

## Extração, caracterização e avaliação microbiológica de óleos essenciais de rejeitos de frutas cítricas comerciais

Extraction, characterization and microbiological evaluation of essential oils from commercial citrus waste

Extracción, caracterización y evaluación microbiológica de aceites esenciales de residuos comerciales de cítricos

Recebido: 15/05/2021 | Revisado: 23/05/2021 | Aceito: 26/05/2021 | Publicado: 11/06/2021

**Gabriela Borba Vilela Borges**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6748-0948>  
Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais, Brasil  
E-mail: [gabi\\_tlc@hotmail.com](mailto:gabi_tlc@hotmail.com)

**Ana Maria de Resende Machado**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1587-5024>  
Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais, Brasil  
E-mail: [anamariaderesendemachado@gmail.com](mailto:anamariaderesendemachado@gmail.com)

**Fátima de Cássia Oliveira Gomes**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7358-7154>  
Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais, Brasil  
E-mail: [fatimaog@cefetmg.br](mailto:fatimaog@cefetmg.br)

**Cleverson Fernando Garcia**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9354-1401>  
Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais, Brasil  
E-mail: [cf.garcia@terra.com.br](mailto:cf.garcia@terra.com.br)

### Resumo

Com o aumento da produção de resíduos oriundos de processamento de alimentos diversas medidas estão sendo implementadas gerando benefícios que ultrapassam as questões ambientais. Este trabalho propôs o reaproveitamento de cascas de frutas cítricas excedentes de estabelecimentos comerciais, por meio da extração de óleos essenciais (OEs). Avaliou-se sua eficácia antimicrobiana, os parâmetros físico-químicos, sua constituição química e os padrões de agrupamento dos OEs com base em análises estatísticas. Os OEs foram extraídos das cascas pelo método de hidrodestilação. Determinou-se o índice de refração, densidade relativa e solubilidade em etanol 90%. A identificação dos constituintes foi realizada por meio da GC-MS e para os agrupamentos das amostras utilizou-se PCA e HCA. Para a atividade antimicrobiana utilizou-se a técnica de difusão de disco, utilizando duas leveduras (*Candida parapsilosis* e *Candida krusei*) e duas bactérias (*Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*). Constatou-se que os OEs dos cultivares de laranja apresentam maior rendimento de extração e as análises físico-químicas foram similares entre os cultivares de laranja e limão. Identificou-se 61 componentes nos OEs, sendo o d-limoneno majoritário. A PCA e a HCA revelaram agrupamentos que corroboram com as cultivares laranjas, limões e mexerica. Todos os microrganismos foram sensíveis aos OEs dos limões e da mexerica e a *E. coli* foi sensível a todos os OEs. Por sua vez, a bactéria *S. aureus* se mostrou resistente aos OEs dos cultivares de laranja. Constatou-se que o reaproveitamento do excedente das cascas de frutas cítricas é viável, sendo os OEs eficazes contra determinados microrganismos.

**Palavras-chave:** Óleos essenciais; Frutas cítricas; Reaproveitamento.

### Abstract

With the increase in the production of residues from food processing, several measures are being implemented generating benefits that go beyond environmental issues. This work proposed the reuse of surplus citrus fruit peels from commercial establishments, through the extraction of essential oils (OEs). Their antimicrobial efficacy, physical-chemical parameters, chemical constitution and the OE grouping patterns were evaluated based on statistical analyzes. The OEs were extracted from the shells by the hydrodistillation method. The refractive index, relative density and solubility in 90% ethanol were determined. The identification of the constituents was performed using GC-MS and for the groupings of the samples, PCA and HCA were used. For the antimicrobial activity, the disk diffusion technique was used, using two yeasts (*Candida parapsilosis* and *Candida krusei*) and two bacteria (*Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*). It was found that the OEs of orange cultivars have higher extraction yield and the physical-chemical analyzes were similar between orange and lemon cultivars. 61 components were identified in the OEs, with d-limonene being the majority. PCA and HCA revealed groupings that corroborate with the cultivars oranges, lemons and tangerines. All microorganisms were sensitive to the OEs of lemons and tangerine and *E. coli* was sensitive to all

OEs. In turn, the bacterium *S. aureus* proved to be resistant to OEs from orange cultivars. It was found that the reuse of surplus citrus fruit peels is feasible, and OEs are effective against certain microorganisms.

**Keywords:** Essential oils; Citrus fruits; Reuse.

### Resumen

Con el aumento en la producción de residuos del procesamiento de alimentos, se están implementando varias medidas que generan beneficios que van más allá de las cuestiones ambientales. Este trabajo propuso la reutilización de cáscaras de cítricos excedentes de establecimientos comerciales, mediante la extracción de aceites esenciales (OE). Su eficacia antimicrobiana, parámetros físico-químicos, constitución química y patrones de agrupación de OE fueron evaluados con base en análisis estadístico. Los OE se extrajeron de las conchas mediante el método de hidrodestilación. Se determinaron el índice de refracción, la densidad relativa y la solubilidad en etanol al 90%. La identificación de los constituyentes se realizó mediante GC-MS y para los agrupamientos de las muestras se utilizaron PCA y HCA. Para la actividad antimicrobiana se utilizó la técnica de difusión en disco, utilizando dos levaduras (*Candida parapsilosis* y *Candida krusei*) y dos bacterias (*Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*). Se encontró que las OE de los cultivares de naranja tienen mayor rendimiento de extracción y los análisis físico-químicos fueron similares entre los cultivares de naranja y limón. Se identificaron 61 componentes en los OE, siendo el d-limoneno el mayoritario. PCA y HCA revelaron agrupaciones que corroboran con los cultivares naranjas, limones y mandarinas. Todos los microorganismos fueron sensibles a los EO de los limones y la mandarina y *E. coli* fue sensible a todos los EO. A su vez, la bacteria *S. aureus* demostró ser resistente a EO en cultivares de naranja. Se encontró que la reutilización de cáscaras de cítricos excedentes es factible y que las OE son efectivas contra ciertos microorganismos.

**Palabras clave:** Aceites esenciales; Frutas cítricas; Reutilizar.

## 1. Introdução

Atualmente no Brasil a fruticultura vem sendo uma excelente alternativa de negócios. O uso de fontes naturais e renováveis para a produção de óleos essenciais toma lugar de destaque. As plantas cítricas, compreendidas principalmente por laranjeiras, tangerinas, limoeiros, limeiras, pomeleiros e toranjeiras desempenham um papel de acentuada importância socioeconômica mundial. Quanto aos seus usos destacam-se a casca e as folhas de onde se extraem óleos essenciais empregados na indústria (Barbosa et al., 2016).

Os óleos essenciais procedentes das frutas cítricas são uma mistura de substâncias voláteis, lipofílicas, geralmente odoríferas e líquidas e são extraídos por meio de técnicas de arraste a vapor, hidrodestilação, prensagem do pericarpo dos frutos, além de outras técnicas. Estes óleos possuem grande aplicação na perfumaria, cosmética e alimentos, sendo utilizados principalmente como aromas, fragrâncias, fixadores de fragrâncias e como coadjuvantes em composições farmacêuticas. Sua comercialização pode ocorrer aproveitando a forma bruta ou beneficiada, fornecendo substâncias purificadas como o limoneno, citral, citronelal, eugenol, mentol e safrol (Barbosa et al., 2016).

Aproximadamente 400 compostos têm sido identificados em óleos essenciais de citros cuja composição consiste em uma mistura de terpenos, hidrocarbonetos e compostos oxigenados, considerados quimicamente instáveis, susceptíveis à oxidação por influência da luz, do ar e da umidade. Entre os citros, as laranjas apresentam óleos essenciais ricos em limoneno, um hidrocarboneto monoterpênico com atividade antimicrobiana de largo espectro (Calo et al. 2015).

A qualidade e quantidade dos óleos essenciais da casca de frutos de citros dependem de muitos fatores, tais como a natureza do fruto em si, proveniência, genótipo, tipo de solo e clima, mas também do processo de extração (Palazzolo et al., 2013).

Os resíduos orgânicos produzidos, tanto nos centros urbanos quanto nas indústrias, têm crescido consideravelmente e, segundo relatório da Associação Brasileira de Empresas de Limpeza Pública e Resíduos Especiais, em 2018 as cidades brasileiras geraram cerca de 79 milhões de toneladas de resíduos sólidos urbanos (Antenor & Szigethy, 2021).

Os rejeitos agroindustriais gerados pela citricultura são as cascas, sementes e polpas, com amplas possibilidades de demanda das quais se destacam fibras alimentares, extração da pectina e óleos essenciais. Por meio da redução e da valorização, estes resíduos podem contribuir para a diminuição de problemas ambientais que geram diversos benefícios, inclusive econômicos. Ao reutilizar todas as partes das frutas é possível desenvolver uma gama de produtos e, além disso,

estabelecer uma alternativa tecnológica e sustentável. Visto que as cascas de frutas cítricas como laranjas são fontes ricas em óleos essenciais, seu uso como matriz de extração se caracteriza como uma alternativa bastante rentável para os resíduos gerados durante o processamento dos seus frutos (da Silva et al. 2020).

Portanto, o presente trabalho propôs o reaproveitamento de cascas de frutas cítricas para obtenção do óleo essencial por meio da extração por hidrodestilação. Além disso, buscou-se avaliar sua eficácia contra algumas bactérias e leveduras e seus parâmetros físico-químicos, bem como sua constituição química e padrões de agrupamento dos óleos essenciais com base em análises estatísticas multivariadas.

## 2. Metodologia

O trabalho correspondeu a atividades laboratoriais de caráter quantitativo e qualitativo. O primeiro relacionado ao processo de extração e determinação do teor de óleos essenciais provenientes das cascas de frutas cítricas, caracterização físico-química dos óleos, identificação dos seus constituintes voláteis, bem como o estudo de agrupamento das amostras de frutas cítricas considerando os constituintes voláteis. O segundo, por sua vez, vinculado à avaliação da atividade antimicrobiana dos óleos essenciais frente a duas espécies de bactérias e duas espécies de leveduras.

Além disso, se caracterizou como uma pesquisa descritiva, pois, de acordo com Oliveira (2011), levou em conta a observação, registro e análise dos objetos de estudo e sua relação com outros fenômenos.

### 2.1 Obtenção da matéria-prima

Amostras de quatro diferentes espécies de frutas cítricas foram obtidas de estabelecimentos comerciais localizados em Minas Gerais, sendo elas: limão-cravo (*Citrus limonia*), limão-taiti (*Citrus latifolia*), mexerica (*Citrus deliciosa*) e os cultivares de laranja (*Citrus sinensis*) campista, pera, bahia e serra d'água.

### 2.2 Preparo das amostras e extração dos óleos essenciais

As frutas foram lavadas e secas com papel toalha. Para a extração dos óleos essenciais, o bagaço (albedo) foi separado da parte externa da casca (flavedo). Em seguida, o flavedo foi picado em pequenas partes uniforme.

A extração dos óleos essenciais das cascas das frutas foi executada por meio do método de hidrodestilação utilizando o aparelho de Clevenger acoplado a um balão de fundo redondo de 1 L, contendo 200 g de flavedo triturado por um período de 2h. Os óleos obtidos foram coletados e transferidos para frascos de vidro âmbar de 10 mL, tampados e armazenados sob refrigeração a aproximadamente 4°C.

### 2.3 Testes físico-químicos dos óleos essenciais

As densidades relativas a 20°C, o índice de refração e a solubilidade em etanol 90°GL foi determinada segundo metodologias descritas na literatura (ABNT 1985a, 1985b, ABNT 1989 e Farmacopeia Brasileira (BRASIL, 2019).

### 2.4 Determinação do perfil cromatográfico dos óleos essenciais

O preparo das amostras de óleos essenciais foi realizado por meio da dissolução em diclorometano P.A. na concentração de 1%.

As análises para identificação dos compostos presentes nos óleos foram realizadas em um cromatógrafo gasoso (Agilent Technologies 7890A Sistema GC) acoplado ao espectrômetro de massas (Agilent 5975C inerte MSD Triple-Axis Detector). A coluna utilizada foi a HP5-MS (comprimento de 30 m, diâmetro interno (ID) de 0,25µm e espessura da película de 0,25 mm), no modo de injeção *split* com taxa de 1:20. A temperatura do injetor foi igual a 220 °C e o fluxo do gás de arraste

(gás hélio) de 1,4 mL min<sup>-1</sup>. A temperatura inicial da coluna foi de 60°C, mantida por 1 min, com taxa de 3°C min<sup>-1</sup> até 260°C, mantida por 5 min, solvente *delay* de 4 min e um tempo de corrida de 40 min, sendo as condições adaptadas de Adams (2007).

A identificação das substâncias foi realizada por comparação dos seus espectros de massas com os espectros das bibliotecas Adams (2007) e a biblioteca Nist, armazenados na base de dados do MS. A confirmação da identificação dos compostos foi realizada pelo índice de Kovats, por meio da análise cromatográfica da mistura contendo os alcanos não ramificados de 8 a 20 carbonos (C8-C20).

## 2.5 Análises estatísticas

As áreas dos picos cromatográficos dos componentes das amostras e os óleos essenciais foram relacionadas por meio de análises multivariadas de componentes principais (PCA) (matriz de covariância) e de agrupamento hierárquico (HCA) (medida de distância Euclidiano e variáveis não padronizadas), utilizando para tanto o software Minitab v. 17.3.1.

## 2.6 Ensaios biológicos

As análises dos óleos essenciais cítricos foram testadas contra as bactérias *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e as leveduras *Candida krusei* ATCC 20298 e *Candida parapsilosis* ATCC 22019.

O *screening* da atividade antimicrobiana foi desenvolvido pelo método de difusão em placas nos discos de papel, baseado no proposto pelo CLSI (2015) com adequações. Os discos de papel filtro de 6 mm de diâmetro foram impregnados com 20 µL do óleo essencial cítrico e colocados no centro da placa de Petri, na qual continha a suspensão e o meio de cultura apropriado. Após 24 horas de incubação, as placas foram avaliadas e registrada a presença dos halos de inibição.

## 3. Resultados e Discussão

### 3.1 Rendimento e análises físico-química dos óleos essenciais

Os rendimentos em massa dos óleos essenciais, expressos em percentuais médios, e os resultados das análises de densidade, índice de refração e de solubilidade em etanol 90% dos OEs estão apresentados na Tabela 1.

Observou-se que as laranjas exibiram um rendimento de extração superior às demais frutas, sendo o cultivar campista o destaque, com rendimento acima de 3% m<sup>-1</sup>. Os resultados obtidos para as demais laranjas ultrapassam o teor de 2% m<sup>-1</sup>. A mexerica do rio, limão-taiti e o limão-cravo apresentaram rendimentos inferiores a 1,5% m<sup>-1</sup>.

**Tabela 1.** Médias e desvio padrão de rendimento, densidade, índice de refração e solubilidade em etanol 90% dos óleos essenciais extraídos das cascas das frutas cítricas.

Amostras	Rendimento (%m m <sup>-1</sup> )	Densidade (g mL <sup>-1</sup> )	Índice de refração	Volume (mL) solúvel em etanol 90%
Laranja campista	3,58±0,21	0,845 ± 0,07	1,4715 ±0,008	0,4
Laranja-pera	2,62±0,19	0,848 ± 0,01	1,4724 ±0,005	0,4
Laranja-bahia	2,06±0,18	0,844 ± 0,02	1,4725 ±0,006	0,4
Laranja serra d'água	2,57±0,20	0,843 ± 0,03	1,4720 ±0,003	0,4
Mexerica	1,21±0,15	0,858 ± 0,04	1,4742 ±0,005	0,3
Limão-taiti	1,43±0,22	0,857 ± 0,03	1,4755 ±0,007	0,5
Limão-cravo	1,01±0,11	0,856 ± 0,02	1,4725 ±0,003	0,5

Fonte: Autores.

Estudos conduzidos por Simas e colaboradores (2015) relataram o rendimento de 2,03%, 1,68% e 1,06% m m<sup>-1</sup> para os óleos das cascas das laranjas-pera, bahia e limão-taiti, respectivamente. Um rendimento menor (0,98% m m<sup>-1</sup>) foi relatado por Ademosun e colaboradores (2015) para o OE de cascas de laranja. Dessa forma, os rendimentos de OEs das cascas de laranjas obtidos em nosso trabalho foram superiores aos relatados na literatura.

O rendimento para OEs extraídos de casca de limões (*Citrus limon*) (0,47 a 0,59% m m<sup>-1</sup>) e de diferentes genótipos de tangerinas (0,25 a 1,29% m m<sup>-1</sup>), descritos por Teixeira e colaboradores (2013; 2014), também se mostraram inferiores aos valores obtidos em nosso trabalho.

As referidas variações nos rendimentos dos OEs podem ser atribuídas ao tipo de extração e às precauções relacionadas com armazenamento das cascas antes da extração, diferenças de época de colheita, tipo de solo, clima da região e umidade relativa do ar no dia da coleta da fruta (Millezi et al., 2013).

Os valores obtidos para as análises físico-químicas refletem a qualidade e a identidade de cada óleo. Os resultados da densidade mostram que os OEs de laranjas possuem valores próximos, abaixo de 0,850 g mL<sup>-1</sup>, enquanto os limões apresentaram comportamento similar à mexerica, acima de 0,850 g mL<sup>-1</sup>. Tais comportamentos estão relacionados à composição dos óleos.

Para o índice de refração, todas as amostras estudadas apresentaram valores semelhantes, acima de 1,4700). O comportamento homogêneo também foi observado para solubilidade em etanol 90%, entre 0,3 mL na mexerica a 0,5 mL nos limões.

Ferhat et al. (2006) analisaram óleos essenciais extraídos de cascas de laranja e obtiveram densidade de 0,86 g mL<sup>-1</sup>, índice de refração igual a 1,475 e 0,4 mL de solubilidade em etanol 95%. O valor de densidade foi superior ao obtido neste trabalho, mas os resultados foram semelhantes para os parâmetros de índice de refração e solubilidade em etanol.

Viuda-Martos et al. (2008) determinaram para a mesmas espécies de laranja densidade de 0,85 g mL<sup>-1</sup> e índice de refração igual a 1,470. Gamarra et al. (2006) analisaram óleos essenciais de lima (*C. aurantifolia*) obtendo valores de índice de refração e densidade de 1,475 e 0,847 g mL<sup>-1</sup>, respectivamente. Já Viuda-Martos et al. (2008) encontraram valores de 1,480 e 0,850 g mL<sup>-1</sup> para limão (*C. limon*) e 1,475 e 0,850 g mL<sup>-1</sup> para tangerina (*C. reticulada*). Para a tangerina (*C. clementina*), Lan-Phi et al. (2015) obtiveram valores para índice de refração e densidade bem inferiores (1,3988 e 0,840 g mL<sup>-1</sup>) em OEs de frutas cítricas do Vietnã.

Por sua vez, Everton e colaboradores (2020) encontraram para a laranja (*C. sinensis*) valores de 0,8500 g mL<sup>-1</sup> e 1,4760 para densidade e índice de refração, respectivamente.

Dadas as similaridades, nossos resultados corroboram com os descritos na literatura. As diferenças sutis podem estar relacionadas a fatores de cultivo como tipo de solo, adubação, disponibilidade de água, época de colheita e tempo de armazenamento (Costa et al., 2012).

### 3.2 Identificação dos compostos presentes nos óleos essenciais

A análise dos compostos voláteis presentes nos OEs de frutas cítricas resultou na identificação de 61 compostos distintos, o que mostra a grande variedade entre seus constituintes. Farhat *et al.* (2011) identificaram 31 compostos presentes em óleo essencial de laranja cultivada na Espanha, enquanto Teixeira *et al.* (2013) caracterizaram 29 componentes voláteis distintos de quinze genótipos de limões. Ademosun *et al.* (2015) identificaram 45 compostos em óleos essenciais de laranjas e em 2020, Everton e colaboradores identificaram em óleo de laranjas somente 15 compostos.

A Tabela 2 apresenta os compostos identificados e suas respectivas porcentagens referente as áreas relativas dos picos, além de apresentar os tempos de retenção, índice de Kovats de referência e o calculado.

No OE extraído da laranja campista, foram identificados 24 compostos diferentes, sendo os d-limoneno,  $\beta$ -pineno e  $\beta$ -linalol as substâncias que apresentaram maiores áreas relativas dos picos. Já no OE da laranja-pera, 19 compostos foram identificados e os picos majoritários são os mesmos observados para o OE da laranja campista. O OE da laranja-bahia apresentou 22 compostos distintos enquanto no da laranja serra d'água foram identificados 23 compostos. Os dois picos majoritários para essas amostras foram o d-limoneno e o  $\beta$ -pineno.

Sete compostos (sabineno,  $\beta$ -pineno, octanal, d-limoneno,  $\beta$ -linalol, 4-terpeneol e  $\alpha$ -terpeneol) foram identificados em todas as amostras, sendo todos minoritários, exceto o d-limoneno. Os três grupos de amostras laranja, mexerica e limão apresentaram diferenças na sua composição química com relação aos compostos minoritários. Cinco compostos foram exclusivos da mexerica, sendo eles, o  $\beta$ -cimeno, carvacrol,  $\alpha$ -selineno,  $\alpha$ -farneseno e  $\alpha$ -sinensal. Nas laranjas foram exclusivos nove compostos: 3-careno, (E)-óxido de limoneno, nonanol, acetato de octila, decanol, acetato de  $\alpha$ -terpeniol,  $\delta$ -selineno, eremofileno, valenceno, óxido de  $\beta$ -cariofileno e  $\gamma$ -eudesmol. Os limões diferenciaram consideravelmente das demais amostras, apresentando dezenove compostos exclusivos.

Para os limões e mexericas, foi observado que as quantidades de compostos identificados foram superiores aos de laranja. Nos dois limões foram identificados 34 e 35 compostos, sendo as substâncias d-limoneno,  $\gamma$ -terpineno e  $\beta$ -pineno as mais abundantes.

Alguns desses compostos identificados foram similares aqueles descritos por Farhat *et al.* (2011). Nos seus estudos a respeito da composição de óleos essenciais de laranja, foram identificados o  $\alpha$ -pineno, sabineno,  $\beta$ -pineno,  $\alpha$ -felandreno, careno, d-limoneno, terpineno, linalol, citronelal, 4-terpinol,  $\alpha$ -terpineol, nerol, geranial, elemeno  $\alpha$ -bergamoteno,  $\alpha$ -humuleno,  $\beta$ -farneseno, valenceno, óxido de cariofileno, nonanal, decanal, undecanal, acetato de citronelila, entre outros. Os autores determinaram o teor de 95% de limoneno e (0,29%) para o linalol o segundo composto majoritário.

**Tabela 2.** Compostos identificados e a porcentagem de suas áreas por GC-MS dos OEs extraídos das cascas de frutas cítricas de estabelecimentos comerciais e pomares localizados em de Minas Gerais.

Nº	Composto	T.R. (min)	IKE	IKT	Lac	Lap	Lab	Las	Me	Lit	Lic
1	$\alpha$ -Tujeno	3,3	929	928	-	X	X	X	0,48	0,47	0,30
2	$\alpha$ -Pinenos	5,5	935	931	0,52	0,54	0,38	0,34	1,43	1,56	1,31
3	$\alpha$ -Fencheno	5,9	948	959	X	X	X	X	0,01	0,04	0,03
4	Sabineno	6,6	969	964	0,25	0,28	0,31	0,29	0,23	1,24	1,43
5	$\beta$ -Pinenos	6,7	972	965	0,02	0,06	0,06	0,11	1,14	8,82	8,67
6	Octanal	7,5	996	982	0,28	0,24	0,21	0,55	X	X	0,27
7	$\alpha$ -Felandreno	7,5	997	997	X	X	X	X	0,09	0,05	X
8	3-Careno	7,7	1003	1005	0,15	0,13	0,11	0,02	X	X	X
9	$\alpha$ -Terpineno	7,9	1010	1008	X	X	X	X	0,36	0,40	0,41
10	$\beta$ -Cimeno	8,2	1018	1010	X	X	X	X	0,70	X	X
11	d-Limoneno	8,5	1027	1020	93,34	94,75	94,74	94,10	77,31	50,28	65,60
12	$\beta$ -Ocimeno	9,0	1041	1041	X	X	0,02	0,04	X	0,08	0,15
13	$\gamma$ -Terpineno	9,4	1052	1047	X	0,07	0,32	0,24	14,98	16,33	12,96
14	Octanol	9,8	1065	1054	0,35	0,28	0,35	0,43	X	X	0,06
15	$\alpha$ - Terpinoleno	10,5	1083	1078	0,03	X	0,04	X	0,07	0,79	0,70
16	$\beta$ -Linalol	10,9	1096	1081	1,70	1,14	0,55	0,42	0,17	0,47	0,21
17	Nonanal	11,1	1101	1128	X	X	X	X	X	X	0,07
18	(E)-Oxido de limoneno	12,4	1135	1121	0,06	0,01	0,03	0,06	X	X	X
19	(R)-Citronelal	13,1	1153	1152	0,03	0,03	X	X	0,03	0,09	0,37
20	Isoborneol	13,5	1165	1138	X	X	X	X	X	0,09	X
21	Nonanol	13,9	1173	1149	X	X	X	0,02	X	X	X
22	4-Terpineol	14,0	1177	1161	0,05	0,02	0,04	0,05	0,20	0,58	0,76
23	$\alpha$ -Terpineol	14,6	1191	1172	0,13	0,11	0,12	0,18	0,47	1,37	1,58
24	Decanal	15,3	1209	1183	0,24	0,19	0,20	0,29	0,06	X	0,06
25	Acetato de octila	15,5	1215	1185	0,06	X	X	0,06	X	X	X
26	Geraniol	16,2	1231	1228	X	X	X	X	X	0,83	X
27	$\beta$ -Citronelol	16,2	1233	1208	0,11	X	0,12	0,17	0,07	X	0,36
28	$\beta$ -Citral	16,8	1245	1214	0,06	0,04	0,04	0,14	X	2,71	0,06
29	$\alpha$ -Citral	18,0	1275	1249	X	X	X	X	X	3,60	X
30	Decanol	18,1	1277	1256	X	X	X	0,58	X	X	X
31	Carvacrol	19,2	1303	1278	X	X	X	X	0,07	X	X
32	$\delta$ -Elemeno	20,7	1340	1334	X	X	X	X	X	0,06	X
33	Acetato de $\alpha$ -terpineol	21,3	1352	1333	0,01	X	X	X	X	X	X
34	Acetato de citronelol	21,5	1358	1313	X	X	X	X	X	X	0,04
35	Acetato de nerol	22,0	1368	1342	X	X	X	X	X	1,25	X
36	Acetato de geranila	22,8	1387	1360	X	X	X	X	X	0,53	X
37	$\alpha$ -Cubebeno	22,9	1390	1366	X	0,02	X	0,03	0,01	X	0,06



38	$\beta$ -Elemeno	23,0	1393	1387	X	X	X	X	X	0,07	X
39	$\alpha$ -Bergamoteno	24,0	1414	1407	X	X	X	X	X	0,06	0,04
40	$\alpha$ -Cariofileno	24,1	1418	1424	0,04	X	0,08	X	0,09	0,53	0,23
41	$\beta$ -Cariofileno	24,8	1434	1424	X	X	X	X	X	X	0,58
42	$\alpha$ -Humuleno	25,5	1449	1456	X	X	X	X	X	0,05	0,03
43	$\beta$ -Santaleno	25,7	1457	1434	X	X	X	X	0,01	X	0,04
44	D-Germacreno	26,6	1476	1515	0,02	0,01	X	0,02	0,01	0,10	0,52
45	$\delta$ -Selineno	26,7	1479	1509	0,01	X	X	X	X	X	X
46	$\beta$ -Farnesene	26,7	1480	1449	X	X	X	X	X	0,09	0,03
47	Eremofileno	27,1	1488	1486	0,38	X	0,53	0,20	X	X	X
48	Valenceno	27,1	1488	1474	X	0,07	X	X	X	X	X
49	$\alpha$ -Selineno	27,1	1489	1523	X	X	X	X	0,05	X	X
50	Elixeno	27,2	1491	1492	X	X	X	X	X	X	0,08
51	$\alpha$ -Bisaboleno	27,5	1499	1521	X	X	X	X	X	0,24	0,07
52	$\beta$ -Bisaboleno	27,7	1504	1500	X	X	X	X	X	2,29	1,29
53	$\alpha$ -Farneseno	27,8	1505	1499	X	X	X	X	0,17	X	X
54	$\delta$ -Cadineno	28,3	1517	1514	0,04	0,03	0,02	0,05	0,02	X	0,14
55	B-Germacreno	29,5	1547	1554	X	X	X	X	X	0,21	X
56	Oxido de $\beta$ -cariofileno	30,5	1572	1576	X	X	0,03	X	X	X	X
57	$\beta$ -Santalol	33,3	1653	1694	X	X	X	X	X	0,03	0,44
58	$\gamma$ -Eudesmol	33,3	1640	1627	0,02	X	0,02	X	X	X	X
59	Farnesol	33,8	1657	1658	X	X	X	X	X	0,09	X
60	$\alpha$ -Bisabolol	34,5	1677	1683	X	X	X	X	X	0,10	0,03
61	$\alpha$ -Sinensal	37,2	1753	1731	X	X	X	X	0,07	X	X
<b>Total de compostos</b>					24	19	22	23	26	34	35

Tr = tempo de retenção; IKC = índice de Kovats calculado; IKT = índice de Kovats teórico; Lac = laranja campista; Lap = laranja-pera; Lab = laranja-bahia; Las = laranja serra d'água; Me = mexerica; Lit = limão-taiti; Lic = limão-cravo. X = ausência. Fonte: Autores.

Já Teixeira et al. (2013) identificaram compostos presentes nos OEs de 15 genótipos de limões, sendo três substâncias majoritárias: o d-limoneno (46,20 – 67,80%),  $\beta$ -pineno (7,98 – 17,81%) e o  $\gamma$ -terpineno (8,46 – 13,45%).

Por sua vez, Ademosun et al. (2015) identificaram  $\alpha$ -pineno, sabineno,  $\beta$ -pineno,  $\alpha$ -felandreno, d-limoneno, ocimeno, decanal,  $\gamma$ -terpineno, neral, geranial, geraniol, nerol, linalol,  $\alpha$ -terpineol, 4-terpinenol,  $\beta$ -cariofileno,  $\alpha$ -bergamoteno,  $\gamma$ -cardineno,  $\beta$ -elemeno, D-germacreno e  $\alpha$ -humuleno em OEs de cascas de laranjas, com um teor de d-limoneno superior a 90%.

Everton e colaboradores (2020) identificaram diversos compostos nos OEs de cascas de laranjas, sendo os majoritários o d-limoneno (81,5%), linalol (6,36%),  $\beta$ -mircenol (2,95%) e o  $\alpha$ -terpineol (1,39%).

Comparando os nossos resultados com os descritos na literatura, observou-se que houve semelhanças nos compostos majoritários.

A comparação da porcentagem da área obtida para o d-limoneno nas diferentes amostras mostra que os teores obtidos para as laranjas são superiores a 90%. O limão-taiti apresentou a menor porcentagem de limoneno, abaixo de 50%, enquanto na mexerica e no limão-cravo o teor de d-limoneno foi superior a 60%.



O limoneno é o componente principal dos óleos essenciais frutas cítricas (30% a 97% dependendo da espécie). Outros componentes também contribuem para a composição do perfil químico como:  $\alpha$ - e  $\beta$ -pineno (0,3% até 15%),  $\gamma$ -terpineno (aproximadamente 10%), mircenolol (aproximadamente 3%), entre outros (Simas et al., 2015).

Como se pode constatar, o principal constituinte de OEs de citros é o d-limoneno, cujo teor pode variar de 32 a 98%, sendo observada nas laranjas uma variação de 68 a 98%, no limão entre 45 a 76% e de 32 a 45% em tangerinas (Dugo et al., 2012; Palazzolo et al., 2013).

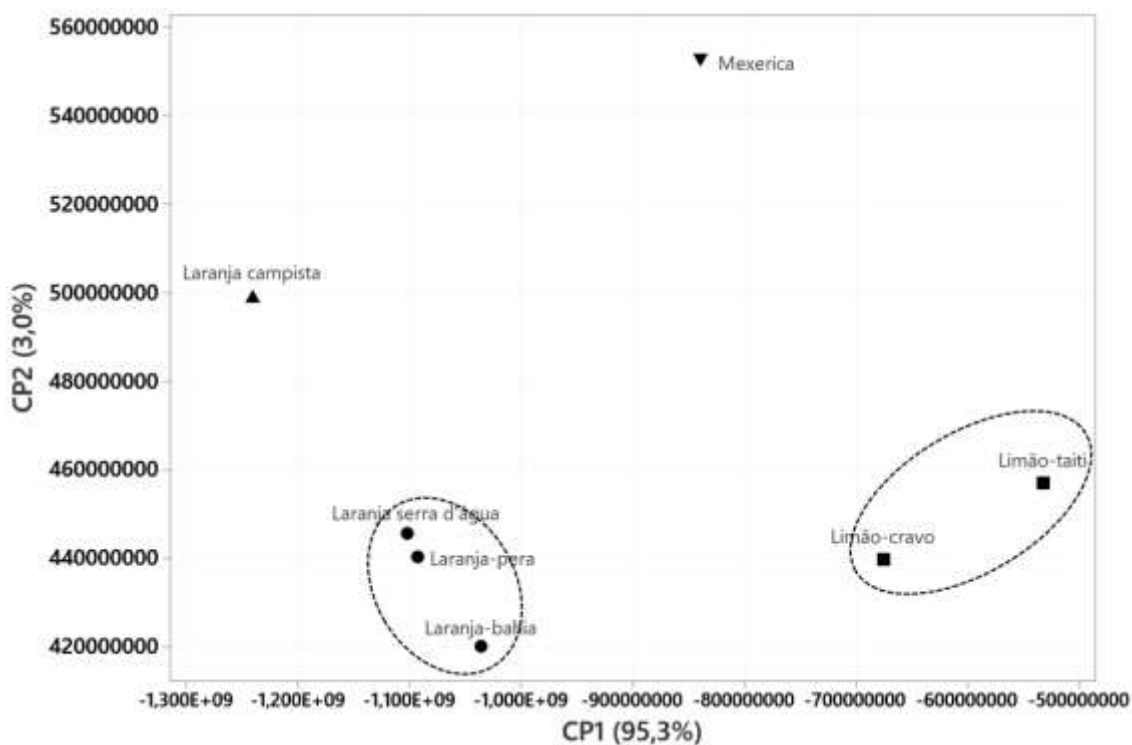
### 3.3 Análise estatística

Os tratamentos estatísticos por PCA e HCA foram aplicados com intuito de utilizar as áreas relativas dos constituintes dos OEs para encontrar padrões de agrupamento das amostras.

A PCA apresentou 98,3% da variância total, com base na matriz de covariância, para os dois primeiros componentes principais sendo uma porcentagem muito representativa da variância total dos dados.

A PCA possibilitou dois agrupamentos dos OEs, sendo o primeiro formado pelas laranjas pera, bahia e serra d'água e o segundo pelos limões cravo e taiti. Já a mexerica e a laranja campista não fizeram parte de agrupamentos (Figura 1).

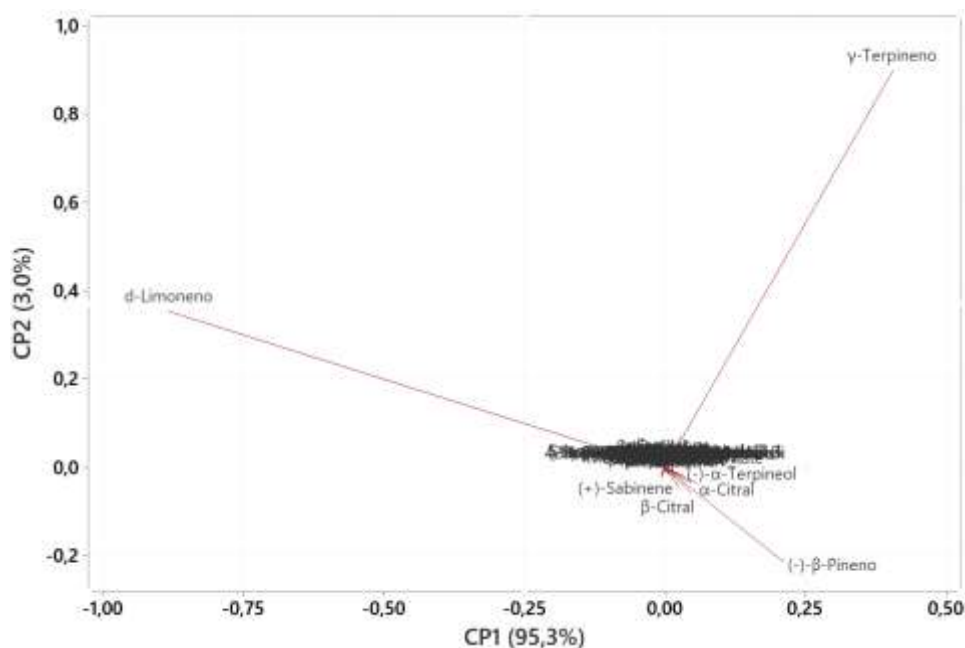
**Figura 1.** Gráfico dos escores dos compostos voláteis das amostras de OEs



Fonte: Autores.

Os comportamentos observados da Figura 1 são fortemente associados às elevadas cargas fatoriais, em módulo, dos compostos majoritários dos OEs, destacando-se o d-limoneno,  $\gamma$ -terpineno e (-)- $\beta$ -pineno (Figura 2).

**Figura 2.** Gráfico de cargas fatoriais dos compostos voláteis presentes nos OEs.



Fonte: Autores.

A carga fatorial do d-limoneno é responsável por distribuir as amostras de laranjas na região de menores escores de CP1, tendo em vista a elevada área relativa deste composto associada aos referidos OEs. Por outro lado, os limões apresentam maiores escores na CP1 por apresentarem as menores áreas relativas de d-limoneno (50,28% e 65,60%).

Já  $\gamma$ -terpineno apresenta cargas fatoriais elevadas e positivas nas CP1 e CP2, favorecendo o deslocamento das amostras de limões, abundantes nesta substância, para a região de elevados escores destas componentes.

O (-)- $\beta$ -pineno, menos abundante entre os três compostos voláteis majoritários, auxilia o deslocamento dos escores dos limões para a região de escores mais elevados em CP1 e para a região de escores menos elevados de CP2.

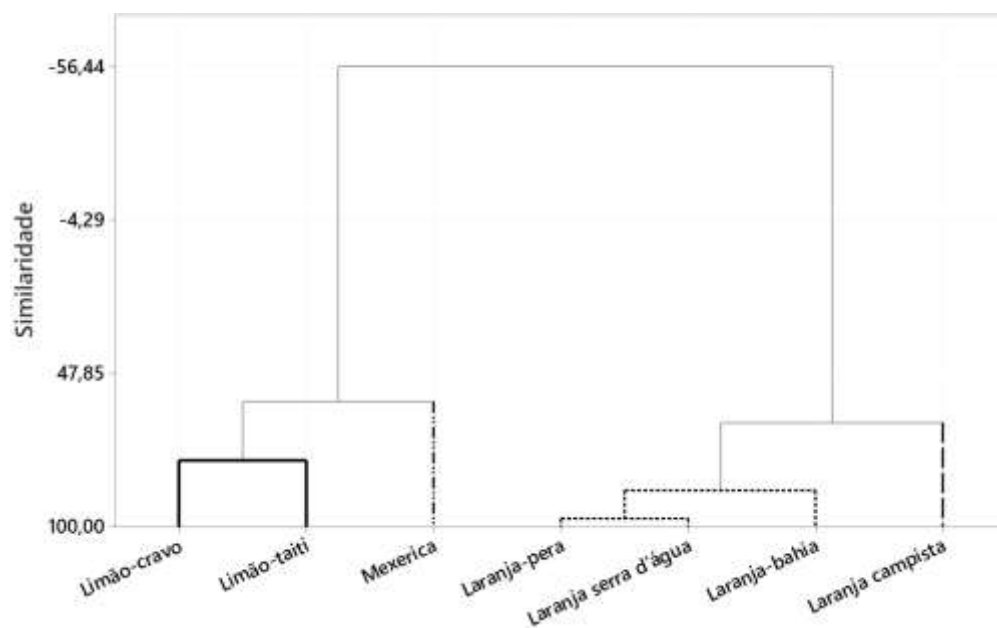
As amostras de mexerica e de laranja campista apresentaram escores peculiares sem formar grupos, pois a primeira tem área relativa intermediária de d-limoneno, adquirindo escore na posição central do gráfico. O elevado escore em CP2 se deve à elevada área relativa de  $\gamma$ -terpineno e à baixa área relativa de (-)- $\beta$ -pineno. A segunda apresenta o menor escore em CP1 por apresentar elevada área relativa de d-limoneno, não apresentar  $\gamma$ -terpineno e ter a menor área relativa de (-)- $\beta$ -pineno.

Paralelamente, a laranja campista possui características sensoriais distintas aos demais cultivares de laranja do presente estudo, por serem mais ácidas e menos doces.

Nos estudos de Gomes (2011), o limão-cravo não ficou agrupado com o limão-taiti, comportamento diferente do observado. O autor também correlacionou os três grupos obtidos com os respectivos compostos majoritários. Assim, no seu estudo, os escores de laranja e de mexerica ponkan ficaram próximos devido à similaridade do teor de d-limoneno. O limão-taiti e a cidra se agruparam devido aos teores dos compostos voláteis neral, geranial,  $\alpha$ -terpineol e cimeno. Já o limão-cravo apresentou similaridade entre os teores dos compostos voláteis  $\gamma$ -terpineno e  $\beta$ -pineno.

Em seguida, utilizou-se HCA para avaliar o padrão de agrupamento das amostras de óleos essenciais com base nas áreas relativa, utilizando variáveis não padronizadas e métodos de ligação de Ward e Completa (Figura 3).

**Figura 3.** Dendrograma das amostras de OEs considerando as áreas relativas dos compostos voláteis.



Sendo: processamento dos dados por meio do método de ligação de Ward. Fonte: Autores.

Em ambos os métodos de ligação, observou-se um nível de similaridade satisfatório igual a 77,4%, sendo formados os grupos estimados na PCA, mantendo sem agrupamento as amostras de mexerica e de laranja campista.

### 3.4 Atividade antimicrobiana dos OEs

Para a avaliação do comportamento antimicrobiano dos OEs extraídos de cascas de frutas cítricas, empregou-se método de difusão em disco frente a duas bactérias (*S. aureus* e *E. coli*) e duas leveduras (*C. parapsilosis* e *C. krusei*), estando os resultados evidenciados na Tabela 3.

**Tabela 3.** Resultado das atividades antimicrobianas dos OEs extraídos das cascas de frutas cítricas frente aos microrganismos *E. coli*, *S. aureus*, *C. krusei* e *C. parapsilosis*

OEs	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>C. krusei</i>	<i>C. parapsilosis</i>
Laranja campista	+	-	-	-
Laranja-pera	+	-	+	+
Laranja-bahia	+	-	-	+
Laranja serra d'água	+	-	+	+
Mexerica	+	+	+	+
Limão-taiti	+	+	+	+
Limão-cravo	+	+	+	+

Sendo: + presença de halo; - ausência de halo. Fonte: Autores.

Todos os OEs obtidos apresentaram atividade antimicrobiana frente à bactéria *E. coli*, diferente da *S. aureus* cujo crescimento foi inibido pelos OEs de mexerica, limão-taiti e limão-cravo. Este resultado pode indicar uma ação antimicrobiana de substâncias majoritárias como o  $\gamma$ -terpineno e o (-)- $\beta$ -pineno ou o efeito sinérgico entre compostos específicos dos OEs ativos.

Santos e colaboradores (2016) realizaram estudos comparativos com OEs de frutas cítricas e verificaram que a *Citrus reticulata* tem melhor atividade contra *E. coli*, indicando que o perfil dos constituintes dos OEs é determinante na intensidade da referida atividade antimicrobiana.

Com relação à *S. aureus*, Lin et al. (2010) relatam que a bactéria é capaz de sobreviver em ambientes adversos. Assim, estima-se que esta capacidade estaria sendo evidenciada frente aos OEs de laranja do presente estudo.

Já para a levedura *C. krusei* foi observada a formação de halo de inibição para os OEs de laranja-pera e de laranja serra d'água, agrupados pelas análises multivariadas realizadas, mexerica e limão-cravo e limão-taiti, estes dois também agrupados.

A levedura *C. parapsilosis*, por sua vez, teve seu crescimento inibido por todos os OEs, exceto o da laranja campista. Mesmo sendo um cultivar de laranja, esta amostra não foi agrupada com as demais por sua composição peculiar, considerando os compostos majoritários: elevado teor de d-limoneno, ausência de  $\gamma$ -terpineno e baixo teor de (-)- $\beta$ -pineno, característica que pode estar associada à não inibição da levedura.

De modo geral, os OEs da mexerica, limão-taiti e limão-cravo foram capazes de inibir o crescimento de todos os microrganismos analisados, comportamento que pode estar relacionado com teores não muito elevados de d-limoneno e moderados de  $\gamma$ -terpineno e de (-)- $\beta$ -pineno.

Lopes et al. (2013) verificaram a atividade antimicrobiana de OEs das cascas de frutos e das folhas da espécie *Citrus limettioide* frente a vários microrganismos, sendo alguns relatados neste trabalho (*S. aureus*, *E. coli* e *C. parapsilosis*). Para as folhas foi observada a inibição do crescimento apenas das bactérias, sendo o linalol o componente majoritário. Já os OEs das cascas dos frutos, cujo componente majoritário é o d-limoneno, não apresentaram atividade antimicrobiana.

Contudo, a associação entre os componentes dos OEs e a atividade antimicrobiana pode ser mais complexa. Por exemplo, Henriques et al. (2009) relatam a atividade antimicrobiana das substâncias limoneno, linalol, 4-terpinenol,  $\beta$ -ocimeno e geranial, todos presentes nos OEs extraídos nesse trabalho.

Estudos descritos por Gerhardt et al. (2012) mostraram que o OE de limão-cravo possui atividade antimicrobiana frente as bactérias *S. aureus* e *E. coli* testadas, resultado que corrobora com esse trabalho.

Espina et al. (2011) avaliaram a influência dos OEs de laranja, limão e tangerina frente a *S. aureus*, *E. coli*, entre outras bactérias. Os OEs de limão e laranja não mostraram inibição contra os microrganismos testados. Já o de tangerina mostrou um amplo espectro de atividade antimicrobiana para todos os microrganismos.

Cavalcanti et al. (2012) observaram a atividade antifúngica para as espécies do gênero *Candida* (*C. albicans*, *C. krusei* e *C. tropicalis*), sendo os OEs das espécies *C. aurantium*, *C. limon* e *C. reticulata* ativos.

Por meio dos testes antimicrobianos verificou-se que os óleos essenciais testados foram efetivos no controle do desenvolvimento da maioria dos microrganismos testados, sendo o potencial antimicrobiano diferente em função da espécie testada. Além disso estima-se que a atividade antimicrobiana de OEs das cascas de frutas cítricas estudadas está relacionada a sua constituição química que pode ser influenciada pelo método de extração e pelas condições de cultivo da planta (Costa et al., 2012).

Dessa forma, pode-se estimar que a atividade antimicrobiana de OEs das cascas de frutas cítricas estudadas está relacionada a sua constituição química que pode ser influenciada pelo método de extração e pelas condições de cultivo da planta (Costa et al., 2012).

#### 4. Conclusão

Os cultivares de laranja apresentaram rendimento de extração de OE superior às outras amostras, sendo a laranja campista a de melhor resultado: 3,58% m m<sup>-1</sup>. Os demais cultivares apresentaram rendimentos de extração superiores a 2,00% m m<sup>-1</sup> enquanto as outras espécies estudadas tiveram rendimentos inferiores a 1,50% m m<sup>-1</sup>.

As análises físico-químicas evidenciaram densidades menores que 0,85 g mL<sup>-1</sup> para os cultivares de laranja e maiores para as demais espécies. A solubilidade em etanol 90% foi diferenciada, sendo menor para o OE de mexerica (0,3 mL), maior para as espécies de limões (0,5 mL) e intermediária para os cultivares de laranja (0,4 mL). Por sua vez, o índice de refração de todos os OEs foi similar a 1,4700.

A análise por GC-MS possibilitou a identificação de 61 constituintes distintos nos OEs, evidenciando comportamentos como o elevado teor relativo de d-limoneno nos cultivares de laranja, acima de 90%, enquanto nas demais espécies variou entre 50 a 77%. Paralelo ao menor teor de d-limoneno, estes OEs ainda apresentaram mais dois compostos majoritários representativos: (-)-β-pinene (8 a 9%) e γ-terpineno (13 a 15%).

A PCA e a HCA evidenciaram agrupamentos dos OEs que corroboram com as suas classificações em cultivares de laranja, limão e mexerica, excetuando-se a laranja campista, não agrupada.

Para as análises antimicrobianas dos OEs, todos os microrganismos foram sensíveis contra os limões e mexericas e todos os OEs apresentaram atividade antimicrobiana frente a bactéria *E. coli*. Já as leveduras foram sensíveis aos cultivares laranja-pera e laranja serra d'água, sendo a *C. parapsilosis* sensível à laranja-bahia. Os óleos essenciais dos diferentes tipos de laranjas não apresentaram efeito inibidor contra a linhagem de *S. aureus* testada.

Assim, foi possível propor uma metodologia eficiente com a finalidade de se aproveitar o excedente das cascas de frutas cítricas, ação de sustentabilidade e que gera ganhos econômicos e ambientais. Além disso foi possível gerar informações aos produtores e consumidores sobre a variação da composição química dos OEs de algumas das frutas cítricas comercializadas no Brasil.

Como perspectivas futuras pretende-se realizar outras análises microbiológicas incluindo novos microrganismos patogênicos, buscando ampliar as aplicações dos óleos essenciais extraídos de excedentes das cascas de frutas cítricas. Com relação às análises multivariadas, objetiva-se fazer uso da matriz de correlação para verificar padrões de agrupamentos por PCA, relacioná-los aos compostos voláteis e aos resultados das análises microbiológicas. Por fim, os óleos essenciais extraídos serão analisados em um polarímetro para o registro de sua atividade óptica, uma medida de grande importância no controle de qualidade físico-químico de óleos essenciais e útil na comparação entre as amostras.

#### Agradecimentos

O trabalho foi realizado com o apoio do Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais (CEFET-MG) e dos órgãos de fomento “Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) e Conselho Nacional de Pesquisas (CNPq)”.

#### Referências

- ABNT. NBR 5784. (1985a). *Óleos Essenciais, determinação da massa específica e densidade relativa, método de ensaio*.
- ABNT. NBR 5785. (1985b). *Óleos Essenciais, determinação do índice de refração, método de ensaio*.
- ABNT. NBR 5791 (1989). *Óleos Essenciais, determinação da solubilidade em etanol*.
- Adams, R. P. (2007). *Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry*. (4a ed.), Carol Stream: Allured Publishing Corporation.

- Ademosun, A. O., Oboh, G. O., Olupona, A. J., Oyeleye, S. I., Adewuni, T. M. & Nwanna, E. E. (2015). Comparative study of chemical composition, *in vitro* Inhibition of cholinergic and monoaminergic enzymes, and antioxidant potentials of essential oil from peels and seeds of sweet orange (*Citrus sinensis* [L.] Osbeck) fruits. *Journal of Food Biochemistry*, 40(2016), 53–60. doi: 10.1111/jfbc.12187.
- Antenor, S. & Szigethy, L. (2021). Resíduos sólidos urbanos no Brasil: desafios tecnológicos, políticos e econômicos. *IPEA- Centro de Pesquisa em Ciência, Tecnologia e Sociedade*. <https://www.ipea.gov.br/cts/pt/central-de-conteudo/artigos/artigos/217-residuos-solidos-urbanos-no-brasil-desafios-tecnologicos-politicos-e-economicos>.
- Barbosa, K. R., Winke, L. O. L., Luz, M. L. G. S., Luz, C. A. S., Gadotti, G. I., Gome, M. C. & Navroski, R. (2016). Análise Econômica de Indústria de Extração de Óleos Essenciais a partir de Frutas Cítricas. *Revista Técnico-Científica do CREA-PR*, 7, 1-11. ISSN 2358-5420.
- Brasil. (2019). *Farmacopéia Brasileira*. (6a ed.), Agência Nacional de Vigilância Sanitária.
- Calo, J. R., Crandall, P. G., O'Bryan, C. A., & Ricke, S. C. (2015). Essential oils as antimicrobials in food systems - A review. *Food Control*, 54, 111-119. 10.1016/j.foodcont.2014.12.040.
- Cavalcanti, Y. W., Pérez, A. L. A. L., Xavier, G. D. R., Almeida, L. F. D. & Padilha, W.W.N. (2012). Atividade antifúngica de extratos vegetais brasileiros sobre cepas de *Cândida*. *Revista Brasileira de Ciência e Saúde*, 16(1), 43-48. 10.4034/RBCS.2012.16.01.07.
- CLSI (2015). Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that grow aerobically: approved standard. (10a ed.), M07-A10, 35(2), 84-87.
- Costa, D. A., Oliveira, G. A. L. D., Costa, J. P., Souza, G. F. D., Sousa, D. P. D. & Freitas, R. M. (2012). Avaliação da toxicidade aguda e do efeito ansiolítico de um derivado sintético da carvona, *Revista Brasileira de Ciências da Saúde*, 16(3), 303-310. ID: 101292200.
- Da Silva, L. A. S.; de Oliveira, V. C. & Mendes, F. B. (2020). Principais aplicações dos resíduos da laranja e sua importância industrial. *Revista Artigos. Com*, 22, 1-11. ISSN 2596-0253
- Dugo, G., Bonaccorsi, I., Sciarrone, D., Schipilliti, L., Russo, M., Cotroneo, A., Dugo, P., Mondello, L. & Raymo, V. (2012). Characterization of cold-pressed and processed bergamot oils by using GC-FID, GC-MS, GC-C-IRMS, enantio-GC, MDGC, HPLC and HPLC-MS-IT-TOF. *The Journal of Essential Oil Research*, 24(2), 93-117.
- Espina, L., Somolinos, M., Lorán, S., Conchello, P., Garcia-Gonzalo, D. & Pagán, R. (2011). Chemical Composition of Commercial Citrus Fruit Essential Oils and Evaluation of their Antimicrobial Activity Acting Alone or in Combined Processes. *Food Control*, 22(6), 896-902. 10.1016/j.foodcont.2010.11.021.
- Everton, G. O., Araújo, R. J. P., Santos, A. B. S., Rosa, P. V. S., Carvalho Junior, R. G. O., Teles, A. M., Gomes, P. R. B. & Mouchrek-Filho, V. E. (2020). Caracterização química, atividade antimicrobiana e toxicidade dos óleos essenciais da Pimenta dioica L. (pimenta da Jamaica) e *Citrus sinensis* L. Osbeck (laranja doce). *Revista Colombiana de Ciências Químico Farmacêuticas*, 49(3), 641-655. 10.15446/rcciquifa.v49n3.91253.
- Farhat, A., Fabiano-Tixier, A. S., El Maataoui, M., Maingonnat, J. F., Romdhane, M. & Chemat, F. (2011). Microwave steam diffusion for extraction of essential oil from orange peel: kinetic data, extract's global yield and mechanism. *Food Chemistry*, 125(1), 255–261. 10.1016/j.foodchem.2010.07.110.
- Farhat, M. A., Meklati, B. Y., Smadja, J. & Chemat, F. (2006). An improved microwave Clevenger apparatus for distillation of essential oils from orange peel. *Journal of Chromatography A*, 1112(2), 121–126. 10.1016/j.chroma.2005.12.030.
- Gamarra, F. M. C., Sakanaka, L. S., Tambourgi, E. B. & Cabral, F. A. (2006). Influence on the quality of essential lemon (*Citrus aurantifolia*) oil by distillation process. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 23(1), 147-151. 10.1590/S0104-66322006000100016.
- Gerhardt, C., Wiest, J. M., Girolometto, G., Silva, M. A. S. & Weschenfelder, S. (2012). Aproveitamento da casca de citros na perspectiva de alimentos: prospecção da atividade antibacteriana. *Brazilian Journal Food Technology*, 15(spe), 11-17. 10.1590/S1981-67232012005000033.
- Gomes, M.S. (2011). *Caracterização química e atividade antifúngica dos óleos essenciais de cinco espécies do gênero Citrus*. 98f. (Dissertação - Agroquímica) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- Henriques, A. T., Simões-Pires, C. A. & Apel, M. A. (2009). *Óleos essenciais: importância e perspectivas terapêuticas*. Editora Univali,
- Lan-Phi, N. T., Hung, P. V., Lan-Chi, N. T. & Tuan, P. D. (2015). Impact of Growing Locations and Genotypes on Antioxidant and Antimicrobial Activities of Citrus Essential Oils in Vietnam. *Journal of Essential Oil-Bearing Plants*, 18(6), 1421-1432.
- Lin, C.M., Shane-Rong, S., Shu-Chen, H. & Yung-Hsiang, T. (2010). Determination of bactericidal efficacy of essential oil extracted from orange peel on the food contact surfaces. *Food Control*, 21, 1710-1715. 10.1016/j.foodcont.2010.06.008.
- Lopes, L.T.A., Paula, J. R., Tresvenzol, L. M. F., Bara, M. T. F., Sá, S., Ferri, P. H. & Fiuza, T. S. (2013). Composição química e atividade antimicrobiana do óleo essencial e anatomia foliar e caulinar de *Citrus limetiioides* Tanaka (Rutaceae). *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, 34(4), 503-511.
- Millezi, A. F., Baptista, N. N., Caixeta, D. S., Rossoni, D. F., Cardoso, M. G. & Piccoli, R. H. (2013). Caracterização e atividade antibacteriana de óleos essenciais de plantas condimentares e medicinais contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, 15(3), 373-379. <https://doi.org/10.1590/S1516-05722013000300010>.
- Oliveira, I. C. A. de (2011). *Introdução à Metodologia Científica*. (3a ed.), Virtualbooks.,
- Palazzolo, E., Laudicina, V. A. & Germanà, M. A. (2013). Current and Potential Use of Citrus 230 Essential Oils. *Current Organic Chemistry*, 17(24), 3042-3049. 10.2174/13852728113179990122.
- Santos, A. O., Freire, J. A. S., Carvalho, T. D., Barbosa, T. C., Prates, R.P., Silva, J. C. R. L. & Farias, P. K. S. (2016). Atividade antibacteriana e antioxidante de óleos essenciais cítricos com potencialidade para inclusão como aditivos em alimentos. *Caderno de Ciências Agrárias*, 8(3), 15-21. ISSN 2447-6218.

Simas, D. L. R., Amorim, S. H. B. M., Oliveira, J. M., Alviano, D. S. & Silva, A. J. R. (2015). Caracterização dos óleos essenciais de frutas cítricas. *Citrus Research & Technology*, 36(1), 15-26. 10.5935/2236-3122.20150003

Teixeira, J. P. F., Marques, M. O. M. & Figueiredo, J. O. (2013). Composição química de óleos essenciais de quinze genótipos de limão em duas épocas de colheita. *Citrus Research & Technology*, 34(2), 65-74. doi: 10.5935/2236-3122.20130008

Teixeira, J. P. F., Marques, M. O. N. M. & Pio, R. M. (2014). Caracterização dos óleos essenciais em frutos de nove genótipos de tangerina. *Citrus Research & Technology*, 35(1), 1-10. 10.5935/2236-3122.20140001.

Viuda-Martos, M., Ruiz-Navajas, Y., Fernández-López, J. & Pérez-Álvarez, J. P. (2008). Antibacterial activity of different essential oils obtained from spices widely used in Mediterranean diet. *International Journal of Food Science and Technology*, 43(3), 526-531. 10.1111/j.1365-2621.2006.01489.x.