Paulo, [20--]. Disponível em: <http://www.citrusbr.com/>. Acesso em: 20 out. 2020.
- 6 AZEVEDO, F. A.; MARTELLI, I. B.; POLYDORO, D. A.; PACHECO, C. A.; SCHINOR, E. H.; BASTIANEL, M. Positive relationship between citrus leaf miner and alternaria brown spot. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 45, n.7, p. 1160–1163, 2013.
- 7 BERGER, R. G. **Flavours and fragrances: chemistry, bioprocessing and sustainability**. [S. l.]: Springer, 2007.
- 8 BICCHI, C.; CHAINTREAU, A.; JOULAIN, D. Identification of flavour and fragrance constituents. **Flavour and Fragrance Journal**, Oxford, v. 33, p. 201-202, 2018.
- 9 PALAZZOLO, E; LAUDICINA, V. A.; GERMANA, M. A. Current and potential use of citrus essential oils. **Current Organic Chemistry**, Sharjah, v. 17, n. 24, p. 3042-3049, 2013.
- 10 SAWAMURA, M. **Citrus essential oils: flavor and fragrance**. [S. l.]: Wiley, 2010.
- 11 Tetrapak. **The orange book**. Pully, 2020. Disponível em: <https://orangebook.tetrapak.com/>. Acesso em: 20 out. 2020.
- 12 BASER, K.H. C.; BUCHBAUER, G. **Handbook of essential oils: science, technology, and applications**. Boca Raton: CRC Press, Taylor & Francis Group, 2010.

- 13 SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6.ed. Porto Alegre: UFRGS, 2016.
- 14 MANN, J. **Chemical aspects of biosynthesis**. Oxford: Oxford University Press. 1995. (Oxford chemistry primers, 20).
- 15 SIMAS, D. L. R.; AMORIM, S. H. B. M.; OLIVEIRA, J. M.; ALVIANO, D. S.; SILVA, A. J. R. Caracterização dos óleos essenciais de frutas cítricas. **Citrus Research & Technology**, Cordeirópolis, v.36, n.1, p.15-26, 2015.
- 16 VIUDA-MARTOS, M.; RUIZ-NAVAJAS, Y.; FERNÁNDEZ-LÓPES, J. Chemical Composition of Mandarin (*C. Reticulata* L.), Grapefruit (*C. Paradisi* L.), Lemon (*C. Limon* L.) and Orange (*C. Sinensis* L.). Essential Oils. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, Abingdon, v. 12, p. 236-243, 2009.
- 17 ALMEIDA, S. B. **Efeito de diferentes aromas cítricos sobre a qualidade e estabilidade sensoriais de suco de laranja pronto para beber**. Orientadora: Maria Aparecida Azevedo Pereira da Silva. 2006. 207 f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.
- 18 MARTINS, A. P.; NOGUEIRA, M. T.; COSTA, M. C.; SALGUEIRO, L. Requisitos de qualidade em óleos essenciais: a importância das monografias da Farmacopeia Europeia e das normas ISO. **Revista de Fitoterapia**, Valencia, v. 11, n. 2, p.133-145, 2011.
- 19 DEL BOSCO, S. F.; ABBATE, L.; TUSA, N.; STRANO, T.; RENDA, A.; RUBERTO, G. Genetic improvement of Citrus fruits: the essential oil profiles in a Citrus limon backcross progeny derived from somatic hybridization. **Food Research International**, Oxford, v.50, p. 344-350, 2013.
- 20 ERENO, D. Folhas de árvore da Amazônia garantem a continuidade da produção do perfume Chanel. **Pesquisa FAPESP**, São Paulo, p. 64-67, 2005.
- 21 KOLICHESKI, M. B. **Síntese do mirceno a partir da isomerização térmica do  $\beta$ -pineno**. Orientador: David A. Mitchell. 2006. 124 f. Tese (Doutorado em Engenharia de Processos Térmicos e Químicos) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.
- 22 GOMES, M. D. S. **Caracterização química e atividade antifúngica dos óleos essenciais de cinco espécies do gênero Citrus**. Orientadora: Maria das Graças

Cardoso. 2011. 98 f. Dissertação (Mestrado em Agroquímica e Agrobioquímica) – Universidade Federal de Lavras, 2011.

23 SANTOS, J. Z. **Caracterização química de óleos essenciais de folhas de tangerineira e híbridos**. Orientador: Jean Kleber de Abreu Mattos. 2013. 149 f. Tese (Doutorado em Ciências Agrárias) – Universidade de Brasília, 2013.

24 MOREIRA, I. J. A.; SERAFINI, M. R.; LUCCA JUNIOR, W.; RIBEIRO, E. A. N.; SANTANA FILHO, V. J.; PASSOS JUNIOR, D. B. P.; ARAUJO, A. A. D. S.; QUINTANS JUNIOR, L. J. Q.; SANTOS, M. R. V. Prospecção tecnológica de utilização do Beta-pineno. **Revista Geintec**, São Cristovão, v. 3, n. 2, p.186-194, 2013.

25 NÓBREGA, F. M. **Investigação da atividade antifúngica do alfa-pineno sobre cepas de *Rhizopus oryzae***. Orientadora: Edeltrudes de Oliveira Lima. 2013. 65 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Farmácia) – Centro de Ciências da Saúde - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2013.

26 FONSECA, C. O.; GATTASS, C. R.; LINDEN, R.; CARVALHO, M. G. C.; FUTURO, D.; QUIRICO-SANTOS, T. Estudo exploratório da administração intranasal do monoterpene álcool perílico em pacientes com glioma recidivante. **Jornal Brasileiro de Neurocirurgia**, Rio de Janeiro, v.18, n.3, p. 7-22, 2007.

27 AZEVEDO, M. C.; MARQUES, S.; CRISTOFANI-YALY, M.; DE AZEVEDO, F. A.; BASTIANEL, M.; CARNEIRO, R. L.; BOGUSZ JUNIOR, S. Essential oil profiling of six new citrus hybrids from Murcott tangor and Pera sweet Orange. **Journal Of Essential Oil Research**, New York, v. 31, n. 5, p. 400 – 408, 2019.

## ANEXO - I



Stanislau Bogusz Junior <stanislau@iqsc.usp.br>

---

**RE: Reusing part or all of my article somewhere else (UK)**


---

**Academic UK Non Rightslink** <permissionrequest@tandf.co.uk>

10 de agosto de 2020  
04:42

Para: "stanislau@iqsc.usp.br" <stanislau@iqsc.usp.br>

Dear Professor Stanislau Bogusz Jr

Marina Cassab Azevedo, Stephano Marques, Mariângela Cristofani-Yaly, Fernando Alves De Azevedo, Marinês Bastianel, Renato Lajarim Carneiro & Stanislau Bogusz Junior (2019) Essential oil profiling of six new citrus hybrids from Murcott tangor and Pera sweet orange, Journal of Essential Oil Research, 31:5, 400-408, DOI: 10.1080/10412905.2019.1596845

Thank you for your correspondence requesting permission to reproduce your **authors accepted manuscript** from our Journal in your printed thesis and to be posted in the university's repository – University of São Paulo.

We will be pleased to grant permission on the sole condition that you acknowledge the original source of publication and insert a reference to the article on the Journals website: <http://www.tandfonline.com>

This is the authors accepted manuscript of an article published as the version of record in Journal of Essential Oil Research © 2019 Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group, and insert a link to the articles Version of Record

This permission does not cover any third party copyrighted work which may appear in the material requested.

Please note that this license does not allow you to post our content on any third party websites or repositories.

This licence does not allow the use of the Publishers version/PDF (this is the version of record that is published on the publisher's website) to be posted online.

Thank you for your interest in our Journal.

Yours sincerely

Karin Beesley - Permissions Administrator, Journals

Taylor & Francis Group  
3 Park Square, Milton Park, Abingdon, Oxon, OX14 4RN, UK  
[permissionrequest@tandf.co.uk](mailto:permissionrequest@tandf.co.uk)  
Tel: +44 (0)20 337 73116

Taylor & Francis Group is a trading name of Informa UK Limited, registered in England under no. 1072954