UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL

CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E BIOLÓGICAS

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

UTILIZAÇÃO DE ENZIMAS PARA A OBTENÇÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS E CUMARINAS DA CASCA DE *Citrus latifolia* Tanaka

Juliane Cassini

Caxias do Sul

2010

Juliane Cassini

UTILIZAÇÃO DE ENZIMAS PARA A OBTENÇÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS E CUMARINAS DA CASCA DE *Citrus latifolia* Tanaka

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul, visando a obtenção de grau de Mestre em Biotecnologia

Orientador: Prof. Dr. Aldo J. P. Dillon

Co-orientador: Profª. Dra. Adriana Escalona

Caxias do Sul

2010

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Universidade de Caxias do Sul
UCS - BICE - Processamento Técnico

C345u Cassini, Juliane
Utilização de enzimas para a obtenção de óleos essenciais e cumarinas da casca de citrus latifolia tanaka. / Juliane Cassini. - 2010.
60 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de Caxias do Sul, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2010.
Apresenta bibliografia.
"Orientação: Prof. Dr. Aldo J. P. Dillon ; co-orientadora Profª. Drª. Adriana Escalona."

1. Biotecnologia – Óleos essenciais. 2. Óleos essenciais - Lima ácida Tahiti. 3. Plantas aromáticas - Lima ácida Tahiti. I. Título.

CDU: 57.08:665.52/.54

Índice para o catálogo sistemático:

1. Biotecnologia – Óleos essenciais 57.08:665.52/.54
2. Óleos essenciais - Lima ácida Tahiti 665.52/.54:582.746.21
3. Plantas aromáticas - Lima ácida Tahiti 633.8:582.746.21

Catalogação na fonte elaborada pelo bibliotecário
Marcelo Votto Teixeira – CRB 10/1974

JULIANE CASSINI

UTILIZAÇÃO DE ENZIMAS PARA A OBTENÇÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS E CUMARINAS DA CASCA DE *Citrus latifólia* TANAKA

Dissertação Apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul, Visando a Obtenção de Grau de Mestre em Biotecnologia

Orientador: Prof. Dr. Aldo José Pinheiro Dillon

Co-orientadora: Profa. Dra. Adriana Del Carmen Escalona Gower

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 14 DE ABRIL DE 2010

Orientador: Prof. Dr. Aldo José Pinheiro Dillon

Profa. Dra. Temenouga Nikolova Guecheva

Prof. Dr. Eduardo Cassel

Profa. Dra. Mirian Salvador

UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL
Biblioteca Central

AGRADECIMENTOS

Ao final desse trabalho, gostaria de agradecer:

Ao meu orientador Prof. Dr. Aldo J. P. Dillon, pela confiança, estímulo, amizade e auxílio para a realização desse trabalho em todos os momentos.

À minha co-orientadora Profa. Dra. Adriana Escalona por todas as importantes contribuições e esclarecimentos.

A todos os colegas dos laboratórios de Óleos Essenciais e Extratos Vegetais e de Enzimas e Biomassas que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho.

À comissão de acompanhamento, Dra. Miriam Salvador e Dra. Rute T. Ribeiro, pelas indispensáveis críticas e sugestões.

À minha família e amigos, pela paciência e apoio indispensáveis ao sucesso desse trabalho.

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS.....VI

LISTA DE TABELAS.....IX

LISTA DE ABREVIATURAS.....X

RESUMO.....XI

ABSTRACT.....XIII

1. INTRODUÇÃO.....01

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....03

2.1 A produção de cítricos e seus subprodutos.....03

2.2 Óleos essenciais cítricos.....05

2.3 Aspectos gerais de *Citrus latifolia* Tanaka.....08

2.4 Estrutura e farmacologia das cumarinas.....09

2.5 Métodos de extração e identificação de óleos essenciais e cumarinas.....13

3. OBJETIVOS.....21

4. MATERIAL E MÉTODOS.....23

4.1 Material vegetal.....23

4.2 Caldo enzimático.....23

4.3 Determinação da atividade enzimática do caldo utilizado.....23

4.4 Pré-tratamento enzimático das cascas de *Citrus latifolia* Tanaka.....24

4.5 Extração do óleo essencial por hidrodestilação.....25

4.6 Estudos do efeito da carga enzimática, do tempo de pré-tratamento e da trituração da casca no rendimento da hidrodestilação e composição do óleo essencial.....25

4.7 Estudo do efeito do pré-tratamento enzimático sobre o tempo de hidrodestilação.....27

4.8 Identificação dos compostos do óleo essencial por GC e GC/MS.....27

4.9 Extração de cumarinas dos resíduos das hidrodestilações.....28

4.10 Identificação de compostos cumarínicos nos extratos dos resíduos das hidrodestilações por GC e GC/MS.....29

4.11 Apresentação dos dados e análise estatística.....29

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....30

5.1 Efeito da carga enzimática no rendimento e composição do óleo essencial obtido por hidrodestilação.....30

5.2 Efeito do tempo de pré-tratamento enzimático no rendimento e composição do óleo essencial obtido por hidrodestilação.....33

5.3 Efeito do pré-tratamento enzimático em cascas de *Citrus latifolia* Tanaka trituradas no rendimento e composição do óleo essencial obtido por hidrodestilação.....36

5.4 Efeito do pré-tratamento enzimático sobre o tempo de hidrodestilação.....38

5.5 Identificação e avaliação das proporções de compostos cumarinicos nos extratos obtidos dos resíduos líquidos e sólidos das hidrodestilações.....41

6. CONCLUSÕES.....49

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....50

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Ciclo biossintético dos metabólitos secundários.....6

Figura 2 Representação do aparelho de Clevenger, conectado a um balão, sendo que este, no processo de hidrodestilação, é acoplado a uma manta de aquecimento.....14

Figura 3 Demonstração da ação das enzimas sobre a molécula de celulose: (a) endoglucanases; (b) celobiohidrolases ou exoglucanases, (c) sinergismo das frações enzimáticas e (d) β-glicosidases.....19

Figura 4 Rendimento em óleo extraído por hidrodestilação de 1 hora após pré-tratamento com diferentes cargas enzimáticas.....31

Figura 5 Rendimento em óleo extraído por hidrodestilação de 1 hora após diferentes tempos de pré-tratamento enzimático.....34

Figura 6 Relação entre rendimento em óleo e tempo de hidrodestilação na amostra pré-tratada com 5 FPA/g.....39

Figura 7 Relação entre rendimento em óleo e tempo de hidrodestilação na amostra pré-tratada com 7 FPA/g.....40

Figura 8 Relação entre rendimento em óleo e tempo de hidrodestilação na amostra pré-tratada com 12 FPA/g.....40

Figura 9 Percentagem dos compostos cumarínicos encontrados dos resíduos líquidos das hidrodestilações no grupo controle e no grupo submetido ao pré-tratamento enzimático.....43

Figura 10 Percentagem dos compostos cumarínicos encontrados dos resíduos líquidos das hidrodestilações no grupo controle e no grupo submetido ao pré-tratamento enzimático com carga de 7FPA/g.....43

Figura 11 Percentagem dos compostos cumarínicos encontrados dos resíduos líquidos das hidrodestilações no grupo controle e no grupo submetido ao pré-tratamento enzimático com uma carga de 7FPA/g sobre a casca triturada.....44

Figura 12 Percentagem dos compostos cumarínicos encontrados dos resíduos sólidos das hidrodestilações no grupo controle e no grupo submetido ao pré-tratamento enzimático.....45

Figura 13 Percentagem dos compostos cumarínicos encontrados dos resíduos sólidos das hidrodestilações no grupo controle e no grupo submetido ao pré-tratamento enzimático com carga de 7FPA/g.....46

Figura 14 Percentagem dos compostos cumarínicos encontrados dos resíduos sólidos das hidrodestilações no grupo controle e no grupo submetido ao pré-tratamento enzimático com uma carga de 7FPA/g sobre a casca triturada.....46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Classificação de compostos cumarínicos de acordo com Lozhkin & Sakanyan (2006).....10

Tabela 2 Percentagens dos compostos dos óleos essenciais obtidos por hidrodestilação após pré-tratamento enzimático.....33

Tabela 3 Percentagens dos compostos dos óleos essenciais obtidos por hidrodestilação após pré-tratamento enzimático com uma carga de 7 FPA/g de substrato.....35

Tabela 4 Percentagens dos compostos dos óleos essenciais obtidos pela hidrodestilação de casca triturada após pré-tratamento enzimático com uma carga de 7 FPA/g de substrato.....38

LISTA DE ABREVIATURAS

FPA	Atividade em Papel Filtro
GC	Cromatografia Gasosa
GC/MS	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
US$(FOB)	Dólar Free On Board
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Performance
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
CCD	Cromatografia de Camada Delgada
MAD	Microwave Accelerated Distillation
DIC	Instantaneous Controlled Pressure Drop
UV	Ultravioleta
DNS	Ácido di-nitro salicílico

RESUMO

O óleo essencial de *Citrus latifolia* Tanaka (limão Tahiti) possui grande valor comercial e aplicações em diversos tipos de indústrias. A extração enzimática de óleos vegetais fixos aumenta o rendimento, consome pouca energia e causa um mínimo impacto ambiental, porém poucos estudos avaliaram o seu emprego para a extração de óleos essenciais de plantas aromáticas. Em vista disso, este trabalho teve como objetivo contribuir para o desenvolvimento de uma tecnologia enzimática para a extração do óleo essencial de cascas de *C. latifolia* Tanaka, além de avaliar a percentagem de compostos bioativos, como cumarinas, nos resíduos dos processos de extração. Para tanto, foram realizados pré-tratamentos enzimáticos nas cascas, através de um complexo constituído principalmente por celulases, caracterizado em papel filtro (FPA), e posterior extração do óleo por hidrodestilação. Nos três primeiros experimentos foram avaliados o efeito da carga enzimática (5, 7 e 12 FPA/g de substrato), o efeito do tempo de pré-tratamento enzimático (1, 2 e 3 horas) e o efeito do pré-tratamento em cascas trituradas sobre o rendimento e a composição do óleo essencial obtido por 1 hora de hidrodestilação. Em outro experimento foi avaliada a possibilidade de redução no tempo de hidrodestilação através do pré-tratamento enzimático, utilizando-se cargas de 5, 7 e 12 FPA/g em cascas trituradas, calculando-se o rendimento em óleo durante a hidrodestilação em diferentes intervalos de tempo (10, 15, 20, 30, 40, 50 e 60 minutos). As cumarinas foram extraídas com hexano dos resíduos líquidos e sólidos das hidrodestilações

através de extração líquido-líquido e soxhlet, respectivamente. As análises dos compostos dos óleos essenciais e das cumarinas foram feitas por cromatografia gasosa (GC) e cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC/MS).

Nos três primeiros experimentos descritos não foram verificadas diferenças estatísticas entre os rendimentos em óleo das amostras pré-tratadas enzimaticamente e os controles, demonstrando que o pré-tratamento enzimático não alterou o rendimento em óleo obtido por 1 hora de hidrodestilação. Porém, a análise dos componentes dos óleos permitiu observar um aumento nas proporções de alguns compostos oxigenados ($p<0,05$), responsáveis pela qualidade do aroma. No experimento onde foi avaliada a diminuição do tempo de hidrodestilação, verificou-se que o pré-tratamento com carga de 5 FPA/g atingiu o rendimento máximo em torno de 30 minutos do processo de destilação, enquanto que no controle o rendimento máximo foi em torno de 50 minutos. Utilizando-se a carga de 7 FPA/g, o rendimento máximo foi atingido em torno de 20 minutos, o mesmo ocorrendo com a carga de 12 FPA/g, enquanto que no controle foi em torno de 40 e 50 minutos, respectivamente. Estes resultados indicam que o pré-tratamento enzimático reduz o tempo de hidrodestilação apresentando vantagens do ponto de vista de custo energético e de integridade dos componentes do óleo, visto a redução do tempo de exposição do material vegetal à temperatura de ebulição da água, preconizando as bases para um processo tecnológico que envolve pré-tratamento enzimático associado à hidrodestilação para ser empregado na obtenção de óleo essencial de *C. latifolia* Tanaka.

Em relação às cumarinas, os resultados obtidos indicaram que a percentagem da maioria desses compostos não foi alterada quando as amostras sofreram pré-tratamento enzimático. Entretanto, propõe-se que os resíduos gerados pela hidrodestilação podem ser aproveitados e utilizados como fonte de cumarinas.

ABSTRACT

Citrus latifolia Tanaka (Tahiti lime) essential oil has a high commercial value and a large application in different industries. The enzymatic extraction of vegetable oils increases yields extraction, energy efficient and cause minimal environmental impact, but few studies have evaluated its use for the extraction of essential oils from aromatic plants. As a result, this study aimed to contribute to the development of enzymatic technology for extraction of essential oil from peels of *C. latifolia* Tanaka, and assess the proportion of bioactive compounds such as coumarins, in wastes extraction processes. To do so, it was performed enzymatic pretreatment of the peels, through a complex composed primarily of cellulases, characterized in filter paper (FPA), and subsequent extraction of oil by hydrodistillation. In the first three experiments were evaluated the effect of enzyme loading (5, 7 and 12 FPA/g substrate), the effect of time of enzymatic pretreatment (1, 2 and 3 hours) and the effect of pretreatment on crushed peels, on yield and composition of essential oil obtained by 1 hour hydrodistillation. In another test, it was evaluated the possibility of reducing the time hydrodistillation by enzymatic pretreatment, using loads of 5, 7 and 12 FPA/g of crushed peels, calculating the oil yield during the hydrodistillation at different intervals time (10, 15, 20, 30, 40, 50 and 60 minutes). The coumarins were extracted from the liquid and solid wastes from hydrodistillations with hexane through liquid-liquid extraction and soxhlet, respectively. The analysis of the compounds of essential oils and coumarins were made by gas chromatography (GC) and gas chromatography-mass spectrometry (GC / MS).

In the first three experiments described not statistical differences were found between the oil yields of enzymatically pretreated samples and controls, demonstrating that the enzymatic pretreatment did not affect the oil yield obtained by 1 hour hydrodistillation. However, the analysis of the oil components allowed to observe an increase in the proportions of some oxygenated compounds ($p < 0,05$), responsible for the quality of aroma. In the experiment where was evaluated the short-time hydrodistillation, it was found that pretreatment with a load of 5 FPA/g reached the maximum yield of about 30 minutes from the distillation process, while in the control the maximum yield was about 50 minutes. Using the load of 7 FPA/g, the maximum yield was reached in about 20 minutes, the same happened with the load of 12 FPA/g, while in the control was around 40 and 50 minutes, respectively. These results indicate that enzymatic pretreatment reduces the time hydrodistillation with advantages in terms of cost efficiency and integrity of the oil components, since the reduction in exposure time of the plant material at a temperature of boiling water, pointing out the foundation for a technological process that involves enzyme pretreatment associated with hydrodistillation to be employed in obtaining essential oil of *C. latifolia* Tanaka.

For the coumarins, the results indicated that the percentage of most of these compounds was not altered when the samples were enzymatically pretreated. However, it is proposed that the waste generated by hydrodistillation can be recovered and used as a source of coumarins.

1. INTRODUÇÃO

Os óleos essenciais mais amplamente utilizados no mundo são os cítricos. Estes óleos podem ter um grande valor comercial, como é o caso do óleo de *Citrus latifolia* Tanaka (limão Tahiti). Possuem várias aplicações nas indústrias alimentícia, farmacêutica e cosmética e uma fragrância altamente estimada em composições para aromas e sabores.

De acordo com o Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior, as exportações brasileiras de óleo essencial de limão alcançaram 264.564 kg em 2009, correspondendo a um valor de US$(FOB)6.447.740,00. Este óleo pode ser obtido por diferentes métodos baseados em prensagem, arraste a vapor, hidrodestilação, extração por dióxido de carbono (CO_2) supercrítico, extração por solventes orgânicos, entre outros, sendo que nas indústrias de sucos cítricos ele é obtido como subproduto do processamento dos frutos através da prensagem a frio, o que gera resíduos de cascas, sementes e líquidos.

Nas cascas do *C. latifolia* Tanaka encontra-se um óleo volátil localizado em glândulas presentes no flavedo, constituído por terpenos, álcoois, ésteres, aldeídos, entre outros, enquanto que na fração não-volátil encontram-se cumarinas, dentre outros compostos bioativos. As cumarinas formam uma importante família de metabólitos secundários, representada por diversos compostos com atividade biológica presentes em várias espécies vegetais e com ampla aplicação, especialmente na indústria farmacêutica. Trabalhos

demonstram sua presença nos resíduos de processos de extração de óleo essencial, como a hidrodestilação, os quais são, muitas vezes, desprezados.

Enquanto se utilizam os métodos descritos anteriormente para extração de óleos essenciais, enzimas hidrolíticas vêm sendo aplicadas com sucesso para a liberação de compostos e óleos vegetais fixos para fins alimentares como etapa anterior aos processos convencionais de extração, com aumento de rendimento e diminuição de energia e do uso de solventes. Porém, existem poucos dados sobre sua utilização para a extração de óleos voláteis de plantas aromáticas.

O uso de enzimas como um pré-tratamento de obtenção de óleos vem adquirindo grande interesse pela indústria biotecnológica, e está sendo preconizado como um processo que consome pouca energia e causa um mínimo de impacto ambiental. Neste contexto, o presente trabalho objetivou contribuir para o desenvolvimento de uma tecnologia enzimática que possa ser aplicada para a extração de óleo essencial das cascas de *C. latifolia* Tanaka, além de avaliar a percentagem de cumarinas nos resíduos gerados pela hidrodestilação.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A produção de cítricos e seus subprodutos

As frutas cítricas estão entre as mais cultivadas no mundo, sendo que o Brasil responde por um terço da produção mundial de laranja e quase 50% do suco fabricado (Bizzo *et al.*, 2009). O Rio Grande do Sul é um dos estados brasileiros que se destacam na produção de limas ácidas e limões, sendo que a área plantada é de, aproximadamente, 700 hectares, com uma produção anual de 11,2 mil toneladas e a produtividade de 16 t ha^{-1}. A principal região produtora é a do Vale do Caí, sendo que os municípios São Sebastião do Caí, Pareci Novo, Bom Princípio, Harmonia, Montenegro e Portão correspondem a cerca de 80% da área plantada no estado, de acordo com dados da Emater (2004).

Entre as frutas cítricas, o limão Tahiti, planta tropical possivelmente originária do Taiti, tem apresentado uma significativa ampliação em seu mercado nos últimos anos. Em um estudo feito em 2004, as exportações brasileiras, incluindo a fruta fresca, suco e óleo essencial foram de 37 mil toneladas, representando uma receita de US$ 25 milhões. A Europa, com destaque para Alemanha e Reino Unido, foi o principal destino, seguida pelo Canadá, Países Árabes e China (Rigon *et al.*, 2005; Wrege *et al.*, 2006).

Aproximadamente dois terços da quantidade total de óleos voláteis produzidos no mundo são obtidos de pequenas plantas perenes, sendo que o gênero *Citrus* responde pela

metade desse volume, e o terço restante da produção mundial provém de plantas herbáceas cultivadas. O Brasil aparece entre os principais países produtores dos óleos essenciais de laranja, limão, lima e outros cítricos e se encontra entre os grandes exportadores internacionais (Verlet, 1993; Bizzo *et al.*, 2009).

No período de janeiro de 2005 a outubro de 2008, a exportação de óleos essenciais cítricos realizada pelo Brasil foi de 287.759 t, sendo o óleo de laranja responsável por 86% desse montante, com um valor aproximado de US$ 2/kg, seguido pelo óleo de limão, que correspondeu a 8% (Bizzo *et al.*, 2009).

Os óleos essenciais cítricos são os mais utilizados no mundo inteiro e encontram crescente uso nas indústrias de aromas devido à sua fragrância ser altamente apreciada como adjuvante em inúmeras composições para aromas e sabores. Estes geralmente são subprodutos das indústrias de sucos, obtidos a partir da prensagem das cascas ou frutas, em um processo que ocorre paralelamente à obtenção do suco. Além da perfumaria, também são utilizados na área farmacêutica em geral, em materiais de limpeza e na indústria de alimentos, como em balas e bebidas (Stuart *et al.*, 2000; Silva-Santos *et al.*, 2006; Bousbia *et al.*, 2009).

O óleo essencial de limão Tahiti possui uma grande variedade de compostos de interesse para as indústrias químicas, farmacêuticas e de alimentos. Consequentemente é um óleo de maior valor comercial quando comparado, por exemplo, ao óleo de laranja. O valor elevado do óleo essencial de limão Tahiti justifica investimentos na utilização de tecnologias que possam aumentar os rendimentos de extração sem a perda de qualidade do óleo (Grings, 2004).

As indústrias de sucos cítricos, além de gerar subprodutos que são utilizados no comércio, também produzem grandes quantidades de resíduos como cascas e sementes. Atualmente, parte desses resíduos é utilizada para a produção de ração animal ou de fertilizantes, porém o custo de secagem e transporte é um fator economicamente limitante e a

porção descartada no meio ambiente representa um problema ambiental crescente (Reda *et al.*, 2005; Mendonça *et al.*, 2006).

Resíduos líquidos, que incluem os resíduos da própria extração do suco, da lavagem da casca durante a prensagem e das centrifugações realizadas para separar o óleo essencial, também são gerados e acabam sendo descartados. Esses líquidos e sólidos residuais têm sido estudados e podem ser fontes de substâncias bioativas, como pectina, limoneno, flavonóides, cumarinas, entre outros (Parish *et al.*, 1986; Coll *et al.*, 1998).

Os óleos essenciais extraídos por hidrodestilação (método de extração mais utilizado em escala laboratorial) também geram resíduos líquidos e sólidos que muitas vezes são descartados e que podem ser fontes de compostos de interesse. Já foram identificados, na casca residual de cítricos e outras plantas e na água utilizada para o processo de hidrodestilação, compostos bioativos como flavonóides e cumarinas que podem ser isolados para estudos, possuindo utilização como padrões em laboratórios de pesquisa e aplicações por indústrias farmacêuticas (Benincasa *et al.*, 1990; Miyake *et al.*, 1999; Sguissardi *et al.*, 2006).

2.2 Óleos essenciais cítricos

Os constituintes químicos encontrados nos vegetais são sintetizados e degradados por inúmeras reações anabólicas e catabólicas que compõem o metabolismo das plantas. Para se defender de agressões externas, as plantas desenvolveram mecanismos químicos e produzem substâncias conhecidas como metabólitos secundários. Embora não essenciais para o crescimento da planta, esses metabólitos atraem o interesse de farmacologistas na busca de novos compostos bioativos (McRae *et al.*, 2007).

Como pode ser observado na Figura 1, a origem dos metabólitos secundários pode ser resumida a partir do metabolismo da glicose, via dois intermediários principais, o ácido

chiquímico e o acetato. O primeiro origina os aminoácidos aromáticos precursores da maioria dos metabólitos secundários aromáticos (Santos, 2001).

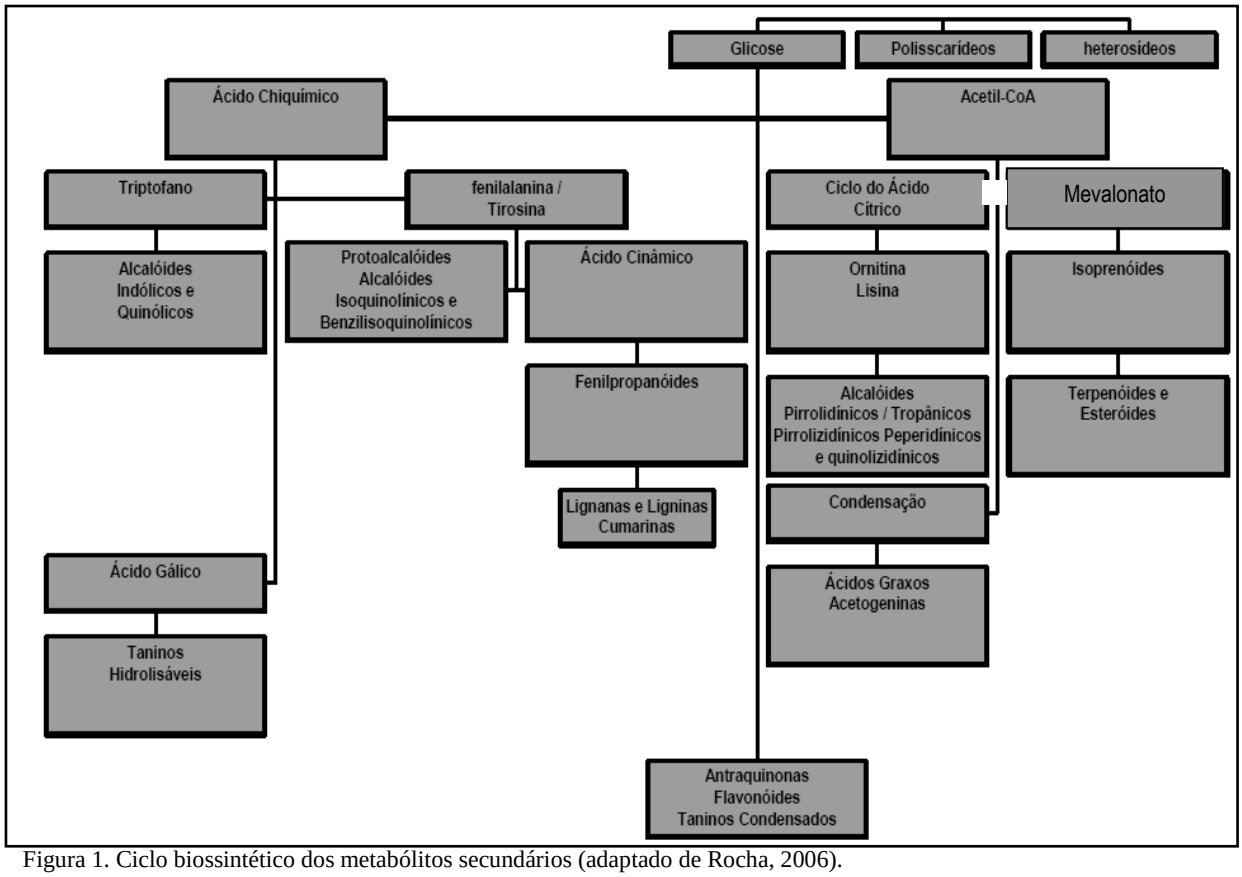


Figura 1. Ciclo biossintético dos metabólitos secundários (adaptado de Rocha, 2006).

Os óleos essenciais são misturas complexas de compostos que se originam do metabolismo secundário e são próprios de várias espécies vegetais. Quimicamente, a grande maioria dos óleos essenciais é constituída de derivados de terpenóides ou de fenilpropanóides (Bruneton, 1991; Simões & Spitzer, 2001).

Na composição química de óleos essenciais encontram-se hidrocarbonetos terpênicos, álcoois simples e terpênicos, aldeídos, cetonas, fenóis, éteres, óxidos, peróxidos, ácidos orgânicos, lactonas, compostos com enxofre e cumarinas, que apresentam-se em diferentes concentrações de acordo com a origem vegetal (Simões & Spitzer, 2001).

Genericamente, a constituição química dos óleos essenciais de frutas cítricas pode ser dividida em hidrocarbonetos terpênicos e terpenos oxigenados. Compostos cumarínicos

geralmente se encontram na fração não-volátil do material vegetal, embora algumas cumarinas possam apresentar certa volatilidade e aparecer junto à composição do óleo. O hidrocarboneto terpênico d-limoneno é o constituinte principal, sendo que as diferenças na composição entre as espécies de cítricos são mais quantitativas do que qualitativas. Embora o limoneno seja o composto majoritário, são os terpenos oxigenados que contribuem com maior intensidade para o aroma dos óleos e, geralmente, aparecem em menores quantidades, como linalol, nerol, neral, acetato de linalina, entre outros (Yabiku & Lara, 1986; Huet, 1991; Grings, 2004).

Os óleos essenciais, de uma forma geral, apresentam um conjunto de propriedades, entre as quais destacam-se a elevada volatilidade, a insolubilidade em água e a solubilidade em solventes orgânicos, o que permite caracterizá-los e promover a sua separação. Apresentam-se geralmente como líquidos oleosos e com um aroma intenso (Costa, 1994).

Constituem-se ainda em importantes matérias-primas para as indústrias farmacêutica, alimentícia, perfumaria, cosmética, orgânica fina, biotecnologia e para a prática de aromaterapia. Seus derivados também podem ser utilizados na fabricação de sorvetes, gelatinas, gomas de mascar, sabões, detergentes, pesticidas, fungicidas, entre outros (Bhat, 1995; Price & Price, 2006). Óleos de limão, bergamota, mandarina, tangerina e laranja estão entre as composições cítricas mais vendidas no mundo para a perfumaria (Moraes, 2007).

A síntese e o acúmulo de óleos essenciais geralmente estão associados à presença de estruturas histológicas especializadas. No caso do limão e outros cítricos, o óleo está presente em glândulas localizadas no flavedo, região que constitui o epicarpo dos frutos cítricos onde também estão presentes os carotenóides que diferenciam as cores das cascas da cada espécie (Bruneton, 1991; Filho *et al.*, 2005; Bousbia *et al.*, 2009).

2.3 Aspectos gerais da espécie *Citrus latifolia* Tanaka

Os frutos cítricos pertencem à família *Rutaceae* e a maioria das espécies provém da Ásia, em regiões compreendidas entre a Índia e o sudeste do Himalaia (Trucom, 2009). O no- "limão" é comumente utilizado para indicar frutas cítricas ácidas que inclui os limões verdadeiros (*Citrus limon)* e as limas ácidas, com destaque para as cultivares Galego (*Citrus aurantifolia* Swingle) e Tahiti (*Citrus latifolia* Tanaka), esta última conhecida como "limão Tahiti" (Wrege *et al.,* 2006).

O limão Tahiti é um híbrido da lima-da-pérsia com o limão-cravo (conhecido também como limão-bergamota ou limão-rosa), motivo pelo qual recebe também o nome de lima ácida. O fruto é robusto, arredondado ou oval, com a casca lisa ou ligeiramente rugosa, de coloração verde e polpa esbranquiçada, suculenta e de qualidade menos ácida. As sementes são ausentes nesta variedade, que é propagada por enxertia, tendo como porta-enxerto o limão-cravo. Mais adaptado ao clima tropical, precisa de sol e umidade para gerar frutos robustos, dispensando frequentemente o uso de agrotóxicos (Trucom, 2009).

Esta cultivar é a de maior valor comercial no Brasil, tendo excelente potencial de exportação. O seu valor de mercado, principalmente na Europa, está relacionado à ausência de sementes, cor e aroma exóticos. Apresenta capacidade de produção durante todo o ano, pois embora seja mais produtivo de dezembro a maio, podem haver outras temporadas em função das condições de temperatura e da disponibilidade de água (Trucom, 2009; Wrege *et al.*, 2006). Devido a essas características e outras já descritas, e por haver menos estudos com esta espécie, o limão Tahiti foi escolhido para a realização deste trabalho.

2.4 Estrutura e farmacologia das cumarinas

Assim como os óleos essenciais, as cumarinas também fazem parte do metabolismo secundário de várias plantas. Elas correspondem a um grupo muito amplo de substâncias com diversas atividades farmacológicas, presentes em várias espécies vegetais, incluindo a família *Rutaceae*, da qual fazem parte os frutos cítricos.

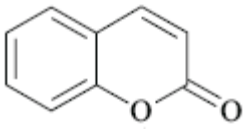
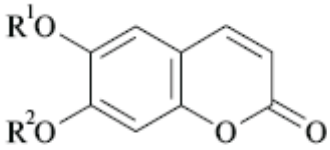
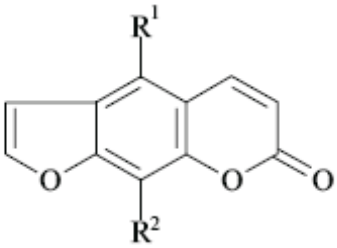
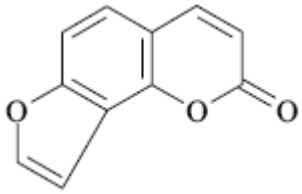
As cumarinas constituem uma classe de compostos representada por derivados de 2H-1-benzopiran-2-ona (cumarina), sendo este o representante mais simples. Estruturalmente estes compostos são lactonas do ácido *o*-hidróxi-cinâmico que consistem na junção dos anéis benzeno e pirona (Egan *et al.*, 1990; Ojala, 2001). São frequentemente encontrados em plantas das famílias Rutaceae, Apiaceae, Fabaceae, Hyppocastanaceae, Asteraceae, Oleaceae, Moraceae e Thymeleaceae (Simões *et al.*, 2001; Lozhkin & Sakanyan, 2006).

As cumarinas podem ser encontradas em combinação com glicosídeos (Ojala, 2001) e podem ser divididas em vários grupos de acordo com Lozhkin & Sakanyan (2006) (Tabela 1).

São encontrados ainda os grupos piranocumarinas e benzocumarinas, os quais possuem um anel pirano ou anéis benzênicos, respectivamente, junto ao núcleo principal; e estruturas mais complexas que envolvem o sistema cumarínico responsáveis por diferentes atividades biológicas, como antibiótica e estrogênica, sendo que algumas podem ser tóxicas. Exemplos de estruturas mais complexas são os cumestanos, novobiocina, aflatoxinas, entre outros. (Lozhkin & Sakanyan, 2006).

Outro substituinte frequentemente encontrado nas cumarinas simples (cumarinas hidroxiladas, metoxiladas ou alquiladas e seus glicosídeos) é o grupo isoprenila (com 5 ou 10 carbonos). A cadeia isoprenílica, por ser muito reativa, pode ser epoxidada, monohidroxilada, dihidroxilada, etc., aumentando muito o número de estruturas descritas para as cumarinas. A cadeia isoprenílica também pode ser encontrada em cumarinas mais complexas como as poli-

Tabela 1. Classificação de compostos cumarínicos de acordo com Lozhkin & Sakanyan (2006).

Cumarina (sem substituições):	
 Cumarina	
Cumarinas simples substituídas:	
Radicais hidroxila ou metoxila no anel benzeno	 Ex.: umbeliferona: R^1 = H, R^2 = OH; esculetina: R^1 = R^2 = OH; escopoletina: R^1 = OCH_3, R^2 = OH.
Radicais hidroxila ou metoxila no anel pirona	Ex.: galfordina
Hidróxi- ou metóxi-cumarinas alquiladas	
Furanocumarinas (anel furano junto ao núcleo cumarínico):	
Psoraleno e derivados (anel furano na forma linear)	 Ex.: psoraleno: R^1 = H, R^2 = H; xantotoxina: R^1 = H, R^2 = OCH_3 ; bergapteno: R^1 = OCH_3, R^2 = H; isopimpinelina: R^1 = OCH_3, R^2 = OCH_3; imperatorina: R^1 = H, R^2 = $OCH_2CHC(CH_3)_2$.
Angelicina e derivados (anel furano na forma angular)	 Angelicina

cíclicas (Bruneton *et al.*, 1991).

As cumarinas possuem várias atividades biológicas que dependem de suas estruturas. Algumas propriedades farmacológicas de derivados cumarínicos incluem: ação anticoagulante, vasodilatadora, sedativa, analgésica, antihelmíntica, antipirética e anti-

inflamatória (O'kennedy & Thornes, 1997). Furanocumarinas possuem atividades fotossensibilizantes e espasmolíticas e, assim como algumas cumarinas simples, podem apresentar efeitos bacteriostático e antimicótico. O cumestrol e compostos relacionados possuem propriedades estrogênicas. Alguns derivados cumarínicos naturais e sintéticos exibem atividade anti-HIV (Lozhkin & Sakanyan, 2006).

Compostos cumarínicos têm sido isolados de muitas espécies pertencentes à família *Rutaceae*. Nas plantas cítricas, a maioria desses compostos são derivados das estruturas básicas cumarina e psoraleno. A literatura mostra a presença de vários desses compostos, tanto nos frutos cítricos em geral, quanto nos diversos tipos de limões. Exemplos de derivados da cumarina encontrados no limão são as cumarinas simples substituídas, como limettin (5,7-dimetoxicumarina), 5-geranoxi-7-metoxicumarina e herniarin (7-metoxicumarina). Entre os derivados do psoraleno encontrados no limão estão o bergapteno (5-metoxipsoraleno) e isopimpinellin (5,8-dimetoxipsoraleno) (Stanley & Jurd, 1971; Chouchi & Barth, 1994; Dugo *et al.*, 1997; Miyake *et al*., 1999; Dugo *et al.*, 2000).

Myake *et al.*(1999) isolaram três cumarinas presentes na casca do limão capazes de inibir um promotor tumoral induzido pelo vírus Epstein-Barr. Elas foram identificadas como 8-geraniloxipsoraleno, 5-geraniloxipsoraleno (bergamottin) e 5-geraniloxi-7-metoxicumarina. No trabalho de Ziegler & Spiteller (1992) foram identificadas 29 estruturas diferentes na fração cumarínica do óleo essencial de *Citrus limon* (limão siciliano) obtido por prensagem a frio, através de cromatografia líquida de alta performance (HPLC), cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC/MS) e ressonância magnética nuclear (RMN), sendo que dessas, onze não eram ainda conhecidas como constituintes da casca do limão.

As cumarinas simples também são largamente utilizadas na indústria cosmética devido a sua forte fragrância. São usadas para adocicar e fixar perfumes e também como aromatizantes na indústria alimentícia (Ojala, 2001). Quanto às propriedades farmacológicas

da cumarina (1,2-benzopirona), foram demonstradas atividades antitumorais em câncer renal e melanoma, embora estudos também relatem hepatotoxicidade em ratos e ação carcinogênica em doses altas e crônicas (Lozhkin & Sakanyan, 2006). De acordo com um estudo toxicológico, a hepatotoxicidade da cumarina é atribuída à formação de um metabólito intermediário epoxidado (3,4-epóxido cumarina) nos ratos. Embora seja hepatotóxica em ratos, em outras espécies, como camundongos e hamsters, a cumarina não tem esse efeito. Além disso, em humanos a cumarina é hidroxilada no carbono 7, formando a 7-hidroxicumarina, um metabólito considerado não-tóxico, demonstrando que a hepatotoxicidade depende da via metabólica, da atividade dos intermediários formados e da concentração do composto no organismo (Vassallo *et al.*, 2004).

As furanocumarinas lineares, conhecidas como psoralenos, têm sido usadas interna e externamente para promover a pigmentação da pele, além do tratamento fotoquimioterápico da psoríase. O 8-metoxipsoraleno é usado na medicina para facilitar a repigmentação da pele em pacientes com vitiligo (Monteiro *et al.*, 2002). Apesar disso, seu uso terapêutico parece estar relacionado à incidência crescente de câncer de pele, o que lhes confere toxicidade. Por isso, sua utilização necessita de uma avaliação risco-benefício rigorosa (Simões *et al.*, 2001).

Um trabalho sobre as atividades citotóxicas e antiplaquetárias da arruda (*Ruta graveolens)* demonstrou o efeito citotóxico da cumarina isopimpinellin contra células humanas de carcinomas epidermóide oral, pulmonar, adenocarcinoma e hepatoma. As furanocumarinas psoraleno, chalepensina e clausindina apresentaram atividade inibitória da agregação plaquetária (Wu *et al.*, 2003).

Outras aplicações ainda dos compostos cumarínicos incluem o uso em produtos de limpeza e indicadores fluorescentes (Egan *et al.*, 1990; Simões *et al.*, 2001).

2.5 Métodos de extração e identificação de óleos essenciais e cumarinas

2.5.1 Extração e identificação de compostos presentes nos óleos essenciais

Os principais métodos utilizados para a obtenção do óleo essencial das plantas são a destilação com água (hidrodestilação), o arraste a vapor, a extração com solventes orgânicos, a extração por CO_2 supercrítico e a prensagem a frio (Santos, 2001; Yamanaka, 2005).

O processo de hidrodestilação utiliza o princípio de evaporar uma mistura de vapor de água e componentes voláteis presentes no material vegetal, por meio do aparelho de Clevenger (Figura 2) (Lorenzo *et al.*, 2000). É o método mais comum para a extração de óleos essenciais em bancada, porém, embora não se utilize solventes orgânicos, existe o risco de hidrólise de alguns componentes devido à alta temperatura utilizada (Costa, 1994).

Outros métodos que usam o vapor de água, como o arraste a vapor, são mais utilizados pelas indústrias de óleos essenciais em geral, devido a sua simplicidade e economia. Em relação à composição química da essência, são obtidos compostos mais voláteis em curtos tempos de extração; por outro lado, extrações mais prolongadas podem apresentar compostos não-apreciáveis (Serafini *et al.*, 2002).

Já foi experimentalmente provado que o CO_2 supercrítico pode oferecer uma alternativa eficiente aos solventes orgânicos convencionais para a extração de substâncias bioativas de plantas, porém apresenta um custo inicial de instalação superior a outros métodos (Kerrola & Kallio, 1994; Choi *et al.*, 1998).

Para as frutas cítricas, a prensagem a frio das cascas e dos frutos é o método mais utilizado pelas indústrias produtoras de sucos cítricos e a obtenção do óleo essencial ocorre de

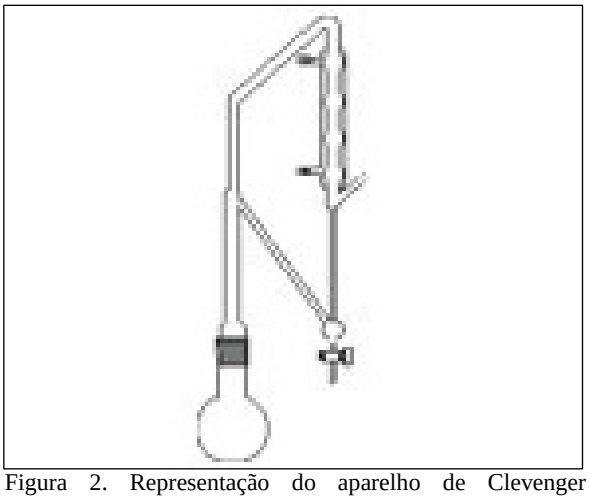


Figura 2. Representação do aparelho de Clevenger conectado a um balão, sendo que este, no processo de hidrodestilação, é acoplado a uma manta de aquecimento (adaptado de Silva *et al.*, 2005).

forma paralela ao suco. O fruto é prensado em um extrator e as bolsas de óleo da casca se rompem. Anéis em volta dos copos da extratora jogam jatos de água que removem o óleo que está na casca. Forma-se uma emulsão água-óleo, onde o óleo é removido através de processos de centrifugação (Yamanaka, 2005).

O controle de qualidade dos óleos essenciais extraídos pelos diferentes métodos apresentados pode ser feito por técnicas cromatográficas utilizadas para identificação e separação dos componentes. Dentre elas, a cromatografia em camada delgada (CCD), a cromatografia gasosa (GC) e a GC/MS são os procedimentos mais utilizados (Costa, 1994). A GC/MS permite a separação dos compostos e fornece um espectro de massas para cada pico, indicando a massa molecular que informa a classe da substância e o padrão de fragmentação, que pode ser comparado com espectros de massas contidos em bibliotecas computadorizadas para identificação (Simões *et al.*, 2001).

Visto o grande potencial de emprego de óleos essenciais cítricos, Ferhat *et al.* (2006) propuseram um aperfeiçoamento no processo de hidrodestilação para obtenção de óleo essencial de *Citrus sinensis* L. *Osbeck* (laranja), utilizando micro-ondas para a geração de

calor, visando a diminuição dos custos energéticos. A metodologia foi denominada "Microwave Accelerated Distillation" (MAD). Segundo os autores, enquanto a hidrodestilação requer um tempo de 30 minutos para o aquecimento de 2 litros de água e 200g de casca de laranja, seguido pelo processo de destilação por mais 150 minutos, o método MAD requer apenas 3 minutos para o aquecimento da água e mais 27 minutos para a destilação do óleo essencial. A energia requerida para o processo MAD foi de 0,25 kWh e da hidrodestilação com o aparelho Clevenger convencional foi de 4,33 kWh. Adicionalmente, o processo MAD mostrou maior rendimento e maiores teores de compostos oxigenados.

Recentemente, Rezzoug & Louka (2009) propuseram um processo para liberação do óleo essencial de cascas de laranja denominado "Instantaneous Controlled Pressure Drop" (DIC), método já patenteado, baseado no aquecimento do material vegetal à alta pressão seguido de descompressão a vácuo, como tratamento anterior à técnica convencional de arraste a vapor. Segundo os autores, enquanto a energia requerida para o arraste a vapor (que levou um tempo de 90 a 100 minutos) foi de 0,13 kWh/g de óleo obtido, para o processo empregando DIC a energia requerida foi de 0,014 kWh/g de óleo obtido, visto que o tempo de evaporação foi reduzido para 4 minutos.

Também têm sido estudados outros métodos de extração que visam a redução no uso de solventes e energia, como extração por ultrassom e extração enzimática voltada para a área de alimentos, a qual será detalhada logo adiante (Kimbaris *et al.*, 2006; Bousbia *et al.*, 2009).

2.5.2 Extração e identificação de cumarinas

Compostos cumarínicos são usualmente extraídos com solventes orgânicos como etanol, metanol, benzeno, clorofórmio, éter dietílico ou de petróleo, ou suas combinações (Lozhkin & Sakanyan, 2006). Embora as formas heterosídicas sejam mais ou menos solúveis

em água (Bruneton, 1991), cumarinas glicosiladas e mesmo as formas livres podem ser extraídas também com este solvente (Bourgaud *et al.*, 1993).

Para a purificação de compostos cumarínicos podem ser utilizadas as propriedades químicas das lactonas: abertura da lactona e solubilização em meio alcalino, seguida de ciclização em meio ácido. Este método pode levar a mudanças na estrutura inicial da cumarina (Lozhkin & Sakanyan, 2006).

Muitos métodos já foram descritos para a identificação de cumarinas, incluindo CCD, ultravioleta (UV), HPLC, GC/MS, entre outros (Wang *et al.*, 2007).

As cumarinas apresentam um espectro UV característico, dependente da natureza e da posição dos substituintes, que se modifica profundamente em meio alcalino. Na luz ultravioleta, as cumarinas apresentam fluorescência variável de azul a amarelo e a vermelho, exaltada em presença de amoníaco. O reconhecimento destes compostos se realiza facilmente por CCD revelada em UV (Wagner & Bladt, 1996).

2.5.3 Tecnologia de extração enzimática

A utilização de enzimas no processamento de alimentos tem sido bastante preconizada, com o objetivo de aumentar o rendimento dos produtos e eliminar condições prejudiciais. O uso de enzimas na extração de óleo de sementes ou frutos tem sido revisado recentemente (Hanmaoungiai *et al.*, 2001; Moreau *et al.*, 2004; Santos & Ferrari, 2005; Zhang *et al.*, 2007). Esse processo envolve o tratamento do material contendo o óleo com enzimas que degradam a parede celular, com o objetivo de extrair o óleo e outros componentes. A técnica possibilita melhores condições de processamento, pois a temperatura de extração é relativamente baixa, requer pouco investimento financeiro e de

energia e não há utilização de solventes orgânicos (Rosenthal *et al.,* 1996; Hanmaoungiai *et al.,* 2001).

Métodos de extração aquosa enzimática foram desenvolvidos para substituir a extração de óleos vegetais com hexano, sendo que as extrações obtidas com o uso de enzimas produziram maiores rendimentos em óleo em comparação com outros métodos (Rosenthal *et al.,* 1996; Hanmaoungiai *et al.,* 2001). Uma pesquisa com grão de milho, onde avaliou-se a utilização de várias enzimas comerciais para extração aquosa enzimática do óleo, apresentou rendimentos em óleo de até 80% utilizando-se três diferentes celulases comerciais, enquanto que os rendimentos quando não se utilizaram enzimas foi de cerca de 27% (Moreau *et al.,* 2004).

A tecnologia enzimática tem sido desenvolvida para a extração de óleos fixos de vários vegetais e frutos utilizados na indútria alimentícia (Rosenthal *et al.,* 1996; Hanmaoungiai *et al.,* 2001; Moreau *et al.,* 2004; Santos & Ferrari, 2005; Zhang *et al.,* 2007), no entanto, poucos estudos se têm feito na área de plantas aromáticas para a extração de óleos essenciais que podem possuir diversas aplicações. Dentre os poucos trabalhos realizados com óleos essenciais, encontra-se o estudo sobre extração enzimática para a obtenção do óleo da casca de mandarina (*Citrus reticulata*), realizado por Mishra *et al.* (2005), o qual apresentou médias de rendimento em óleo maiores nas amostras pré-tratadas com enzimas. As amostras que não foram tratadas com enzimas produziram um rendimento em óleo de 4,53 a 4,93%, enquanto que as que passaram pelo tratamento enzimático alcançaram uma média de rendimento de até 5,66%. Nesta pesquisa foram utilizadas três concentrações diferentes de xilanases (tipo mais comum de hemicelulase) para o pré-tratamento enzimático e, em seguida, realizou-se a extração do óleo através de hidrodestilação. Os resultados foram comparados com a amostra controle, da qual foi extraído o óleo através de hidrodestilação sem tratamento com enzimas.

As enzimas atuam principalmente na parede celular vegetal que é composta por celulose, hemicelulose, lignina, proteínas e substâncias pécticas, sendo que a celulose é o principal componente estrutural, composta de um polissacarídeo formado por unidades de D-glicose (D-glicopiranose) unidas por ligações glicosídicas do tipo β-(1→4) (Martins, 2005).

O complexo celulásico produzido por fungos filamentosos é formado por três componentes enzimáticos majoritários: as endoglucanases, as exoglucanases (celobiohidrolases) e as β-glicosidases. Com o sinergismo destes componentes, a celulose é degradada da seguinte maneira: as celobiohidrolases agem como exoenzimas (na extremidade das cadeias), liberando celobiose (dissacarídeo); as endoglucanases agem randomicamente ao longo da cadeia produzindo novos sítios de ataque para as exoglucanases; e as β-glicosidases completam o processo através da hidrólise da celobiose e outros oligossacarídeos à glicose (Figura 3) (Medve *et al.*, 1998).

Para a utilização de complexos enzimáticos, é necessário realizar a caracterização da atividade das enzimas com a seleção de substratos específicos. Em muitos estudos, substratos modelos são utilizados para facilitar a diferenciação entre atividades enzimáticas, como endo, ou exoglucanásicas, ou β-glicosidásica (Martins, 2005).

O papel filtro é um substrato tradicionalmente utilizado em pesquisas de celulases. As fibras de celulose que constituem o papel têm uma estrutura complexa e, para a sua hidrólise substancial, é necessário um sistema celulásico completo (celobiohidrolases e endoglucanases). O papel filtro é recomendado pela Comissão de Biotecnologia da IUPAC para a avaliação da atividade celulásica total de um sistema celulásico (Medve *et al.*, 1998; Ghose, 1987).

Entre os microorganismos que secretam enzimas hidrolíticas, os fungos do gênero *Penicillium* têm apresentado propriedades interessantes em comparação a outras fontes des-

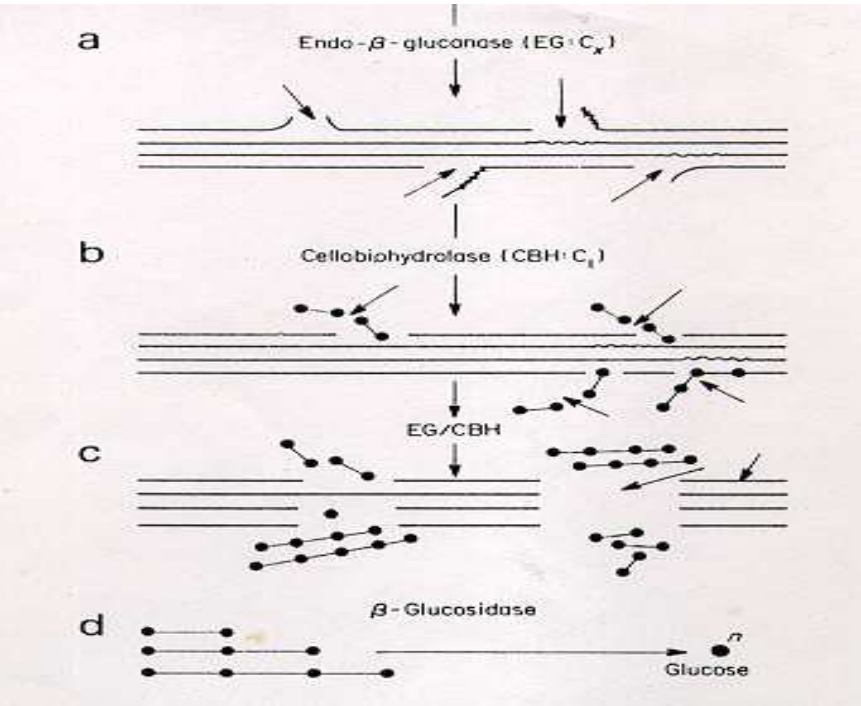


Figura 3. Demonstração da ação das enzimas sobre a molécula de celulose: (a) endoglucanases; (b) celobiohidrolases ou exoglucanases; (c) sinergismo das frações enzimáticas e (d) β-glicosidases (adaptado de Bisaria & Ghose, 1981).

sas enzimas, principalmente no que diz respeito à distribuição quantitativa dos componentes enzimáticos no complexo celulásico, a exemplo do *P. echinulatum* que é uma espécie que tem apresentado título enzimático elevado, em termos de atividade celulásica total (Camassola *et al.*, 2004).

Como foi observado no presente capítulo, os óleos essenciais cítricos apresentam grande interesse comercial, em vista das suas múltiplas aplicações. Entretanto, os processos de obtenção desses óleos ainda estão baseados simplesmente em prensagem ou arraste a vapor, com poucos estudos onde enzimas hidrolíticas possam ser empregadas para sua extração, ao contrário do que se observa nos processos de extração de óleos vegetais para fins alimentares, em que a tecnologia enzimática já vem sendo empregada com sucesso.

Embora o processo de extração de óleos cítricos mais empregado seja a prensagem, a aplicação de hidrolases, principalmente celulases, no epicarpo ou flavedo, região onde estão localizadas as glândulas acumuladoras do óleo essencial, poderia aumentar os rendimentos de extração pela ação das enzimas nas paredes celulares. Uma alternativa para verificar esta hipótese seria tratar cascas de cítricos e, posteriormente, verificar a liberação de óleo através de sua evaporação por meio da hidrodestilação.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Contribuir para o desenvolvimento de uma tecnologia enzimática para a extração de óleo essencial de casca de *Citrus latifolia* Tanaka e sugerir o aproveitamento dos resíduos dos processos de extração como fonte de cumarinas.

3.2 Objetivos específicos

- Verificar o efeito do pré-tratamento enzimático nos rendimentos de extração do óleo essencial da casca de *Citrus latifolia* Tanaka pela hidrodestilação, utilizando complexo enzimático hidrolítico com variação nas cargas enzimáticas, no tempo de pré-tratamento enzimático e no tempo de hidrodestilação;
- Analisar os compostos encontrados no óleo essencial da casca de *C. latifolia* Tanaka por meio de cromatografia gasosa e espectrometria de massas e avaliar suas proporções conforme o tratamento enzimático utilizado;
- Identificar os compostos cumarínicos encontrados nos resíduos das hidrodestilações por meio de cromatografia gasosa e espectrometria de massas.

- Verificar o efeito do pré-tratamento enzimático nas proporções dos compostos cumarínicos presentes nos resíduos das hidrodestilações.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material vegetal

Foram utilizadas cascas frescas de *Citrus latifolia* Tanaka (limão Tahiti) provenientes de São Sebastião do Caí, colhidos em diferentes épocas do ano. Para cada ensaio foram utilizadas novas amostras de limão, realizando-se, portanto, um novo controle em cada experimento.

4.2 Caldo enzimático

O caldo enzimático utilizado foi constituído por um complexo de enzimas, principalmente celulases, produzidas por *Penicillium echinulatum*, fornecido pelo laboratório de Enzimas e Biomassas do Instituto de Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul.

4.3 Determinação da atividade enzimática do caldo utilizado

A atividade enzimática do caldo utilizado nas extrações foi caracterizada em papel filtro (atividade em papel filtro ou FPA) para a determinação da atividade celulá-

sica total, conforme metodologia descrita por Ghose (1987).

Em um tubo de ensaio, foram adicionados 0,5mL da amostra enzimática ou de diluições apropriadas para obtenção de valores de açúcares redutores liberados do substrato em torno de 2 $mg.mL^{-1}$ e 1mL de tampão citrato 0,05 M pH 4,8. Os tubos foram colocados em banho-maria a 50^{o}C durante 10 minutos, com a finalidade de elevar a temperatura do meio contendo a enzima até a sua temperatura ideal de hidró Foram adicionados, a cada tubo, 50 mg de papel filtro *Whatman* n^{o} 1 em tiras de 1 cm x 6 cm, mantendo-os por 60 minutos em banho-maria a 50^{o}C. Em seguida, a reação foi interrompida com a adição de 3 mL da solução do reagente DNS (ácido di-nitro salicílico) e os tubos foram colocados em banho-maria a 100^{o}C por 5 minutos. Após resfriamento na temperatura ambiente, foram adicionados 8 mL de água destilada e a absorbância das preparações foi medida em espectrofotômetro a 545 nm. As cargas de FPA presentes nas amostras foram determinadas através de curva padrão construída com soluções de glicose em concentrações de 0; 0,05; 0,1; 0,25; 0,5; 1; 1,5 e 2 $mg.mL^{-1}$ por meio de regressão linear. Uma unidade foi definida como sendo a quantidade de enzima necessária para a liberação de 1 μmol de glicose por minuto por mL de reação.

4.4 Pré-tratamento enzimático das cascas de *Citrus latifolia* Tanaka

Para as extrações de óleo essencial, foram feitos pré-tratamentos enzimáticos utilizando-se diferentes cargas enzimáticas (FPA por grama de substrato), seguidos por hidrodestilação. As cargas enzimáticas utilizadas foram escolhidas de acordo com a aplicação de enzimas em processos de hidrólise total de celulose, onde a carga recomendada para esta finalidade é de 15FPA/g (Ryu *et al.*,1984). O pré-tratamento enzimático foi baseado no método descrito por Mishra *et al.* (2005), com alterações.

Pesou-se 100g de casca fresca (substrato) de uma amostra de limões, às quais se adicionou o volume de caldo enzimático correspondente a uma determinada carga de FPA/g de substrato (que variou conforme o ensaio realizado) em um balão de 2L. Completou-se o volume para 1L com tampão citrato de sódio 50mmol (pH 4,8). O balão vedado foi submetido a 50^{o}C em banho-maria, com agitação leve, por 1 hora. Após o término do tratamento, o balão foi resfriado com gelo para interromper a atividade enzimática. Todo esse volume foi utilizado para a etapa de hidrodestilação. Para os controles, o procedimento foi realizado sob as mesmas condições, porém, adicionando-se apenas 1L de tampão ao material vegetal, sem o caldo enzimático.

Em todas as análises foram mantidas as mesmas condições de pH, temperatura e resfriamento da amostra para interrupção das enzimas.

4.5 Extração do óleo essencial por hidrodestilação

O óleo essencial das amostras submetidas ao pré-tratamento enzimático e do controle foi extraído por hidrodestilação durante 1 hora em aparelho Clevenger, de acordo com método descrito por Mechkovski & Akereli (1992).

4.6 Estudos do efeito da carga enzimática, do tempo de pré-tratamento e da trituração da casca no rendimento da hidrodestilação e composição do óleo essencial

4.6.1 Estudo do efeito da carga enzimática

Foram realizados pré-tratamentos enzimáticos, conforme metodologia descrita

anteriormente, utilizando-se cargas de 5, 7 e 12 FPA/g, além do controle, sobre as cascas frescas de limão não trituradas e posterior hidrodestilação para cada amostra. O rendimento em óleo e a proporção dos componentes dos óleos obtidos foram avaliados.

Os resíduos líquidos (líquido extrator constituído pelo caldo enzimático e pelo tampão ou só pelo tampão, no caso do controle) gerados pela hidrodestilação foram congelados e os resíduos sólidos (casca) foram mantidos em estufa a 40^{o}C por 10 dias, para posterior extração de cumarinas.

4.6.2 Estudo do efeito do tempo de pré-tratamento enzimático

Foram realizados pré-tratamentos enzimáticos sobre as cascas frescas de limão, não trituradas, utilizando-se uma carga de 7 FPA/g e um controle, variando-se o tempo de contato entre o material vegetal e o caldo enzimático no banho-maria. Foram feitos experimentos com 1, 2 e 3 horas de pré-tratamento. Após o tratamento de cada amostra, realizou-se a hidrodestilação. O rendimento em óleo e a proporção dos componentes dos óleos obtidos foram avaliados.

Os resíduos líquidos e sólidos gerados pela hidrodestilação de cada amostra desta análise foram armazenados da mesma forma descrita no subitem anterior, para posterior extração de cumarinas.

4.6.3 Estudo do efeito do pré-tratamento enzimático sobre a casca triturada

Nesta análise foram utilizadas cascas frescas de limão, que foram trituradas em liquidificador por um minuto junto com a solução tampão utilizada para o pré-tratamento enzimático. Em seguida, realizou-se o tratamento enzimático nas mesmas

condições já descritas, utilizando-se uma carga de 7 FPA/g e um controle, com posterior hidrodestilação. O rendimento em óleo e a proporção dos componentes dos óleos obtidos foram avaliados.

Novamente os resíduos líquidos e sólidos gerados pela hidrodestilação de cada amostra desta análise foram armazenados da mesma forma descrita no subitem 4.6.1, para posterior extração de cumarinas.

4.7 Estudo do efeito do pré-tratamento enzimático sobre o tempo de hidrodestilação

Nesta análise, buscou-se verificar possível redução no tempo de hidrodestilação através do tratamento enzimático, obtendo-se os mesmos rendimentos em óleo obtidos em 1 hora de hidrodestilação sem a utilização de enzimas.

Para os testes deste item foram utilizadas cascas de limão frescas e trituradas. A trituração foi realizada conforme descrito no subitem anterior e os pré-tratamentos enzimáticos foram realizados com cargas de 5, 7 e 12 FPA/g. O rendimento em óleo foi calculado em diferentes intervalos de tempos (10, 15, 20, 30, 40, 50 e 60 minutos) durante a hidrodestilação. Os procedimentos de tratamento enzimático e hidrodestilação foram realizados nas mesmas condições já descritas.

4.8 Identificação dos compostos do óleo essencial por GC e cromatografia GC/MS

A identificação dos componentes químicos de todas as amostras de óleo essencial obtidas foi realizada por GC e GC/MS. Os constituintes foram identificados

por combinação do espectro de massas e comparação com a biblioteca de espectros.

As análises por GC foram feitas em um equipamento Hewlett Packard (HP) 6890, equipado com processador de dados HP-Chemstation. As análises em coluna polar foram realizadas em coluna capilar HP-Innowax de sílica fundida (30 m x 0,32 mm) com 0,5 μm de espessura de filme (Hewlet Packard, Califórnia, EUA) e a seguinte programação de temperatura: 40 ^{o}C (8 min) para 180 ^{o}C a 3 ^{o}C/min, 180 ^{o}C - 240 ^{o}C a 20 ^{o}C/min, 240^{o}C (20 min); temperatura do injetor a 240 ^{o}C, razão de split = 1:50, temperatura do detector a 250 ^{o}C, gás de arraste: H_2 (34KPa), fluxo de 1,7 ml/min; volume injetado: 10 μL de amostra.

4.9 Extração de cumarinas dos resíduos das hidrodestilações

4.9.1 Extração de cumarinas dos resíduos líquidos

Os resíduos líquidos resultantes dos processos de hidrodestilação da casca de *Citrus latifolia* Tanaka foram submetidos a uma extração líquido-líquido em funil de separação com hexano. Foram utilizados 100mL da amostra de resíduo e adicionado o mesmo volume de hexano no funil de separação. Após breve agitação, a fase orgânica foi separada. O procedimento foi repetido 3 vezes, guardando-se as fases separadas no mesmo frasco. Os extratos foram concentrados em evaporador rotatório.

4.9.2 Extração de cumarinas dos resíduos sólidos

Os resíduos sólidos de *C. latifolia* Tanaka (cascas trituradas ou não trituradas) resultantes dos processos de hidrodestilação, após secos em estufa a 40 ^{o}C por 10 dias,

foram moídos e submetidos a uma extração contínua em aparelho Soxhlet com hexano durante um período de 24 horas. O método foi baseado na descrição feita por Sharp *et al.* (1989), com modificações. Após, os extratos hexânicos foram concentrados em evaporador rotatório.

4.10 Identificação de compostos cumarínicos nos extratos dos resíduos das hidrodestilações por GC e GC/MS

Os extratos obtidos foram analisados no GC/MS para a identificação de compostos cumarínicos. Os constituintes foram identificados por combinação do espectro de massas e comparação com a biblioteca de espectros.

As análises do GC foram realizadas no mesmo aparelho descrito anteriormente, utilizando-se uma coluna HP-5 (30 m x 0,32 mm) com a seguinte programação: 100^{o}C (3 min) para 230 ^{o}C a 3^{o}C/min, 230 ^{o}C (25 min); temperatura do injetor a 200 ^{o}C; temperatura do detector a 260 ^{o}C; razão de split = 1:100; gás de arraste: H_2 (34KPa); fluxo de 3,5ml/min; volume injetado: 10 μL de amostra.

4.11 Apresentação dos dados e análise estatística

Os experimentos compreendidos no item 4.6 foram realizados em triplicatas. A maioria dos parâmetros estudados não tiveram distribuição normal, e os resultados foram comparados através de Mann-Whitney, com auxílio do programa SPSS 12.0. Os gráficos foram construídos através do programa Graph Pad Prism versão 4.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo são apresentados e discutidos os dados referentes ao efeito do pré-tratamento enzimático no rendimento e composição do óleo essencial extraído por hidrodestilação, os quais constam nos itens 5.1, 5.2, 5.3 e 5.4. No item 5.5 são apresentados dados qualitativos da presença e percentagem de compostos cumarínicos nos resíduos sólido e líquido das hidrodestilações.

5.1 Efeito da carga enzimática no rendimento e composição do óleo essencial obtido por hidrodestilação

Inicialmente, cascas frescas de *Citrus latifolia* Tanaka, não trituradas, foram submetidas a tratamentos com um complexo enzimático de *Penicillium echinulatum,* rico em celulases, com cargas de 5 FPA/g, 7 FPA/g e 12 FPA/g. Buscou-se verificar o efeito do pré-tratamento enzimático na liberação do óleo essencial, a qual foi avaliada indiretamente pelo rendimento (% v/p) em óleo obtido por hidrodestilação durante uma hora (Figura 4). Verifica-se que não ocorreram diferenças estatísticas entre o grupo controle e os grupos de amostras submetidas às diferentes cargas enzimáticas, demonstrando que o pré-tratamento enzimático não altera o rendimento em óleo obtido por hidrodestilação durante uma hora.

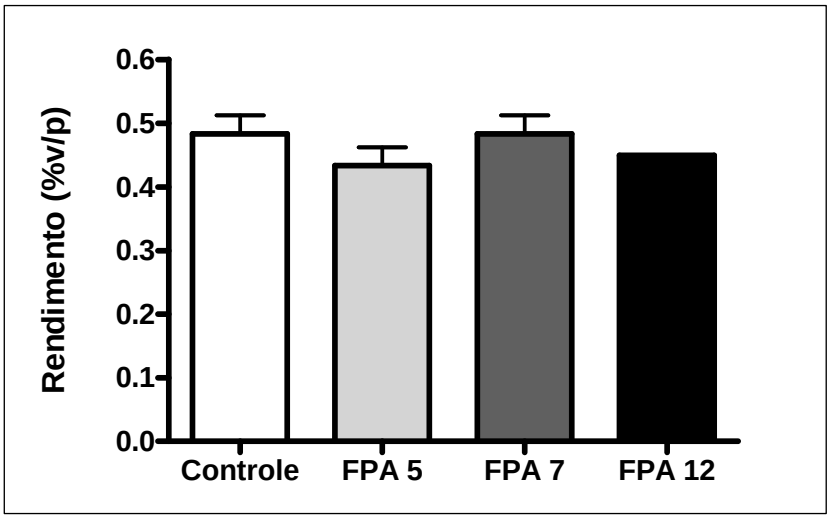


Figura 4. Rendimento em óleo extraído por hidrodestilação de 1 hora após pré-tratamento com diferentes cargas enzimáticas

Sugere-se que, embora o complexo enzimático contendo celulases ativas tenha atuado sobre as finas paredes das glândulas oleíferas presentes no flavedo, liberando o óleo essencial durante o pré-tratamento, a ação das enzimas não foi suficiente para ser detectada no processo de hidrodestilação de uma hora, uma vez que não houve aumento de rendimento em óleo. O fato do rendimento em óleo não ter sido alterado pode ser devido ao impedimento da evaporação do óleo na hidrodestilação pelas próprias camadas internas do tecido da casca, uma vez que as cascas não estavam trituradas.

Diferente do presente trabalho, o uso de enzimas foi favorável para extração de óleo essencial de *Citrus reticulata* (mandarina ou tangerina), que com a aplicação de complexo enzimático contendo xilanases, mostrou aumento do rendimento em óleo (Mishra *et al.*, 2005). Esta diferença nos resultados entre os dois trabalhos pode ser devida à constituição do flavedo nas duas espécies, na carga dos preparados enzimáticos, no tempo do pré-tratamento enzimático do flavedo, que no trabalho de Mishra *et al.* (2005) foi de 3 horas, e no tempo de hidrodestilação, o qual não foi especificado. Li *et al.* (2006) também verificaram que celulases, quando utilizadas para a extração de compostos fenólicos da casca de limão,

genericamente aumentaram o rendimento na extração desses compostos, porém, este aumento não foi em todos os casos proporcional ao aumento da concentração enzimática.

Embora não envolvendo extração de compostos de interesse ou de óleos essenciais de frutos cítricos, Santos (2007) verificou aumento de rendimento em óleo de *Melampodium divaricatum* e *Mentha spicata* com aumento da carga enzimática, indicando novamente que a constituição do substrato, que varia conforme a espécie a ser estudada, interfere nos resultados.

A proporção dos componentes dos óleos extraídos por hidrodestilação durante uma hora foi analisada em GC e GC/MS com o objetivo principal de verificar se houve variações com o pré-tratamento enzimático. Para tanto, juntou-se em um único grupo os dados dos diferentes pré-tratamentos enzimáticos, o qual está apresentado na Tabela 2. Verifica-se que ocorreu aumento nas percentagens de alguns compostos, dos quais a maioria são oxigenados, como visto para α-terpineno (p=0,012), α-terpinoleno (p=0,012), terpinen-4-ol (p=0,013), α-terpineol (p=0,013), nerol (p=0,013) e geraniol (p=0,012). A percentagem total de compostos identificada foi de 98,5%.

Embora na literatura não exista explicação para o aumento na percentagem de alguns compostos de óleos essenciais extraídos por hidrodestilação após pré-tratamento enzimático, uma razão para este fato poderia estar relacionada à maior ou menor solubilidade destes compostos em líquidos polares. Como não há interferência direta das enzimas sobre os componentes do óleo, visto que elas agem apenas rompendo a parede celular das glândulas oleíferas durante o pré-tratamento enzimático, este rompimento pode ter permitido maior difusão dos compostos de maior polaridade em relação aos de menor polaridade para a solução, implicando no aumento da percentagem de compostos oxigenados após a hidrodestilação.

Uma vez que os terpenos oxigenados contribuem com maior intensidade no aroma dos

Tabela 2. Percentagens dos compostos dos óleos essenciais obtidos por hidrodestilação após pré-tratamento enzimático.

	Percentagens dos compostos (%)	
Compostos	**Controle**	**Pré-tratamento enzimático**
α-pineno	0,87 ± 0,14	0,90 ± 0,22
α-tujeno	0,34 ± 0,02	0,00
β-pineno	7,63 ± 0,38	6,48 ± 1,70
Sabineno	1,05 ± 0,05	0,56 ± 0,42
Mirceno	0,95 ± 0,05	0,96 ± 0,09
α-terpineno	0,15 ± 0,00	0,43 ± 0,07 *
Limoneno	44,05 ± 2,96	43,88 ± 1,56
β-felandreno	0,61 ± 0,01	0,62 ± 0,62
γ-terpineno	13,26 ± 0,43	12,33 ± 2,89
ρ-cimeno	6,97 ± 0,36	0,37 ± 0,29
α-terpinoleno	0,61 ± 0,04	0,70 ± 0,04 *
Linalol	0,96 ± 0,38	1,69 ± 0,74
Trans-α-bergamoteno	1,49 ± 0,07	1,03 ± 0,26
Terpinen-4-ol	0,71 ± 0,28	1,66 ± 0,39 *
Neral	4,25 ± 0,25	4,98 ± 1,60
α-terpineol	2,23 ± 0,13	3,35 ± 1,06 *
β-bisaboleno	4,35 ± 0,25	3,35 ± 0,47
Geranial	6,26 ± 0,36	8,35 ± 2,92
Acetato de geranila	0,56 ± 0,04	0,37 ± 0,12
Nerol	0,85 ± 0,05	3,37 ± 0,12 *
Geraniol	1,27 ± 0,07	3,13 ± 0,52 *

* Valores estatisticamente diferentes entre o grupo controle e o grupo submetido ao tratamento enzimático ($p \leq 0,05$) através do teste de Mann-Whitney.

óleos e geralmente aparecem em menores quantidades em relação a outros componentes (Yabiku & Lara, 1986), os dados do presente trabalho são relevantes, pois mostram um aumento na percentagem destes compostos após o pré-tratamento enzimático.

5.2 Efeito do tempo de pré-tratamento enzimático no rendimento e composição do óleo essencial obtido por hidrodestilação

Como observado no item anterior, a hidrodestilação realizada em uma hora não detec-

tou o efeito do pré-tratamento enzimático na casca de *Citrus latifolia* Tanaka, o qual foi analisado pelo cálculo do rendimento em óleo. Três alternativas metodológicas ainda poderiam ser estudadas para detectar o efeito do pré-tratamento enzimático: uma envolvendo o aumento do tempo de pré-tratamento, outra envolvendo a trituração da casca e outra comparando-se os rendimentos em um tempo menor de hidrodestilação.

Nesta etapa, buscou-se verificar se o aumento do tempo de pré-tratamento enzimático alterava o rendimento de extração por hidrodestilação durante uma hora. Também foi estudada a variação das proporções dos componentes do óleo. Para tanto, realizou-se o pré-tratamento enzimático com uma carga de 7 FPA/g de substrato sobre as cascas não trituradas, durante 1, 2 e 3 horas. Neste experimento, o controle foi realizado para se obter um parâmetro do rendimento em óleo da amostra sem pré-tratamento. Como verificado no experimento anterior onde se variaram as cargas enzimáticas, a análise da Figura 5 também mostra que não houve diferença estatística nos rendimentos em óleo quando o material foi pré-tratado

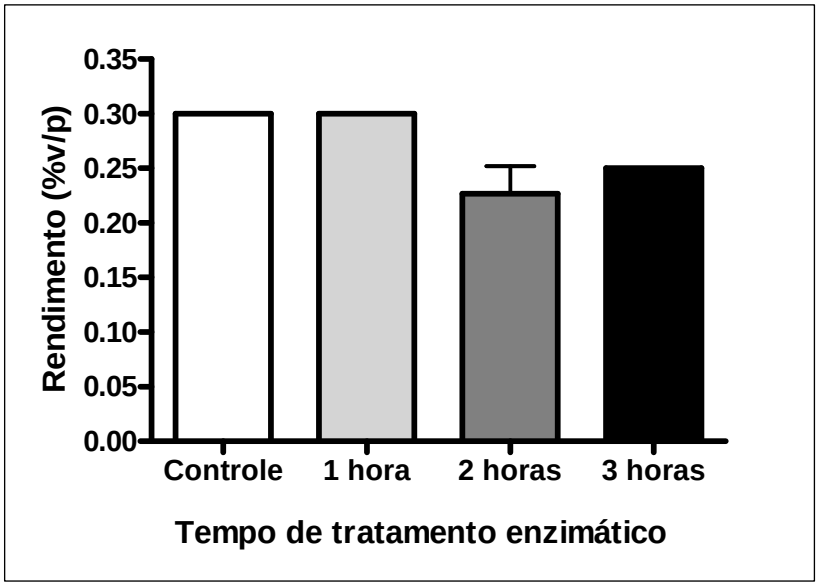


Figura 5. Rendimento em óleo extraído por hidrodestilação de 1 hora após diferentes tempos de pré-tratamento enzimático.

enzimaticamente com os diferentes tempos.

Tal como estudado no item 5.1, a proporção dos componentes dos óleos extraídos por hidrodestilação foi analisada em GC e GC/MS com o objetivo de verificar se houve variações com o pré-tratamento enzimático. Juntou-se em um único grupo todos os dados obtidos nos três tempos de pré-tratamento enzimático (Tabela 3). Novamente verificou-se um aumento nas percentagens de alguns compostos oxigenados, como linalol (p=0,012), terpinen-4-ol (p=0,013), α-terpineol (p=0,012), nerol (p=0,013) e geraniol (p=0,013), quando as amostras foram pré-tratadas enzimaticamente. A percentagem total de compostos identificada foi de 96,66%.

Tabela 3. Percentagens dos compostos dos óleos essenciais obtidos por hidrodestilação após pré-tratamento enzimático com uma carga de 7 FPA/g de substrato.

	Percentagens dos compostos (%)	
Compostos	**Controle**	**Pré-tratamento enzimático**
α-pineno	0,00	0,23 ± 0,35
α-tujeno	0,00	0,00
β-pineno	4,09 ± 0,29	3,38 ± 1,52
Sabineno	0,44 ± 0,03	0,14 ± 0,21
Mirceno	0,88 ± 0,03	0,66 ± 0,13
α-terpineno	0,00	0,14 ± 0,21
Limoneno	41,96 ± 0,87	34,43 ± 4,97
β-felandreno	0,00	0,28 ± 0,42
γ-terpineno	11,67 ± 0,56	10,76 ± 1,31
ρ-cimeno	0,92 ± 0,00	0,12 ± 0,18
α-terpinoleno	0,64 ± 0,00	0,64 ± 0,08
Linalol	1,39 ± 0,06	1,96 ± 0,26 *
Trans-α-bergamoteno	1,18 ± 0,02	1,43 ± 0,42
Terpinen-4-ol	1,57 ± 0,07	2,21 ± 0,32 *
Neral	6,36 ± 0,27	7,74 ± 1,19
α-terpineol	3,12 ± 0,12	4,33 ± 0,63 *
β-bisaboleno	4,13 ± 0,16	4,34 ± 0,98
Geranial	9,35 ± 0,39	11,38 ± 1,83
Acetato de geranila	0,59 ± 0,01	0,46 ± 0,05
Nerol	4,04 ± 0,04	6,17 ± 1,43 *
Geraniol	4,14 ± 0,04	5,86 ± 1,19 *

* Valores estatisticamente diferentes entre o grupo controle e o grupo submetido ao tratamento enzimático ($p \leq 0,05$) através do teste de Mann-Whitney.

Pode-se verificar também que, para o pré-tratamento de uma hora, a percentagem de compostos oxigenados (4,87%) foi estatisticamente maior do que a percentagem de compostos não-oxigenados (4,51%), o mesmo acontecendo com o pré-tratamento de 3 horas, que mostrou percentagem maior de compostos oxigenados (6,03%) em relação à percentagem de não-oxigenados (3,66%) (dados não mostrados). Estes dados corroboram com a hipótese mencionada anteriormente de que o pré-tratamento enzimático favorece a extração de componentes mais polares do óleo, implicando no aumento da difusão desses compostos do interior das glândulas para a solução. Havendo maior tempo para a difusão, como verificado na condição de 3 horas de pré-tratamento, a percentagem desses compostos foi maior que na condição de uma hora.

5.3 Efeito do pré-tratamento enzimático em cascas de *Citrus latifolia* Tanaka trituradas no rendimento e composição do óleo essencial obtido por hidrodestilação

Para estudar a segunda alternativa sobre a detecção do efeito do pré-tratamento enzimático, como mencionado no item 5.2, aumentou-se a superfície das cascas de *C. latifolia* Tanaka. Para tanto, cascas frescas foram trituradas e submetidas a um pré-tratamento enzimático com carga de 7 FPA/g, para posterior extração por hidrodestilação de uma hora. A comparação do rendimento (%v/p) em óleo entre a amostra pré-tratada enzimaticamente e o controle, ambos em torno de 2%, também não mostrou diferença estatística (dados não mostrados). Como já era esperado, os rendimentos em óleo se mostraram muito maiores com a casca triturada (em torno de 2%), do que com a casca sem trituração (Figuras 4 e 5). Os maiores rendimentos para a casca triturada podem ter sido devidos, não apenas ao aumento de superfície, mas também à ação direta do processo de trituração que rompe as glândulas oleíferas.

Novamente, como verificado no pré-tratamento de cascas não trituradas com diferentes cargas enzimáticas e com o aumento do tempo de pré-tratamento enzimático, não ocorreu aumento de rendimento em óleo com o pré-tratamento enzimático sobre as cascas trituradas. Estes resultados podem evidenciar que a hidrodestilação durante o tempo de uma hora é suficiente para extrair todo o óleo das cascas trituradas, mesmo que o material não seja tratado enzimaticamente. Entretanto, estes experimentos não permitiram quantificar o óleo liberado pela ação das enzimas durante o pré-tratamento enzimático, antes do processo de hidrodestilação. Como visto posteriormente, uma maior quantidade de óleo foi extraída em um menor tempo de hidrodestilação nas amostras pré-tratadas com enzimas, indicando que o óleo já havia sido liberado das glândulas para a solução, devido à ação enzimática. Portanto, como é verificado no próximo item, o tempo de hidrodestilação pode constituir-se em um fator limitante do processo quando na ausência de pré-tratamento enzimático.

Embora os rendimentos em óleo das cascas trituradas não tenham se mostrado diferentes entre o controle e a amostra pré-tratada com enzimas, na Tabela 4 verifica-se que houve aumento na percentagem de vários compostos nas amostras pré-tratadas enzimaticamente. A percentagem total de compostos identificada foi de 99,38%.

Além da discussão referente aos rendimentos em óleo, os experimentos descritos até este item sugerem também que, embora o pré-tratamento enzimático não tenha aumentado os rendimentos com o processo de hidrodestilação de uma hora, ele interfere na extração de alguns compostos específicos, principalmente oxigenados, importantes para a qualidade do óleo essencial, aumentando suas percentagens.

Tabela 4. Percentagens dos compostos dos óleos essenciais obtidos pela hidrodestilação de casca triturada após pré-tratamento enzimático com uma carga de 7 FPA/g de substrato.

	Percentagens dos compostos (%)	
Compostos	**Controle**	**Pré-tratados com enzimas**
α-pineno	2,08 ± 0,02	2,47 ± 0,02 *
α-tujeno	0,50 ± 0,05	0,63 ± 0,03 *
β-pineno	10,67 ± 0,00	12,22 ± 0,01 *
Sabineno	2,44 ± 0,01	1,43 ± 0,03
Mirceno	1,32 ± 0,01	1,47 ± 0,01 *
α-terpineno	0,00	0,00
Limoneno	52,52 ± 0,02	56,31 ± 0,01 *
β-felandreno	0,00	0,00
γ-terpineno	11,83 ± 0,03	14,37 ± 0,03 *
ρ-cimeno	0,31 ± 0,02	0,00
α-terpinoleno	0,48 ± 0,03	0,59 ± 0,02 *
Linalol	0,00	0,00
Trans-α-bergamoteno	1,01 ± 0,00	1,05 ± 0,02 *
Terpinen-4-ol	0,45 ± 0,01	0,50 ± 0,02 *
Neral	1,28 ± 0,01	1,49 ± 0,01 *
α-terpineol	0,55 ± 0,02	0,61 ± 0,02 *
β-bisaboleno	2,74 ± 0,03	2,84 ± 0,02 *
Geranial	1,91 ± 0,00	2,16 ± 0,00 *
Acetato de geranila	0,00	0,30 ± 0,00 *
Nerol	0,49 ± 0,01	0,51 ± 0,01 *
Geraniol	0,41 ± 0,01	0,43 ± 0,01

* Valores estatisticamente diferentes entre o grupo controle e o grupo submetido ao tratamento enzimático ($p \leq 0,05$) através do teste de Mann-Whitney.

5.4 Efeito do pré-tratamento enzimático sobre o tempo de hidrodestilação

Com o propósito de acompanhar os rendimentos em óleo durante tempo de uma hora de hidrodestilação, estes foram determinados em diferentes intervalos de tempos (10, 15, 20, 30, 40, 50 e 60 minutos), em amostras que receberam tratamento enzimático com cargas de 5FPA, 7FPA e 12 FPA/g de substrato. Visando uma análise comparativa, os valores de

rendimento foram representados em uma escala de 0 a 100%, sendo que 100% representou o valor de rendimento obtido em 1 hora de hidrodestilação, sem o tratamento enzimático.

Na Figura 6, verifica-se que o tratamento enzimático com uma carga de 5 FPA/g atinge 100% de rendimento em aproximadamente 30 minutos, reduzindo o tempo de hidrodestilação em relação ao controle, onde se obteve 100% de rendimento próximo aos 50 minutos.

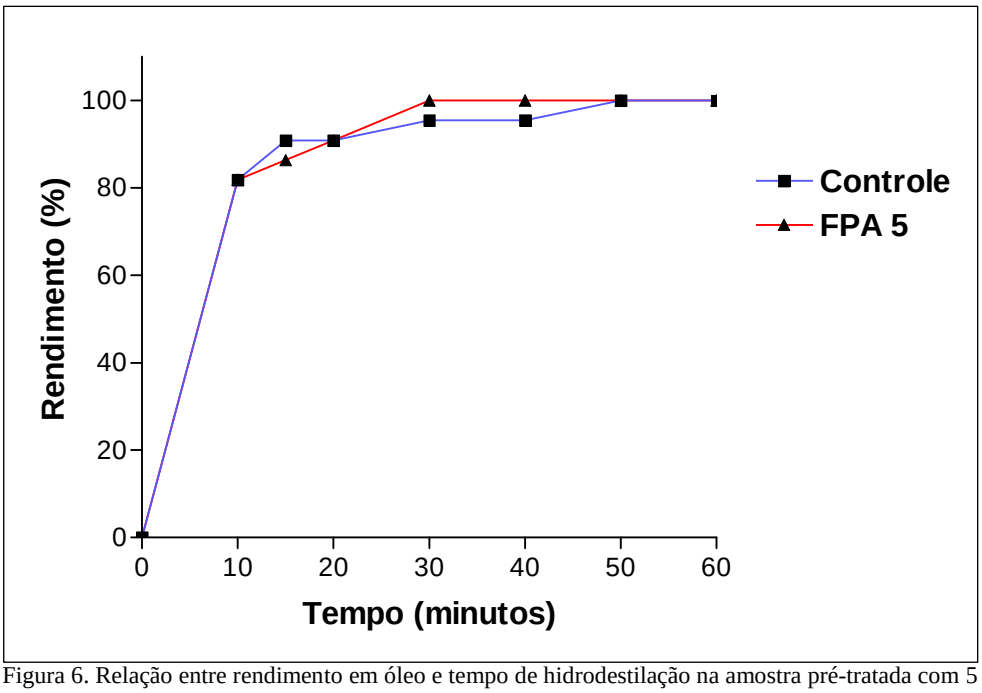


Figura 6. Relação entre rendimento em óleo e tempo de hidrodestilação na amostra pré-tratada com 5 FPA/g.

Esses dados sugerem que o tratamento enzimático realizado com uma carga de 5 FPA/g reduz o tempo necessário para a extração total do óleo pelo processo de hidrodestilação em aproximadamente 20 minutos.

Tal como observado para os rendimentos de extração com o uso de uma carga de 5 FPA/g, verifica-se na Figura 7 que a carga de 7 FPA/g também reduziu o tempo de hidrodestilação, obtendo-se o rendimento de 100% em torno de 20 minutos, enquanto que no controle este rendimento foi obtido em torno de 40 minutos.

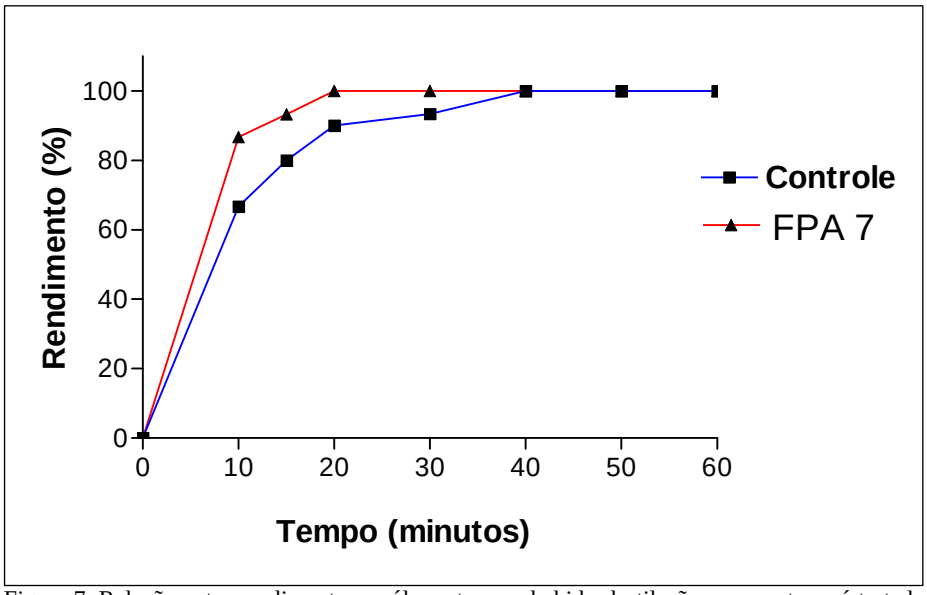


Figura 7. Relação entre rendimento em óleo e tempo de hidrodestilação na amostra pré-tratada com 7 FPA/g.

Na Figura 8 são apresentados os dados de rendimento e tempo de hidrodestilação de uma amostra submetida a um pré-tratamento enzimático com carga de 12 FPA/g. Verifica-se que, enquanto o controle chegou a 100% de rendimento próximo aos 50 minutos, o tratamento enzimático reduziu esse tempo em aproximadamente meia hora, atingindo o rendimento máximo próximo aos 20 minutos.

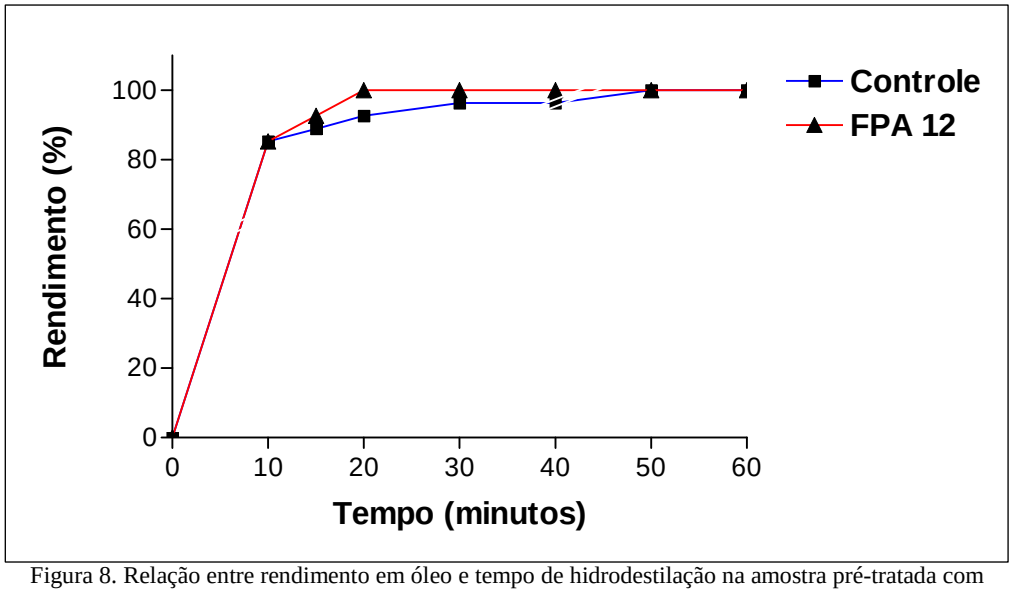


Figura 8. Relação entre rendimento em óleo e tempo de hidrodestilação na amostra pré-tratada com 12 FPA/g.

Embora os tratamentos enzimáticos com as três distintas cargas tenham se mostrado favoráveis para a diminuição do tempo de hidrodestilação, como observa-se pela análise conjunta das figuras 6 ,7 e 8, não é possível mostrar uma diferença de eficiência entre elas. Sugere-se, portanto que, pelo menos a menor carga utilizada (5 FPA/g), ou talvez uma carga ainda menor, possa ser suficiente para reduzir o tempo de hidrodestilação.

Conforme comentado anteriormente nos trabalhos de Rezzoug & Louka (2009) e Ferhat *et al* (2006) sobre o consumo de energia pela diminuição do tempo nos processos de extração de óleo essencial cítrico, no presente trabalho, a possibilidade de redução do tempo de hidrodestilação através de pré-tratamento enzimático também pode apresentar vantagens do ponto de vista de custo energético. Outra vantagem apontada por Rezzoug & Louka (2009) e Ferhat *et al* (2006) é a diminuição do tempo de exposição do material vegetal à temperatura de ebulição da água, resultando na maior integridade do óleo essencial, uma vez que, de acordo com Costa (1994), o tempo prolongado pode provocar a degradação de compostos voláteis devido à alta temperatura.

5.5 Identificação e avaliação das proporções de compostos cumarinicos nos extratos obtidos dos resíduos líquidos e sólidos das hidrodestilações

Sabendo-se que compostos cumarínicos estão presentes na casca de frutos cítricos, nos próximos dois subitens são apresentados dados demonstrativos sobre o efeito do pré-tratamento enzimático nas proporções de tais compostos encontrados nos resíduos sólidos e líquidos das hidrodestilações, extraídos por solvente orgânico.

5.5.1 Compostos cumarínicos obtidos dos resíduos líquidos das hidrodestilações submetidas aos diferentes pré-tratamentos enzimáticos

Os resíduos líquidos resultantes dos processos de hidrodestilação das cascas de *Citrus latifolia* Tanaka foram submetidos a uma extração líquido-líquido em funil de separação com hexano e os extratos foram analisados em GC e GC/MS para a identificação e determinação das percentagens de compostos cumarínicos. Quatro compostos cumarínicos se apresentaram em maior proporção: 7-metoxicumarina, limettin, bergapteno e isopimpinellin. Os dados de percentagens desses compostos das amostras que sofreram pré-tratamento enzimático foram agrupados com o propósito de comparação com as percentagens obtidas sem o tratamento enzimático. Estes resultados estão apresentados na Figura 9 (referente à variação da carga enzimática, cujos dados de 5, 7 e 12 FPA/g foram agrupados, constituindo um único grupo denominado “com enzima”), na Figura 10 (referente à variação do tempo de pré-tratamento enzimático, cujos dados de 1, 2 e 3 horas foram agrupados da mesma forma que na Figura 9) e na Figura 11 (referente ao pré-tratamento sobre a casca triturada).

A análise do conjunto destas figuras mostra que alguns compostos cumarínicos obtidos pela extração com hexano, presentes nos resíduos líquidos, tiveram suas percentagens alteradas quando as amostras sofreram pré-tratamento enzimático. Entretanto, essas alterações não permitem concluir se o pré-tratamento enzimático aumenta ou diminui a percentagem dos compostos cumarínicos como um todo, visto que, conforme a análise, alguns tiveram um aumento e outros uma redução nas suas percentagens.

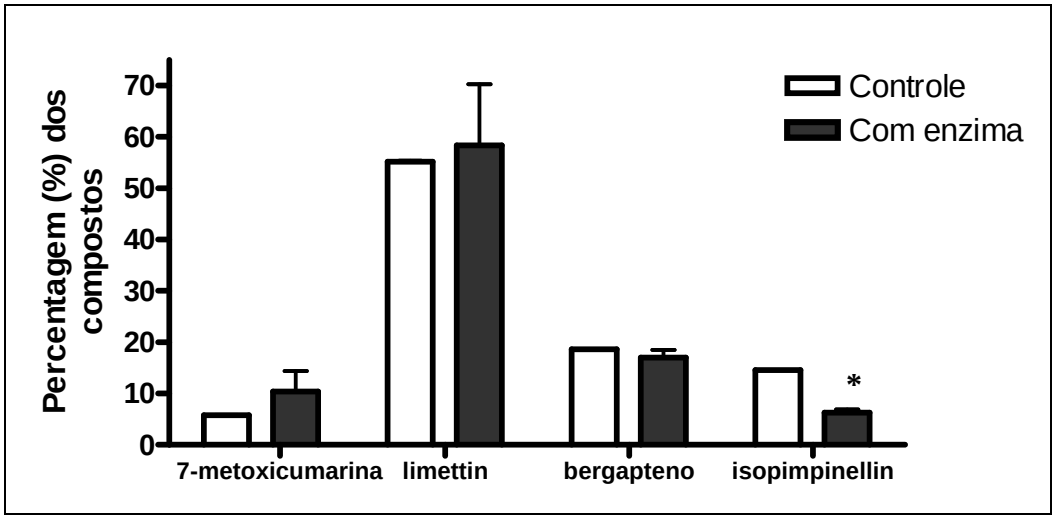


Figura 9. Percentagem dos compostos cumarínicos encontrados dos resíduos líquidos das hidrodestilações no grupo controle e no grupo submetido ao pré-tratamento enzimático.

* Valor estatisticamente diferente entre o grupo controle e grupo enzimático ($p \leq 0,05$) através do teste de Mann-Whitney.

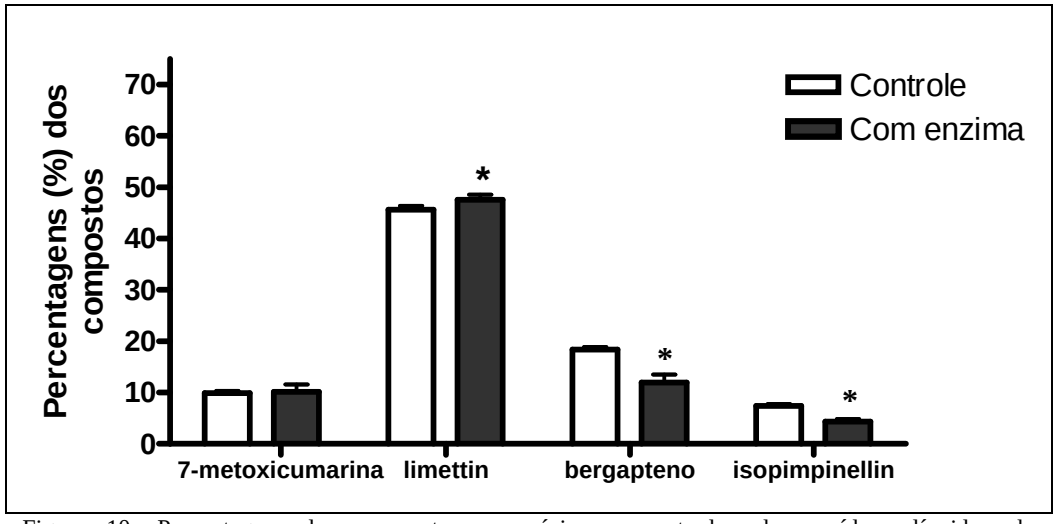


Figura 10. Percentagem dos compostos cumarínicos encontrados dos resíduos líquidos das hidrodestilações no grupo controle e no grupo submetido ao pré-tratamento enzimático com carga de 7FPA/g.

* Valores estatisticamente diferentes entre o grupo controle e grupo enzimático ($p \leq 0,05$) através do teste de Mann-Whitney.

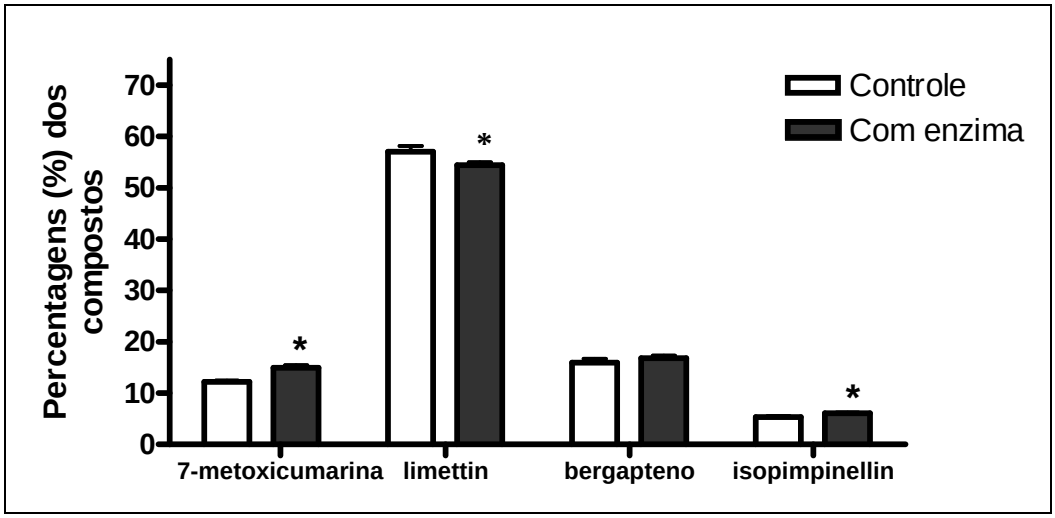


Figura 11. Percentagem dos compostos cumarínicos encontrados dos resíduos líquidos das hidrodestilações no grupo controle e no grupo submetido ao pré-tratamento enzimático com uma carga de 7FPA/g sobre a casca triturada.

* Valores estatisticamente diferentes entre o grupo controle e grupo enzimático ($p \leq 0,05$) através do teste de Mann-Whitney.

5.5.2 Compostos cumarínicos obtidos dos resíduos sólidos das hidrodestilações submetidas aos diferentes pré-tratamentos enzimáticos

Os resíduos sólidos de *Citrus latifolia* Tanaka (cascas trituradas ou não trituradas) provenientes das hidrodestilações, após secagem em estufa a 40 ^{o}C, foram moídos e submetidos a uma extração contínua em aparelho Soxhlet com hexano (24 horas). Os extratos obtidos foram analisados em GC e GC/MS para identificação de compostos cumarínicos.

Os cromatogramas mostraram, como verificado para os resíduos líquidos, os mesmos compostos identificados (7-metoxicumarina, limettin, bergapteno e isopimpinellin). A análise do conjunto das figuras, representado pela Figura 12 (referente à variação da carga enzimática, cujos dados de 5, 7 e 12 FPA/g foram agrupados, constituindo um único o grupo denominado “com enzima”), Figura 13 (referente à variação do tempo de pré-tratamento

enzimático, cujos dados de 1, 2 e 3 horas foram agrupados da mesma forma que na Figura 12) e Figura 14 (referente ao pré-tratamento sobre a casca triturada), mostra semelhança nas percentagens obtidas no grupo controle e no grupo “com enzima”, embora para alguns compostos tenham ocorrido pequenas diferenças na análise com a casca triturada. Novamente, apesar de terem ocorrido alterações nas percentagens de compostos cumarínicos não é possível concluir se o pré-tratamento enzimático aumenta ou diminui a percentagem dos compostos cumarínicos como um todo.

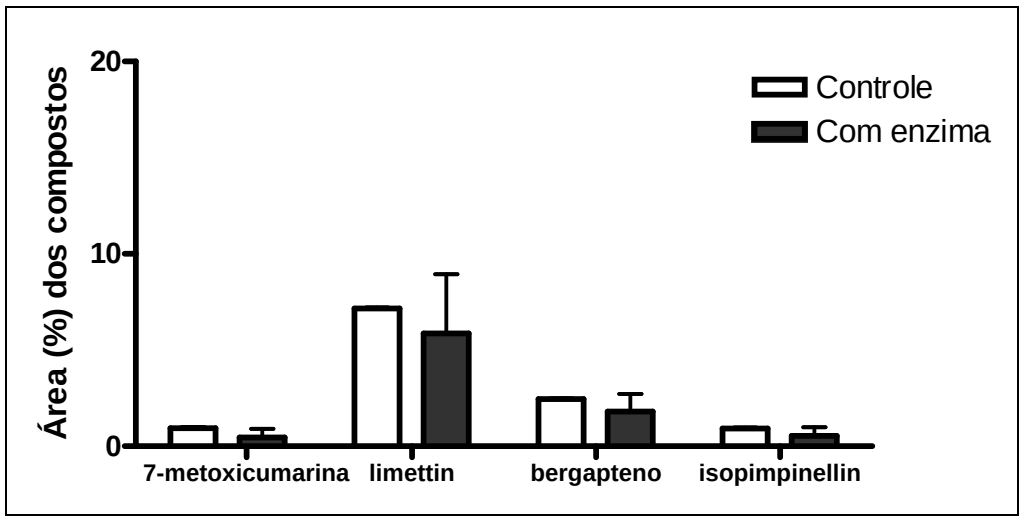


Figura 12. Percentagem dos compostos cumarínicos encontrados dos resíduos sólidos das hidrodestilações no grupo controle e no grupo submetido ao pré-tratamento enzimático.

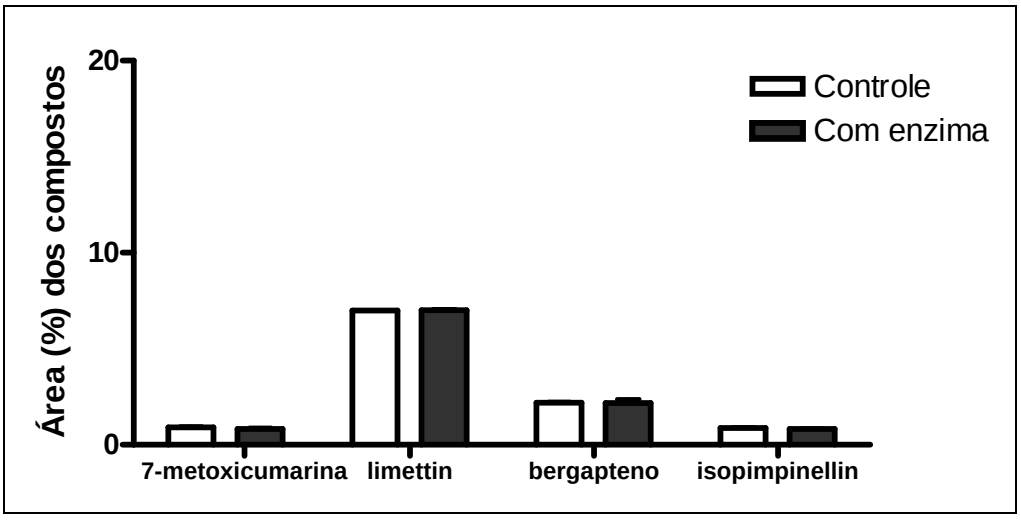


Figura 13. Percentagem dos compostos cumarínicos encontrados dos resíduos sólidos das hidrodestilações no grupo controle e no grupo submetido ao pré-tratamento enzimático com carga de 7FPA/g.

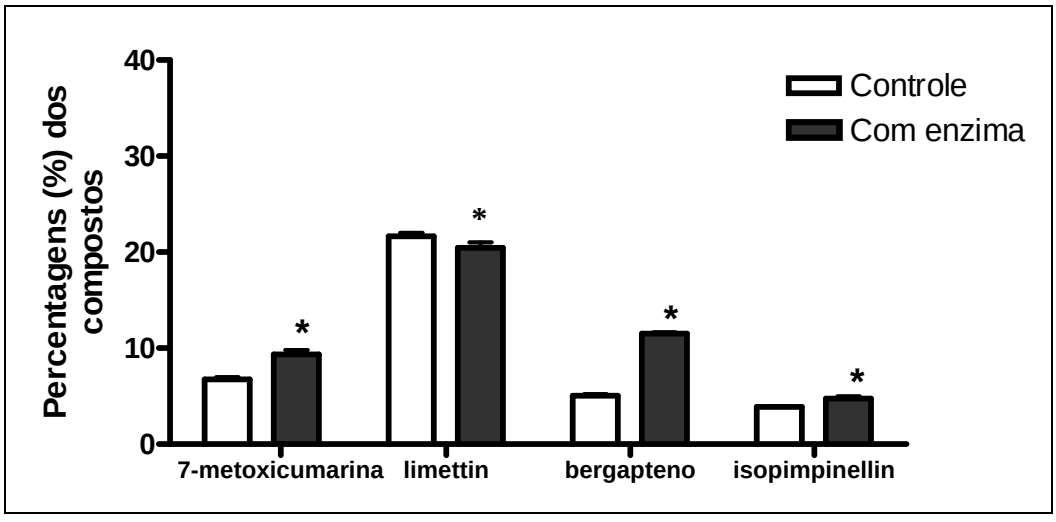


Figura 14. Percentagem dos compostos cumarínicos encontrados dos resíduos sólidos das hidrodestilações no grupo controle e no grupo submetido ao pré-tratamento enzimático com uma carga de 7FPA/g sobre a casca triturada.

* Valores estatisticamente diferentes entre o grupo controle e grupo enzimático ($p \leq 0,05$) através do teste de Mann-Whitney.

Comparando-se as figuras referentes aos resíduos líquidos (9, 10 e 11) com as dos sólidos (12, 13 e 14) observa-se que as percentagens das cumarinas identificadas nos resíduos sólidos foram menores. Esta constatação permite sugerir que, durante o processo de hidrodestilação, alguns compostos cumarínicos, como os quatro identificados (7-metoxicumarina, limettin, bergapteno e isopimpinellin), passam para solução aquosa mais facilmente do que outros devido a sua polaridade. Consequentemente, as proporções destes compostos acabam sendo diminuídas nos resíduos sólidos em relação aos líquidos, como foi observado.

Embora ainda mais baixas do que as percentagens apresentadas nos resíduos líquidos, as percentagens verificadas para os resíduos sólidos com a casca triturada (Figura 14) foram mais altas em relação às verificadas nas análises referentes às Figuras 12 e 13 (onde a casca não foi triturada). Este fato pode ser devido à interferência da retenção do líquido da hidrodestilação pelas cascas trituradas, ocorrida no momento de separarar as fases (sólida e líquida), resultando em um aumento nas proporções destes compostos no extrato dessas amostras.

Os dados de percentagem dos compostos cumarínicos extraídos com hexano a partir dos resíduos de hidrodestilação da casca de *Citrus latifolia* Tanaka indicam ainda que o limettin é o componente majoritário, seguido de bergapteno, 7-metoxicumarina e isopimpinellin.

Embora os processos industriais de obtenção de óleo essencial de frutas cítricas sejam em sua maioria obtidos por prensagem, o presente trabalho propõe que, ao se fazer uso do processo de hidrodestilação, os resíduos líquidos podem ser considerados fontes de cumarinas.

Finalmente, no presente trabalho, foi possível detectar um efeito positivo na liberação de óleo essencial de cascas de *C. latifolia* Tanaka tratadas com complexos enzimáticos ricos

em celulases. Esta constatação preconiza as bases para um processo tecnológico que envolve pré-tratamento enzimático associado à hidrodestilação, diminuindo o custo energético desse processo e o risco de hidrólise de componentes voláteis, para ser empregado na obtenção de óleo essencial de *C. latifolia* Tanaka.

Adicionalmente, embora não tenha sido objeto do presente trabalho, pode-se prever que o tratamento enzimático poderia ser associado à centrifugação para a separação do óleo essencial da fase aquosa, sem a necessidade de hidrodestilação, ou ainda, substituindo a ação da prensagem.

6. CONCLUSÕES

A análise dos dados obtidos no presente trabalho permite concluir que:

- O pré-tratamento enzimático reduz o tempo de hidrodestilação para a extração de óleo essencial *Citrus latifolia* Tanaka.
- O pré-tratamento enzimático aumenta a percentagem de compostos oxigenados em relação aos não oxigenados no óleo essencial de *C. latifolia* Tanaka, quando extraídos por hidrodestilação.
- O pré-tratamento enzimático pode alterar a percentagem de determinados compostos cumarínicos encontrados nos resíduos líquidos e nos resíduos sólidos do processo de obtenção de óleos cítricos por hidrodestilação.
- A percentagem dos quatro compostos identificados 7-metoxicumarina, limettin, bergapteno e isopimpinellin é maior nos resíduos líquidos do que nos resíduos sólidos das hidrodestilações.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Benincasa, M.; Buiarelli, F.; Cartoni, G. P.; Coccioli, F. (1990) Analysis of lemon and bergamot essential oils by HPLC with microbore columns. **Chromatographia**, 30(5/6).

Bhat, K. K. S. (1995) Agrotechnology of aromatic plants. In: Silva, K. T. **A Manual on the Essential Oil Industry.** Vienna/ Austria: 13-35.

Bisaria, V.S. e Ghose, T.K. (1981), Biodegradation of cellulosic materials: Substrats, microrganisms, enzyme and products. **Enzyme and Microbial Technology**, 3: 90-104.

Bizzo, H. R.; Hovell, A. M.; Rezende, C. M. (2009) Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. **Química Nova**,32(3): 588-594.

Bourgaud, F.; Poutaraud, A.; Guckert, A. (1993) Extraction of coumarins from plant material (Leguminosae). **Phytochemical Analysis**, 5(3): 127-132.

Bousbia, N.; Vian, M. A.; Ferhat, M. A.; Meklati, B. Y.; Chemat, F. (2009) A new process for extraction of essential oil from *Citrus* peels: Microwave hydrodiffusion and gravity. **Journal of Food Engineering**, 90: 409-413.

Bruneton, J. (1991) **Elementos de Fitoquímica y de Farmacognosia.** 1. ed. Zaragosa/ Espana: Ed. ACRIBA. S. A. 594p.p.

Camassola, M.; Bittencourt, L. R.; Shenem, N. T.; Andreaus, J.; Dillon, A. J. P. (2004) Characterization of the cellulase complex of *Penicillium echinulatum*. **Biocatalysis and Biotransformation**, 22: 391-396.

Choi, I. H.; Kim, J.; Noh, M. J.; Choi, E. S.; Y, K. P. (1998) Effect of functional groups on the solubilities of coumarin derivatives in supercritical carbon dioxide. **Chromatographia.** 47(1/2): 93-97.

Chouchi, D. & Barth, D.(1994) Rapid identification of some coumarin derivatives in deterpenated citrus peel oil by gas chromatography. **Journal of Chromatography A**. 672(1-2): 177-183.

Coll, M. D.; Coll, L.; Laencina, J. (1998) Recovery of flavanones from wastes of industrially processed lemons. **Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und - Forschung A**. 206: 404-407.

Costa, A. F. (1994) **Farmacognosia.** Vol 1, 5ª. Ed., Lisboa: Fundação Caloutre Gulbenkian,1031p.p.

Dugo, P., Mondello, L., Cogliandro, E., Cavazza, A., Dugo, G. (1997) On the genuineness of citrus essential oils. Part LIII. Determination of the composition of the oxygen heterocyclic fraction of lemon essential oils (*Citrus Limon* (L.) Burm. F.) by normal-phase high performance liquid chromatography. **Flavour and Fragrance Journal**, 13 (5): 329-334.

Dugo, P.; Mondello, L.; Dugo, L.; Stancanelli, R.; Dugo, G. (2000) LC-MS for the identification of oxygen heterocyclic compounds in citrus essential oils. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. 24(1): 147-154.

Egan, D.; O'Kennedy, R.; Moran, E.; Cox, C.; Posser, E.; Thornes, R.D. (1990). The pharmacology, metabolism, analysis and applications of coumarin and coumarin-related compounds. **Drug Metabolism Rewiew.** 22: 503-529.

EMATER (2003/2004) **Levantamento da Fruticultura Comercial do Rio Grande do Sul** - Porto Alegre: EMATER/RS-ASCAR, 89 p.p.

Ferhat, 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: 121–126.

Filho, H. G., Penteado, B. B., Santos, C. H. (2005) Preparo de amostras e métodos para a determinação do teor de óleo essencial de frutos de limoeiro. **Revista Brasileira de Fruticultura,** 27(1).

Ghose, T.K. (1987) Measurement of cellulase activities. **Pure Applied Chemistry.** 59: 257-268.

Grings, M. B. Estudo do comportamento de fases dos óleos essenciais de limão Taiti e bergamota e CO2 supercrítico. (2004) **Tese de Mestrado**, Universidade Regional Integradado Alto Uruguai e das Missões, Erechim.

Hanmoungjai, P.; Pyle, D.L.; Niranjan, K. (2001) Enzymatic process for extracting oil and protein from rice bran. **Journal of the American Oil Chemists' Society.** 78(8): 817-821.

Huet, R. (1991) Les huiles essentielles d'agrumes. **Fruits,** 46 (4): 501-513.

Kerrola, K. M. & Kallio, H. P. (1994) Characterization of volatile composition and odor of Angelica (*A. archangelica* Subsp. archangelica L.) root extracts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 42: 1979-1988.

Kimbaris AC, Siatis NG, Daferera DJ, Tarantilis PA, Pappas CS, Polissiou MG (2006) Comparison of distillation and ultrasound-assisted extraction methods for the isolation of sensitive aroma compounds from garlic (Allium sativum). **Ultrasonics Sonochemistry,** Grécia, 13(1): 54-60.

Li, B. B.; Smith, B.; Hossain, M. M. (2006) Extraction of phenolics from citrus peels II. Enzyme-assisted extraction method. **Separation and Purification Technology,** 48: 189-196.

Lorenzo, D.; Atti-Serafini, L.; Santos, A. C.; Frizzo, C. D.; Paroul, N.; Paz, D.; Dellacassa, E.; Moyna, P. (2000) *Acyrocline satureioides* essential oils from Southern Brazil and Uruguay. **Planta Médica**, 66: 476-477.

Lozhkin, A.V. & Sakanyan, E.I. (2006) Structure of chemical compounds, methods of análisis and process control. **Pharmaceutical Chemistry Journal,** 40(6): 337-346.

MacRae, J.; Yang, Q.; Crawford, R.; Palombo, E. (2007) Review of the methods used for isolating pharmaceutical lead compounds from traditional medicinal plants. **Envirommentalist,** 27: 165-174.

Martins, L.F. (2005) Caracterização do complexo celulásico de *Penicillium echinulatum*. **Dissertação de Mestrado.** Universidade Federal do Paraná. Curitiba, Brasil.

Mechkovski, A. & Akerele, C.O. (1992) **Quality control methods for medicinal plant materials**. WHO/PHARM/92.559. Switzerland: World Health Organization.

Medve J, Karlsson J, Lee D, Tjerneld F. (1998) Hydrolysis of microcrystalline cellulose by cellobiohydrolase I and endoglucanase II from Trichoderma reesei: adsorption, sugar production pattern, and synergism of the enzymes. **Biotechnology and Bioengineering.** 59:621–634.

Mendonça, L. M. V. L.; Conceição, A.; Piedade, J.; Carvalho, V. D.; Theodoro, V. C. A. (2006) Caracterização da composição química e do rendimento dos resíduos

industriais do limão Tahiti (*Citrus latifolia* Tanaka) **Ciência e Tecnologia de Alimentos,** Campinas, 26(4): 870-874.

Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior (2010). **Disponível (online)** http://aliceweb.desenvolvimento.gov.br/ (18 de janeiro).

Mishra, D.; Shukla, A.K.; Dixit, A.K.; Singh, K. (2005) Aqueous enzymatic extraction of oil from mandarin peels. **Journal of Oleo Science.** 54(6): 355-359.

Miyake ,Y.; Murakami, A.; Sugiyama, Y.; Isobe, M.; Koshimizu, K.; Ohigashi, H. J. (1999) Identification of coumarins from lemon fruit *(Citrus limon)* as inhibitors of *in vitro* tumor promotion and superoxide and nitric oxide generation **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 47(8): 3151-3157.

Monteiro, V.F.F.; Mathias L.; Vieira, I.J.C.; Schripsema J.; Braz-Filho, R. (2002) Prenylated coumarins, chalcone and new cinnamic acid and dihydrocinnamic acid derivatives from *Brosimum gaudichaudii*. **Journal of Brazilian Chemical Society,** 13(2): 281-287.

Moraes, R. (2007) Fragrâncias - Espécies vegetais da Amazônia podem abrir mercados sofisticados para a produção local. **Química e Derivados,** 466 p.p.

Moreau, R.A.; Johnston, D.B.; Powell, M.J.; Hicks, K.B. (2004) A comparison of commercial enzymes for the aqueous enzymatic extraction of corn oil from corn germ. **Journal of the American Oil Chemists' Society.** 81(11): 1071-1075.

Ojala, T. (2001) Biological screening of plant coumarins. **Academic Dissertation.** Faculty of Science of the University of Helsinki, Helsinki.

O'kennedy, R. & Thornes, R., D. (Eds; 1997) **Coumarins – Biology, Applications and Mode of Action**, John Wiley & Sons Ltd., Chichester.

Parish, M. E.; Braddock, R. J.; Graumlich, T. R. (1986) Chemical and Microbial Characterization of Citrus Oil-Mill Effluent **Journal of Food Science,** 51(2): 431-433.

Price, S. & Price, L. (2006) **Aromatherapy – for health professionals.** Ed. Chuchill Livingstone, 3a. ed.

Reda, S. Y.; Leal, E. S.; Batista, E. A. C.; Barana, A. C.; Schnitzel, E.; Carneiro, P. I. B. (2005) Caracterização dos óleos das sementes de limão rosa (*citrus limonia* osbeck) e limão siciliano (C*itrus limon*), um resíduo agroindustrial. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, 25(4): 672-676.

Rezzoug, S. A. & Louka, N. (2009) Thermomechanical process intensification for oil extraction 1 from orange peels. **Innovative Food Science and Emerging Technologies** 10(4): 530-536.

Rigon, L.; Corrêa, S.; Reetz, E.; Vencato, A.; Rosa, G.R.; Beling, R.R. (2005) Laranja. **Anuário Brasileiro da Fruticultura**, Santa Cruz do Sul, 1(1): 42-47.

Rocha, A. A. (2006) Obtenção e avaliação das atividades analgésica e antiinflamatória do extrato hidroalcoólico bruto da arnica brasileira (*Solidago microglossa*, DC). **Dissertação de mestrado**, Universidade de Franca.

Rosenthal, A.; Pyle, D.L.; Niranjan, K. (1996) Review: aqueous and enzymatic processes for edible oil extraction. **Enzyme and Microbial Technology,** 19: 402-420.

Ryu, D. D. Y.; Kim, C.; Mandels, M. (1984) Competitive adsorption of cellulase components and its significance in a synergistic mechanism. **Biotechnology and Bioengineering,** 26: 488−496.

Santos, E. (2007) Utilização de enzimas produzidas por *Trichoderma reesei* e *Aspergillus Níger* na extração de óleos essenciais. **Dissertação de Mestrado,** Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho", Araraquara, São Paulo.

Santos, R. I. (2001) Metabolismo básico e origem dos metbólitos secundários. In: Simões, O.M.C.; Schenkel, E.P.; Gosmann, G.; Mello, J.C.P.; Mentz, L.A.; Petrovick, P.R. **Farmacognosia da Planta ao Medicamento.** Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Da Universidade/UFRGS/Ed. Da UFSC, 3. ed., 16: 323-354

Santos, R. D. & Ferrari, R. A. (2005) Extração aquosa enzimática de óleo de soja. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 25(1).

Serafini, L. A.; Santos, A. C. A.; Touguinha, L. A.; Agostini, G.; Dalfovo, V. (2002) Óleos essenciais – Extrações e aplicações de óleos essenciais de plantas aromática e medicinais. **Coleção Biotecnologia**. Editora da Universidade de Caxias do Sul, 16p.p.

Sguissardi, J. C. Z. ; Cansian, R. L. ; Cichoski, A. J. ; Stuart, G. R. ; Richetti, A.; Paroul, N. (2006) Óleos essenciais e extratos residuais da casca de laranja Pera e laranja Valência (Citrus sinensis). **Perspectiva**, Erechim, 30: 109-116.

Sharp, J.T.; Gosney, I.; Rowley, A. G. (1989) **Pratical Organic Chemistry: A student Handbook of Techniques.** London: Chapman and Hall.

Simões, O.M.C.; Schenkel, E.P.; Gosmann, G.; Mello, J.C.P.; Mentz, L.A.; Petrovick, P.R. (2001) **Farmacognosia da Planta ao Medicamento.** Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Da Universidade/UFRGS/Ed. Da UFSC, 3. ed., 323-354.

Simões, O. M. C. & Spitzer, V. (2001) Óleos voláteis. In: Simões, O.M.C.; Schenkel, E.P.; Gosmann, G.; Mello, J.C.P.; Mentz, L.A.; Petrovick, P.R. **Farmacognosia da Planta ao Medicamento.** Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Da Universidade/UFRGS/Ed. Da UFSC. 3. ed., 18: 387-415.

Silva, L. V.; Constancio, S.C. M.; Mendes, M.F.; Coelho, G.L.V (2005) Extração do óleo essencial da pimenta rosa (*schinus molle*) usando hidrodestilação e soxhlet. **VI Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica,** Unicamp, 1(7).

Silva-Santos, A.; Antunes, A. M. S.; Bizzo, H. R.; d'Avila, L. A. (2006) A participação da indústria óleo-citrícola na balança comercial brasileira. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, 8(4): 8-13.

Stanley, W. & Jurd, L. (1971) Citrus coumarins. **Journal of Agricutural and Food Chemistry**, 19(6).

Stuart, G. R. ; Dariva, C.; Oliveira, J. V. (2000) High-pressure vapor-liquid equilibrium data for CO2-Orange Peel Oil. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, São Paulo, 7(1): 181-189.

Trucom, C. Doce Limão. São Paulo (2009) **Disponível (online)** www.decelimao.com.br/limao-origem-variedades.htm (13 de março).

Vassalo, J.D.; Hicks, S.M, Daston; G.P.; McKeeman, L.D. (2004) Metabolic detoxification determines species differences in coumarin-induced hepaotoxicity. **Toxicological Sciences**, 80: 249-257.

Verlet, N. (1993) Commercialization of essential oils and aroma chemicals. In: Silva, K. T. (1995) **A manual on the essential oil industry.** Áustria, 203-232.

Zhang, S. B.; Wang, Z.; Xu, S. Y. (2007) Optimization of the aqueous enzymatic extraction of rapeseed oil and protein hydrolysates. **Journal of the American Oil Chemists' Society,** 84: 97-105.

Ziegler, H. & Spiteller, G.(1992) Coumarins and psoralens from Sicilian lemon oil (*Citrus limon* (L.) Burm. f.) **Flavour and Fragrance Journal**. 7(3): 129-139.

Wang, T.T.; Jin, H.; Li, Q.; Cheng, W.M.; Hu, Q.Q.; Chen, X.H.; Bi, K.S. (2007) Isolation and simultaneous determination of coumarin compounds in radix *Angelica dahurica.* **Chromatographia.** 65 (7/8): 477-481.

Wagner, H. & Bladt, S. (1996) **Plant Drug Analysis: A Thin Layer Cromatography Atlas.** Berlim, Springer-Verlag, 2. ed., 125-147.

Wrege, M. S.; Oliveira, R. P.; Lipp, J. P.; Koller, O. C; Steinmetz, S; Reisser, C. J.; Matzenauer, R. (2006) Zoneamento agroclimático para a produção de limas ácidas e de limões no Rio Grande do Sul. **Embrapa Clima Temperado.** Pelotas, Documentos, 156, 36 p.p.

Wu, T.S.; Shi, L.S.; Wang, J.J.; Iou, S.C.; Chang, H.C.; Chen, Y.P.; Kuo, Y.H.; Chang, Y.L.; Teng, C.M. (2003) Cytotoxic and antiplatelet aggregation principles of *Ruta graveolens*. **Journal of the Chinese Chemical Society.** 50: 171-178.

Yabiku, H. Y. & Lara, W. H. (1986) Técnicas cromatográficas para diferenciação de óleos essenciais cítricos de limão siciliano e tahiti. **Revista do Instituto Adolfo Lutz,** 46: 45-51.

Yamanaka, H. T. (2005) Sucos Cítricos. São Paulo, CETESB, 45p. **Disponível (online)** http://www.cetesb.sp.gov.br (17 de setembro).