**Universidade de São Paulo
Instituto de Química de São Carlos**

Stephano Marques

**Influência de diferentes porta-enxertos na composição química
dos óleos essenciais e do suco de tangerina Fremont IAC 543**

Orientador: Prof. Dr. Stanislaw Bogusz Junior

São Carlos

2019

Stephano Marques

**Influência de diferentes porta-enxertos na composição química
dos óleos essenciais e do suco de tangerina Fremont IAC 543**

Dissertação apresentada ao Instituto de
Química de São Carlos da Universidade de
São Paulo como parte dos requisitos para a
obtenção do título de Mestre em Química.

Área de concentração: Química Analítica e Inorgânica.

Orientador: Prof. Dr. Stanislau Bogusz Junior.

São Carlos

2019

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, a Deus pelas oportunidades, pela inteligência e pela capacidade de superar os desafios que me permitiram chegar até esta etapa de minha vida.

Aos meus pais que contribuíram com a minha estadia na cidade de São Carlos para realizar a pós-graduação e pelo apoio que me deram.

Aos meus amigos do laboratório Renato, Pamela, Lucas, Letícia e Larissa e aos meus amigos vigilantes Ivan e Marcio pela companhia, ideias e distrações que tornaram este período muito mais agradável e divertido.

Ao Prof. Dr. Stanislaw Bogusz Junior por ter me aceitado como aluno e pela orientação e suporte que me ofereceu durante o trabalho.

Aos Professores do Grupo de Química Inorgânica e Analítica e ao pessoal da Central Analítica – CAQI, por disponibilizarem os equipamentos necessários para realização deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq (processo nº 134764/2016-1) pela bolsa fornecida.

“O que você precisa, acima de tudo, é amor por aquilo que você faz, o que quer que seja. Você deve ser tão apaixonado por aquilo que, quando um obstáculo surgir, você tenha energia suficiente para passar por ele”.

Neil deGrasse Tyson

RESUMO

A variedade de tangerina Fremont IAC 543 é um híbrido originária do cruzamento das tangerinas Clementina e Ponkan e, em nosso país, pode ser cultivada em diferentes porta-enxertos. O objetivo desta pesquisa foi investigar a influência de diferentes porta-enxertos (limão Cravo, citrumelo Swingle, trifoliata e trifoliata *Flying Dragon*) na composição química dos óleos essenciais e dos voláteis do suco integral de tangerinas Fremont IAC 543. Os óleos essenciais da casca dos frutos foram obtidos por hidrodestilação, e variaram de 0,36 a 0,47% (v/m), sendo que a tangerina cultivada em porta-enxerto trifoliata *Flying Dragon* foi a que apresentou menor rendimento de óleo essencial. A caracterização química dos óleos essenciais foi realizada por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS) e a semi-quantificação dos componentes dos óleos essenciais foi realizada por cromatografia gasosa acoplada a detector de ionização em chama (GC-FID). Os compostos majoritários dos óleos essenciais das variedades estudadas foram limoneno, linalol e mirceno, os quais são responsáveis por mais de 95% da área relativa dos componentes dos óleos essenciais. Devido à maior produtividade do porta-enxerto citrumelo Swingle (18 L ha⁻¹), este é o mais indicado para produção de óleo essencial de tangerina Fremont IAC 543. Para a caracterização dos voláteis presentes no suco integral da tangerina Fremont IAC 543 foi realizada a otimização multivariada da extração dos voláteis do suco por microextração em fase sólida de headspace (HS-SPME). Encontrou-se que a melhor condição para a extração dos voláteis consistiu no uso de fibra de divinilbenzeno/polidimetilsiloxano (DVB/PDMS), temperatura de extração de 43 °C e tempo de extração de 31 min. Os principais compostos voláteis dos sucos integrais estudados foram o limoneno, mirceno, linalol, decanal e α -pineno, havendo bastante variação na composição dos voláteis dos sucos integrais de acordo com o porta-enxerto utilizado. As análises por Ressonância Magnética Nuclear revelaram que os sucos das quatro amostras investigadas possuem perfis complexos, porém semelhantes. A tangerina cultivada com porta-enxerto de limão Cravo apresentou maiores quantidades de ácido málico e tirosina. A tangerina enxertada com Citrumelo Swingle apresentou maiores quantidades de ácido cítrico e etanol. A variedade plantada sobre o porta-enxerto de trifoliata apresentou maiores quantidades de alanina, glicose e sacarose. A amostra cultivada em porta-enxerto de trifoliata *Flying Dragon* apresentou menor quantidade de etanol. Através da análise de componentes principais foi possível diferenciar as amostras a partir de seus componentes de óleo essencial e compostos voláteis e não-voláteis do suco integral de cada variedade cultivada nos diferentes porta-enxertos.

ABSTRACT

The Fremont IAC 543 mandarin variety is a hybrid from the crossing of the Clementina and Ponkan mandarins and it can be grown on different rootstocks in Brazil. The objective of this research was to investigate the influence of different rootstocks (Rangpur lemon, Swingle citrumelo, trifoliolate and Flying Dragon trifoliolate) on the chemical composition of the essential oils and volatiles of the Fremont IAC 543 mandarin. The essential oils from the fruit peels were obtained by hydrodistillation, and ranged from 0.36 to 0.47% (v/w) and the mandarin cultivated in Flying Dragon trifoliolate rootstock showed the lowest essential oil yield. The chemical characterization of the essential oils was performed by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS) and the semi-quantification of essential oil components was performed by gas chromatography coupled to a flame ionization detector (GC-FID). The major essential oils compounds were limonene, linalool, and myrcene, which were responsible for more than 95% of the essential oil components. Due to the higher productivity of the citrumelo Swingle rootstock (18 L ha⁻¹), this was the most suitable rootstock for the Fremont IAC 543 mandarin essential oil production. Aiming the characterization of the Fremont IAC 543 mandarin juice volatiles compounds, a multivariate optimization of juice volatiles extraction by headspace solid phase microextraction (HS-SPME) was performed. It was found that the best volatile extraction conditions were the use of divinylbenzene/polydimethylsiloxane (DVB/PDMS) fiber, 43 ° C for extraction temperature and 31 min for extraction time. The main volatile compounds of the whole juices studied were limonene, myrcene, linalool, decanal and α -pinene. It is possible to see a considerable variation in the volatile composition of whole juices according to the rootstock used. Nuclear Magnetic Resonance spectras showed that the juices of the four samples analyzed had complex but similar profiles. Tangerine cultivated with Rangpur lemon rootstock showed higher values of malic acid and tyrosine. Tangerine growth in citrumelo Swingle showed higher amounts of citric acid and ethanol. The variety planted on the rootstock of trifoliolate showed higher amount of alanine, glucose and sucrose. The sample cultivated on the Flying Dragon trifoliolate rootstock showed less ethanol. Through the principal component analysis, it was possible to differentiate the samples using their essential oil components and volatile and non-volatile compounds from the integral juice of each variety planted in different rootstocks.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Produção brasileira de tangerinas (2016).....	15
Figura 2. Principais estados brasileiros produtores de tangerinas.....	16
Figura 3. Biossíntese dos compostos isopentenil pirofosfato e dimetilalil pirofosfato.....	18
Figura 4. Formação de geranyl pirofosfato a partir de isopentenil pirofosfato e dimetilalil pirofosfato.....	19
Figura 5. Biossíntese de alguns monoterpenoides.....	20
Figura 6. Biossíntese de alguns sesquiterpenoides.....	22
Figura 7. Biossíntese de lipídeos e policetídeos.....	23
Figura 8. Fragmentação de um ácido graxo poliinsaturado gerando aldeídos.....	24
Figura 9. Rota biossintética do ácido chiquímico.....	26
Figura 10. Compostos derivados do ácido corísmico presentes em alguns óleos essenciais.....	27
Figura 11. Processo de enxertia em citros por borbulhia em T invertido.....	31
Figura 12. Sistema de hidrodestilação do tipo Clevanger modificado utilizado para a obtenção dos óleos essenciais.....	33
Figura 13. Sistema para extração de voláteis do suco fresco de tangerina por HS-SPME utilizando béquer encamisado com circulação de água, para controle de temperatura.....	35
Figura 14. Fotografia dos frutos de tangerina Fremont IAC 543 cultivadas em diferentes porta-enxertos. A= limão Cravo; B= citrumelo Swingle; C= trifoliata; D= trifoliata <i>Flying Dragon</i>	38
Figura 15. Rendimento de óleo essencial, em mL de óleo por 100 g de amostra (casca), obtido via hidrodestilação das tangerinas Fremont IAC 543 cultivadas em diferentes porta-enxertos.....	39

Figura 16. Cromatograma por GC-FID do óleo essencial da tangerina Fremont IAC 543 porta-enxertada em Limão Cravo. Em destaque: 1. α -pineno; 2. sabineno; 3. mirceno; 4. octanal; 5. limoneno; 6. linalol; 7. citronelal; 8. terpinen-4-ol; 9. isocarveol; 10. decanal; 11. perilal.....	44
Figura 17. Capacidade de extração das fibras de SPME de DVB/PDMS, DVB/CAR/PDMS, CAR/PDMS, PDMS e PA, na extração dos compostos voláteis do suco fresco das tangerinas. O resultado é expresso como média das triplicatas de área total do cromatograma, obtidas no GC-FID.	46
Figura 18. Diagrama de Pareto dos efeitos das variáveis estudadas no procedimento de extração dos voláteis em suco fresco de tangerina por SPME. Resposta: área total, 2 fatores, 1 bloco, 11 experimentos, erro puro $1,86E+15$	48
Figura 19. Superfície de resposta obtida pelo modelo quadrático: $z = 1,14E+09 + 1,97E+08*x - 9,03E+07*x^2 + 1,44E+08*y$, para a otimização das condições de temperatura de extração (x, °C) e tempo de extração (y, min) dos voláteis de suco integral de tangerina por HS-SPME e resposta área total do cromatograma.....	48
Figura 20. Cromatograma do suco fresco de tangerinas Fremont IAC 543 porta-enxertada com limão Cravo por GC-MS. Em destaque: 1. mirceno; 2. limoneno (omitido na corrida); 3. linalol; 4. decanal; 5. valenceno.....	54
Figura 21. Espectro de ressonância magnética nuclear de 1H 600 MHz do suco integral de tangerinas Fremont IAC 543 cultivada em diferentes porta-enxertos. Região de deslocamento químico de 0,8 a 5,8 ppm.....	56
Figura 22. Espectro de ressonância magnética nuclear de 1H 600 MHz do suco integral de tangerinas Fremont IAC 543 cultivada em diferentes porta-enxertos. Região de deslocamento químico de 6,0 a 10,0 ppm.....	57
Figura 23. Espectro de ressonância magnética nuclear de 1H 600 MHz do suco integral de tangerinas Fremont IAC 543 porta-enxertada com limão Cravo. Região de deslocamento químico de 1 a 2,5 ppm.....	58

Figura 24. Espectro de ressonância magnética nuclear de ^1H 600 MHz do suco integral de tangerinas Fremont IAC 543 porta-enxertada com limão Cravo. Região de deslocamento químico de 1 a 5,5 ppm.....	58
Figura 25. Espectro de ressonância magnética nuclear de ^1H 600 MHz do suco integral de tangerinas Fremont IAC 543 porta-enxertada com limão Cravo. Região de deslocamento químico de 6,5 a 9 ppm.....	59
Figura 26. Gráfico de <i>Scores</i> das duas primeiras componentes principais (PC1 e PC2) da PCA dos óleos essenciais das Tangerinas Fremont IAC 543 porta-enxertadas com limão Cravo (1, 2 e 3), citrumelo Swingle (4, 5 e 6) trifoliata (7, 8 e 9) e trifoliata <i>Flying Dragon</i> (10, 11 e 12).....	62
Figura 27. Gráfico de <i>Loadings</i> das duas primeiras componentes principais (PC1 e PC2) da PCA dos óleos essenciais das Tangerinas Fremont IAC 543 plantadas em diferentes porta-enxertos.....	62
Figura 28. Gráfico de <i>Scores</i> das duas primeiras componentes principais (PC1 e PC2) da PCA dos compostos voláteis dos sucos integrais das Tangerinas Fremont IAC 543 porta-enxertadas com limão Cravo (1, 2 e 3), citrumelo Swingle (4, 5 e 6) trifoliata (7, 8 e 9) e trifoliata <i>Flying Dragon</i> (10, 11 e 12).....	63
Figura 29. Gráfico de <i>Loadings</i> das duas primeiras componentes principais (PC1 e PC2) da PCA dos compostos voláteis dos sucos integrais das Tangerinas Fremont IAC 543 plantadas em diferentes porta-enxertos.....	64
Figura 30. Gráfico de <i>Scores</i> das duas primeiras componentes principais (PC1 e PC2) da PCA dos compostos não voláteis identificados por RMN presentes nos sucos integrais das Tangerinas Fremont IAC 543 porta-enxertadas com limão Cravo (1, 2 e 3), citrumelo Swingle (4, 5 e 6) trifoliata (7, 8 e 9) e trifoliata <i>Flying Dragon</i> (10, 11 e 12).....	65
Figura 31. Gráfico de <i>Loadings</i> das duas primeiras componentes principais (PC1 e PC2) da PCA dos compostos não voláteis identificados por RMN presentes nos sucos integrais das Tangerinas Fremont IAC 543 plantadas em diferentes porta-enxertos.....	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Estrutura química e descritores de odor de alguns compostos presentes em óleo essencial de <i>Citrus reticulata</i> Blanco.....	29
Tabela 2. Fatores, níveis e domínio experimental das condições aplicadas para otimizar a extração por HS-SPME do suco integral de tangerina.....	36
Tabela 3. Experimentos realizados no delineamento composto central na etapa de otimização das condições de extração dos compostos voláteis em suco integral de tangerina por HS-SPME.....	36
Tabela 4. Produtividade em kg de fruto por hectare, rendimento de casca do fruto, kg de casca por hectare, percentagem de óleo essencial e produtividade de óleo essencial por hectare das tangerinas Fremont IAC 543 cultivadas em diferentes porta-enxertos.....	39
Tabela 5. Composição química e % relativa dos óleos essenciais das tangerinas Fremont IAC 543 cultivadas em diferentes porta-enxertos.....	41
Tabela 6. Condições experimentais e valores da resposta área total obtidos no delineamento composto central rotacional na etapa de otimização das condições de extração dos compostos voláteis em suco integral de tangerina por HS-SPME com fibra DVB/PDMS.....	46
Tabela 7. Análise da variância (ANOVA) pelo método dos mínimos quadrados, para a resposta área total do cromatograma e os parâmetros temperatura e tempo de extração dos compostos voláteis de suco de tangerina por HS-SPME com a fibra DVB/PDMS.....	47
Tabela 8. Compostos voláteis identificados em suco fresco de tangerinas Fremont IAC 543 cultivadas em diferentes porta-enxertos por HS-SPME e GC-MS.....	51
Tabela 9. Compostos não voláteis identificados em suco fresco de tangerina Fremont IAC 543 cultivadas em diferentes porta-enxertos por RMN ¹ H 600 MHz.....	59

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADP: adenosina difosfato;

ANOVA: *analysis of variance* (Análise de Variância);

ATP: adenosina trifosfato;

Calc.: calculado;

CAR: carbonxeno;

CDP-ME: 4-difosfocitidil-2C-metil-D-eritrol;

CDP-MEP: 4-difosfocitidil-2C-metil-D-eritritol-2-fosfato;

CMK: 4-difosfocitidil-2C-metil-D-eritrol quinase;

CTP: citidina trifosfato;

DMAPP: dimetilalil pirofosfato;

DAHP: 3-desoxi-D-arabinoheptulosonato 7-fosfato;

DCCR: delineamento composto central rotacional;

DMAPP: dimetilalil pirofosfato;

DOXP: 1-deoxi-D-xilulose-5-fosfato;

DVB: divinilbenzeno;

DXR: 1-deoxi-D-xilulose-5-fosfato redutoisomerase;

DXS: 1-deoxi-D-xilulose-5-fosfato sintase;

E4P: eritrose-4 fosfato;

EPSP: 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato;

FAO: *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura);

FID: *flame ionization detector* (Detector de Ionização em Chama);

FPP: farnesil pirofosfato;

GC: *gas chromatography* (Cromatografia a Gás);

GPP: geranil pirofosfato;

HCA: *hierarchical cluster analysis* (análise de agrupamentos hierárquicos);

HDR: 1-hidroxi-2-metil-2-(E)-butenil-4-difosfato redutase;

HDS: 1-hidroxi-2-metil-2-(E)-butenil-4-difosfato sintase;

HMBPP: 1-hidroxi-2-metil-2-(E)-butenil-4-difosfato;

HMG-CoA: β -hidroxi- β -metil-glutaril-CoA;

HS: *headspace*;

IAC: Instituto Agronômico de Campinas;

IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística;

IEA: Instituto de Economia Agrícola;

IPP: isopentenil pirofosfato;

IQSC: Instituto de Química de São Carlos;

ISO: *International Organization for Standardization* (Organização Internacional de Normalização);

LTPRI: *linear temperature programmed retention index* (índice de retenção de temperatura linear programada);

MCT: 2C-metil-D-eritrol-4-fosfato citidina transferase;

MEcPP: 2C-metil-D-eritritol-2,4-ciclodifosfato;

MEP: 2C-metil-D-eritrol-4-fosfato;

MQ_{ep}: média quadrática do erro puro;

MQ_{faj}: média quadrática da falta de ajuste;

MQ_R: média quadrática da regressão;

MQ_r: média quadrática do resíduo;

MS: *mass spectrometry* (espectrometria de massas);

MVA: ácido mevalônico;

NADPH: hidronicotinamida adenina dinucleótido fosfato;

NIST: *National Institute of Standards and Technology* (Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia);

PA: poliacrilato;

PCA: *pricipal components analysis* (análise de componentes principais);

PDMS: polidimetilsiloxano;

PEP: fosfoenolpiruvato;

PTFE: politetrafluoretileno;

RMN: ressonância magnética nuclear;

SEBRAE: Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas;

SPME: *solid phase microextraction* (microextração em fase sólida);

Teor.: teórico;

TF: Tangerina Fremont;

tr: nível traço (< 0,01 %);

TSP: *trimethylsilylpropanoic acid* (ácido trimetilsililpropanoico);

UHT: *ultra-high temperature* (temperatura ultra-alta);

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
1.1 Química dos óleos essenciais	16
1.1.1 Vias biossintéticas de formação de óleos essenciais	17
1.1.2 Componentes dos óleos essenciais derivados de terpenoides	19
1.1.5 Componentes dos óleos essenciais derivados de lipídeos.....	22
1.1.6 Componentes dos óleos essenciais derivados do ácido chiquímico	25
1.1.7 Óleos essenciais de tangerina	28
1.2 Suco integral de tangerinas	29
1.3 Tangerina Fremont IAC 543.....	30
2. OBJETIVOS	32
2.1 Objetivo geral.....	32
2.2 Objetivos específicos.....	32
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	32
3.1 Amostras de tangerina	32
3.2 Obtenção dos óleos essenciais de tangerina	33
3.3 Análise dos óleos essenciais de tangerina por GC-FID e GC-MS.....	34
3.4 Análise dos voláteis do suco fresco de tangerina.....	34
3.4.1 Obtenção do suco de tangerina recém-espremido (suco fresco).....	34
3.4.2 Extração dos voláteis do suco fresco de tangerina por HS-SPME.....	34
3.5 Estratégia de otimização da extração dos voláteis do suco fresco de tangerina por HS-SPME	36
3.6 Análise dos voláteis do suco fresco de tangerina por GC-MS	37
3.7 Análise dos compostos não voláteis do suco fresco de tangerina por RMN	37
3.8 Análises quimiométricas.....	38
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
4.1 Rendimento e produtividade de óleos essenciais segundo os diferentes porta-enxertos	38
4.2 Análise dos óleos essenciais por GC-FID E GC-MS	40
4.3 Otimização da extração dos voláteis do suco recém-espremido de tangerinas IAC 543 por HS-SPME	45
4.4 Voláteis do suco fresco das tangerinas Fremont IAC 543 por GC-MS	49
4.5 Análise dos compostos não voláteis no suco fresco das Tangerinas Fremont IAC 543 por RMN.....	55
4.6 Análises quimiométricas.....	61
5. CONCLUSÕES	66
6. REFERÊNCIAS.....	67

1. INTRODUÇÃO

A tangerina (*Citrus reticulata* Blanco), também popularmente chamada bergamota ou mexerica, é uma fruta cítrica de origem asiática. A árvore que produz este fruto possui boa adaptação em regiões de clima tropical e subtropical, sendo bem adaptada ao clima brasileiro (Dugo & Di Giacomo, 2002). Algumas das variedades mais populares no Brasil são as tangerinas Cravo, Dancy, Ponkan e Fremont, as mexericas Rio e Montenegrina e o tangor Murcote (IEA, 2014). O valor nutricional das tangerinas depende da variedade, mas segundo a Tabela Brasileira de Composição de Alimentos 4ª edição (2011), o consumo de 100 g de mexerica da variedade Rio, fornece 37 kcal, 0,7 g de proteína, 9,3 g de carboidratos, 2,7 g de fibras, 17 mg de cálcio, 8 mg de magnésio, 14 mg de fósforo, 125 mg de potássio e 112 mg de vitamina C (TACO, 2011). Além disso, o consumo de tangerina fornece também uma série de compostos bioativos com propriedades antioxidantes como carotenoides e fenólicos (Putnik et al., 2017).

O Brasil é considerado o sexto maior produtor mundial de tangerinas, com cerca de 49 mil hectares de área plantada, e com produção no ano de 2016 de aproximadamente 998 mil toneladas. Nas regiões sudeste e sul encontra-se mais de 94% (Figura 1) da produção nacional de tangerinas (FAO, 2018; IBGE, 2018).

Figura 1. Produção brasileira de tangerinas (2016).

Fonte: Adaptado de IBGE, 2018.

Os estados de São Paulo (35 %), Minas Gerais (21 %), Paraná (17 %) e Rio Grande do Sul são os principais responsáveis pela produção da fruta no país (Figura 2) (IBGE, 2018). A cultura de tangerineiras desempenha um importante papel socioeconômico, pois seu cultivo gera um grande número de empregos diretos no país, considerando apenas a produção da fruta *in natura*. Além disso, o setor também emprega uma grande quantidade de mão de obra na indústria que processa os frutos para obtenção de suco, néctar, refresco, óleos essenciais, essência aquosa, essência oleosa, semente e bagaço (IEA, 2014).

Figura 2. Principais estados brasileiros produtores de tangerinas.

Fonte: Adaptado de IBGE, 2018

1.1 Química dos óleos essenciais

Óleos essenciais são definidos como o produto obtido a partir de uma matéria-prima de origem vegetal, por destilação com água ou vapor d'água em um alambique, ou por prensagem mecânica do epicarpo de frutas cítricas em temperatura ambiente, ou ainda por destilação a seco (Bicchi & Joulain, 2018). Após a sua obtenção, os óleos essenciais são separados da fase aquosa por meio de métodos físicos como a decantação. Os óleos essenciais geralmente são translúcidos e incolores. Devido ao fato de serem ricos em metabólitos secundários, principalmente mono e sesquiterpenos, são solúveis em solventes orgânicos e normalmente apresentam densidade menor que a da água. Geralmente, apresentam dois ou três compostos majoritários em concentração entre 20 e 70%, e até centenas de compostos minoritários (Palazzolo et al., 2013).

Fatores genéticos relacionados à planta são determinantes na composição química dos óleos essenciais, contudo a idade da planta, estágio de desenvolvimento, enxertia e estímulos do ambiente tais como temperatura, pluviosidade, luminosidade, nutrição e interações da planta com outros organismos podem redirecionar certas rotas metabólicas levando a produção de óleos essenciais com diferentes composições (Dugo et al., 2012; Dugo et al., 2011; Morais, 2009).

1.1.1 Vias biossintéticas de formação de óleos essenciais

Os constituintes químicos dos óleos essenciais de uma planta são metabólitos secundários, derivados principalmente de uma das três rotas metabólicas: i) via do mevalonato, ii) via do 2C-metil-D-eritritol fosfato (MEP) e iii) via do ácido chiquímico. Enquanto os dois primeiros resultam na formação de terpenoides, a última produz fenilpropenos (Baser, 2016). Todos os isoprenoides possuem os mesmos precursores, isto é, o isopentenil pirofosfato (IPP) e seu isômero dimetilalil pirofosfato (DMAPP) (Eberl et al., 2003). Estes precursores podem ser gerados a partir de duas vias, conforme ilustrado na Figura 3.

Na primeira via biossintética, inicialmente ocorre a formação da 1-deoxi-D-xilulose-5-fosfato (DOXP) através da condensação de um piruvato com um gliceraldeído 3-fosfato pela ação da enzima 1-deoxi-D-xilulose-5-fosfato sintase (DXS). Em seguida, a molécula de DOXP é convertida em 2C-metil-D-eritrol-4-fosfato (MEP) pelo rearranjo e redução assistidos pela enzima 1-deoxi-D-xilulose-5-fosfato redutoisomerase (DXR). Na sequência, ocorre uma reação, catalisada pela enzima 2C-metil-D-eritrol-4-fosfato citidina transferase (MCT), entre o MEP e uma unidade de citidina trifosfato (CTP) resultando na molécula de 4-difosfocitidil-2C-metil-D-eritrol (CDP-ME). Esta é então fosforilada pela enzima 4-difosfocitidil-2C-metil-D-eritrol quinase (CMK) transformando-a em 4-difosfocitidil-2C-metil-D-eritritol-2-fosfato (CDP-MEP), a qual gera uma molécula de 2C-metil-D-eritritol-2,4-ciclodifosfato (MEcPP) pela ação enzimática da MEcPP sintase. Na etapa seguinte a enzima 1-hidroxi-2-metil-2-(E)-butenil-4-difosfato sintase (HDS) reduz o MEcPP a 1-hidroxi-2-metil-2-(E)-butenil-4-difosfato (HMBPP). Por fim, a ação enzimática da 1-hidroxi-2-metil-2-(E)-butenil-4-difosfato redutase (HDR) converte o HMBPP em DMAPP e IPP (Hunter, 2007; Eberl, 2003).

Na segunda via biossintética, duas unidades de acetil-coenzima A (acetil-CoA) são unidas formando uma unidade de acetoacetil-CoA por ação da enzima β -hidroxi- β -metil-

glutaril-CoA (HMG-CoA) sintase. Em seguida, analogamente a uma reação aldólica, a unidade de acetoacetyl-CoA reage com uma unidade de acetyl-CoA, auxiliada pela mesma enzima anterior, gerando uma unidade HMG-CoA, a qual sofre uma redução enzimática, pela enzima HMG-CoA reductase, em presença de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) transformando-a em ácido mevalônico, que em sequência é reduzido, novamente por ação da enzima HMG-CoA reductase, em ácido mevalônico (MVA). Por fim, o ácido mevalônico é fosforilado em presença de adenosina trifosfato (ATP), assistida das enzimas MVA quinase e mevalonato 5-fosfato quinase, e, em seguida, descarboxilado e desidratado resultando no IPP (Hashemi, Khaneghah e Sant'Ana, 2018; Breitmaier, 2006).

Figura 3. Biossíntese dos compostos isopentenil pirofosfato e dimetilalil pirofosfato.

ADP: adenosina difosfato; ATP: adenosina trifosfato; CDP-ME: 4-difosfocitidil-2C-metil-D-eritrol; CDP-MEP: 4-difosfocitidil-2C-metil-D-eritritol-2-fosfato; CMK: 4-difosfocitidil-2C-metil-D-eritrol quinase; CTP: citidina trifosfato; DMAPP: dimetilalil pirofosfato; DOXP: 1-deoxi-D-xilulose-5-fosfato; DXR: 1-deoxi-D-xilulose-5-fosfato redutoisomerase; DXS: 1-deoxi-D-xilulose-5-fosfato sintase; HDR: 1-hidroxi-2-metil-2-(E)-butenil-4-difosfato redutase; HDS: 1-hidroxi-2-metil-2-(E)-butenil-4-difosfato sintase; HMBPP: 1-hidroxi-2-metil-2-(E)-butenil-4-difosfato; HMG-CoA: β -hidroxi- β -metil-glutaril-CoA; IPP: isopentenil pirofosfato; MCT: 2C-metil-D-eritritol-4-fosfato citidina transferase; MEcPP: 2C-metil-D-eritritol-2,4-ciclodifosfato; MEP: 2C-metil-D-eritritol-4-fosfato; MVA: ácido mevalônico; NADPH: hidronicotinamida adenina dinucleótido fosfato. Fonte: Adaptado de Hashemi, Khaneghah & Sant'Ana, 2018; Breitmaier, 2006; Hunter, 2007; Eberl, 2003.

1.1.2 Componentes dos óleos essenciais derivados de terpenoides

Uma vez que o IPP e o DMAPP são formados, estes podem sofrer condensações que vão originar geranyl pirofosfato (GPP), um terpenoide de 10 carbonos. O GPP pode reagir novamente com outras unidades de IPP originando compostos com esqueletos carbonados múltiplos de 5 (Figura 4). Dependendo do número de subunidades de isopreno presentes na molécula ela pode ser classificada como: *hemi* (C₅), *mono* (C₁₀), *sesqui* (C₁₅), *di* (C₂₀), *ses* (C₂₅), *tri* (C₃₀), *tetra* (C₄₀) e politerpenos (C₅)_n, onde n é um número superior a 8. A forma de acoplamento das unidades de isopreno para os terpenoides de até 20 carbonos (diterpenos) é conhecida como acoplamento cabeça-cauda, na qual a extremidade ramificada da cadeia é referida como a cabeça da molécula e a outra como a cauda. No caso dos tri e tetraterpenos o acoplamento realizado é do tipo cauda-cauda (Baser & Buchbauer, 2010; Breitmaier, 2006).

Figura 4. Formação de geranyl pirofostato a partir de isopentenil pirofosfato e dimetilalil pirofosfato.

IPP: isopentenil pirofosfato; DMAPP: dimetilalil pirofosfato; GPP: geranyl-pirofosfato sintase; FPP: farnesil pirofosfato sintase; PP: pirofosfato. Fonte: Adaptado de Baser & Buchbauer, 2010; Breitmaier, 2006.

1.1.3 Monoterpenoides

O GPP é o precursor dos monoterpénoides. A heterólise de sua ligação carbono-oxigênio origina o geranyl carbocátion (Figura 5). Para simplificar, este e outros carbocátions, os quais serão mencionados mais adiante, não existem como íons livres nas células, mas sim como carbocátions incipientes mantidos em sítios ativos de enzimas. As reações de formação dos terpenoides são descritas em termos químicos, contudo todas estão sob controle enzimático e, portanto, os monoterpénoides presentes em qualquer planta são formados de acordo com as enzimas que a planta possui. Assim, a composição do óleo essencial pode fornecer informações sobre a composição genética da planta (Baser & Buchbauer, 2010).

Figura 5. Biossíntese de alguns monoterpénoides.

Fonte: Adaptado de Baser & Buchbauer, 2010.

A reação do geranil carbocátion em presença de água dá origem ao geraniol que pode ser oxidado posteriormente em citral. A perda de um próton do geranil carbocátion origina o mirceno, o qual pode ser isomerizado para outros hidrocarbonetos acíclicos. Uma reação de adição eletrofílica intramolecular do geranil carbocátion gera o carbocátion monocíclico mentil carbocátion, que pode perder um próton originando o limoneno ou em presença de água formar o α -terpineol. Uma segunda adição intramolecular resulta no pinil carbocátion, que pode perder um próton para dar origem ao α -pineno ou β -pineno. Outras reações possibilitam a formação de monoterpenoides variados como o neral, α -tujeno, α -felandreno, borneol, cânfora e fenchona. A hidrólise simples do geranil pirofosfato produz o geraniol (Zebec et al, 2016; Andrew, Keszei e Foley, 2013; Baser & Buchbauer, 2010).

1.1.4 Sesquiterpenoides

Os sesquiterpenoides possuem 15 átomos de carbono, o que resulta em menores volatilidades e, portanto, em pontos de ebulição mais altos se comparados aos monoterpenoides. Assim como o geranil carbocátion é o precursor de todos os monoterpenoides, o farnesil carbocátion é o precursor de todos os sesquiterpenoides. Seu pirofosfato é sintetizado pela adição de uma unidade de IPP ao GPP e sua hidrólise produz o farnesil carbocátion (Figura 6). Diversos tipos de reações, como degradação, oxidação e rearranjo, permitem que o farnesil carbocátion produza uma grande variedade de sesquiterpenoides, da mesma forma como o GPP faz com os monoterpenoides (Hashemi, Khaneghah e Sant'Ana, 2018; Baser & Buchbauer, 2010).

A hidrólise direta do farnesil carbocátion leva a sesquiterpenoides acíclicos, como farnesol e nerolidol. No entanto, a captura do carbocátion pela ligação dupla na posição 6 gera uma estrutura cíclica denominada de bisabolil carbocátion. A extinção do bisabolil carbocátion em presença de água dá origem ao bisabolol. Uma ampla variedade de compostos pode ser gerada ao longo desta rota, como o nootkatona, α -humuleno, cedrol, β -eudesmol, α -ciperona e cariofileno. O cariofileno e o α -humuleno muito difundidos na natureza. A nootkatona por sua vez é um isômero da alfa-vetivona que é um importante componente de odor da toranja (Baser & Buchbauer, 2010; Berger, 2007).

Figura 6. Biossíntese de alguns sesquiterpenoides.

Fonte: Adaptado de Baser & Buchbauer, 2010.

1.1.5 Componentes dos óleos essenciais derivados de lipídeos

Os componentes dos óleos essenciais derivados de lipídeos podem ser biossintetizados quando um acetil-CoA é carboxilado para gerar um malonil-CoA. O ânion

deste malonil-CoA reage então com um éster CoA de um ácido graxo, que por uma reação de descaboxilação gera um β -acetoéster com uma cadeia principal que apresenta dois átomos de carbono a mais que o seu precursor (Baser & Buchbauer, 2010).

Uma vez que os ácidos graxos são produzidos por esta rota, isso explicaria por que a maior parte deles possuem números pares de átomos de carbono. A partir deste ponto, duas possibilidades podem ocorrer. A reação com o malonil pode ser repetida formando um poli-oxo-ácido, o qual terá um grupo carbonila em cada átomo de carbono recebendo a denominação de policetídeo. Alternativamente, pode ocorrer a redução da função cetona em seu álcool correspondente, seguida de uma eliminação e hidrogenação da ligação dupla. Esta sequência de reações resulta em um homólogo maior que o ácido graxo inicial, contendo dois átomos de carbono a mais na cadeia carbonada (Figura 7). O produto desta rota biossintética são os ácidos graxos saturados ou insaturados (Baser & Buchbauer, 2010).

Figura 7. Biossíntese de lipídeos e policetídeos.

Fonte: Adapado de Baser & Buchbauer, 2010.

Componentes dos óleos essenciais formados a partir de ácidos graxos geralmente estão relacionados a uma β -oxidação e uma clivagem gerando um acetato e um ácido graxo com dois átomos de carbono a menos do que o ácido graxo precursor, isto é, ocorre o processo inverso da reação de biossíntese de ácidos graxos. No entanto, existem outras vias de oxidação de ácidos graxos as quais podem dar origem a novos metabólitos que constituirão componentes dos óleos essenciais. Por exemplo, a Figura 8 ilustra como a oxidação alílica de um ácido dienóico seguida de uma clivagem leva à formação de um aldeído. A oxidação alílica seguida de lactonização em vez de clivagem pode resultar em lactonas que também podem estar presentes nos óleos essenciais. A redução da função ácida para os álcoois ou aldeídos correspondentes também é possível, assim como as reações de hidrogenação e eliminação. Assim, uma ampla variedade de compostos alifáticos pode ser formada (Baser & Buchbauer, 2010).

Figura 8. Fragmentação de um ácido graxo poliinsaturado gerando aldeídos.

Fonte: Adapado de Baser & Buchbauer, 2010.

1.1.6 Componentes dos óleos essenciais derivados do ácido chiquímico

O ácido chiquímico foi descoberto em 1885 por Eykman e tem seu nome derivado da planta japonesa *shikimi* (*Illicium anisatum*). É um importante composto para o metabolismo das plantas, uma vez que está relacionado ao metabolismo de carboidratos e é precursor para a lignina, para compostos fenólicos, em especial os flavonoides, bem como de aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina e triptofano) (Tzin et al., 2015; Tamborra et al., 2014; Kougan et al., 2013; Ghosh, Chisti e Banerjee, 2012; Jiang & Singh, 1998). A via do ácido chiquímico (Figura 9) possui sete etapas de formação e deriva da rota dos carboidratos, uma vez que sua síntese é iniciada pela condensação do fosfoenolpiruvato (PEP) com eritrose-4 fosfato (E4P), assistida pela enzima 3-desoxi-D-arabinoheptulose 7-fosfato (DAHP) sintase. Em seguida, a molécula de DAHP, por ação de outras três enzimas, é convertida em ácido chiquímico. Na etapa seguinte, o ácido chiquímico é convertido em chiquimato-3-fosfato pela ação da enzima chiquimato quinase. Na sequência, o chiquimato-3-fosfato é transformado em 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato (EPSP) e, em seguida, em ácido corísmico, respectivamente pelas enzimas EPSP sintase e corismato sintase. (Kougan et al., 2013; Ghosh, Chisti e Banerjee, 2012).

Formas ativas dos ácidos chiquímico e corísmico em presença da coenzima A podem originar alguns dos compostos comumente encontrados em óleos essenciais (Figura 10) (Kougan et al., 2013; Baser & Buchbauer, 2010; Kuete, 2013).

Figura 9. Rota biossintética do ácido chiquímico.

DAHP: 3-desoxi-D-arabinoheptulose-7-fosfato; E4P: eritrose-4-fosfato; EPSP: 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato; PEP: fosfoenolpiruvato. Fonte: Adaptado de Kougan et al., 2013; Ghosh, Chisti e Banerjee, 2012.

Figura 10. Compostos derivados do ácido corísmico presentes em alguns óleos essenciais.

Fonte: Adaptado de Kougan et al., 2013; Baser & Buchbauer, 2010.

1.1.7 Óleos essenciais de tangerina

Quanto à composição química, nos óleos essenciais de citros podemos encontrar principalmente monoterpenos, sesquiterpenos e seus derivados oxigenados, os quais incluem álcoois, aldeídos, ésteres, ácidos e cetonas (Asikin et al., 2018; Palazzolo et al., 2013). Normalmente, em frutas cítricas o composto majoritário é o limoneno, cujo teor pode variar de 65 a 75% em tangerinas, de 56 a 78% em limões [*Citrus limon* (L.) Brum. F.] e de 92 a 97% em laranjas [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] (Martins et al., 2011). O terpeno álcool linalol é um dos componentes oxigenados dos óleos essenciais de citros com grande impacto para o aroma devido ao seu baixo limiar de percepção de odor, podendo ser encontrado em concentrações de 0,018 a 10% em laranjas e tangerinas, respectivamente (Palazzolo et al., 2013).

Os óleos essenciais constituem um dos mais importantes grupos de matérias-primas para diversas indústrias, tais como, alimentos, farmacêutica, produtos de limpeza, perfumaria e aromaterapia. Os óleos essenciais possuem uma característica importante que é a volatilidade de seus constituintes, podendo fornecer substâncias de alto valor comercial para indústria como o limoneno, citral, citronelal, eugenol, mentol e safrol (Gonçalves et al., 2018; Yi et al., 2018; Souza et al., 2010; Bizzo, 2009). Os óleos essenciais são conhecidos e utilizados desde a antiguidade por suas propriedades biológicas, especialmente antibacteriana, antifúngica e antioxidante. O valor de cada óleo essencial depende principalmente de sua composição química, podendo ter um preço maior no mercado se possuir compostos com atividade biológica que se destinem a produção de medicamentos ou uma maior quantidade de compostos de aroma importantes para as indústrias de alimentos, bebidas, limpeza e perfumaria. Neste aspecto, o limoneno é o principal produto obtido do beneficiamento de óleos essenciais de citros. Suas principais aplicações são para fabricação de produtos de limpeza, além de ser utilizado em misturas com outros óleos essenciais para a indústria de perfumes (Souza et al., 2010; Bizzo, 2009).

Martins et al. (2011) destacaram os requisitos de qualidade em óleos essenciais pela Farmacopéia Européia que estabelece para tangerina a seguinte composição: α -pineno de 1,6 a 3,0%; sabineno <0,3%; β -pineno de 1,2 a 2,0%; mirceno de 1,5 a 2,0%; p-cimeno <1,0%; limoneno de 65 a 75%, γ -terpineno de 16 a 22% e N-metilantranilato de metila de 0,3 a 0,6%. Na Tabela 1 podem ser visualizadas as estruturas químicas destes compostos e seus descritores de odor.

Tabela 1. Estrutura química e descritores de odor de alguns compostos presentes em óleo essencial de *Citrus reticulata* Blanco.

Nome	Estrutura	Odor
α -pineno		pinho, resinoso
sabineno		verde, pungente
β -pineno		resinoso, amadeirado
mircenol		mofo, solo molhado
p-cimeno		cítrico, solvente
limoneno		cítrico, fresco
γ -terpineno		cítrico, limão
N-metil-antranilato de metila		mel, floral

Fonte: Adaptado de Martins et al., 2011; Tietel et al., 2011.

1.2 Suco integral de tangerinas

Sobre o comércio de sucos de frutas, o suco de tangerina tem se tornado um produto mais fácil de ser encontrado no mercado nacional nos últimos anos, sendo comercializado principalmente na forma de suco integral. Segundo a legislação brasileira, suco integral é a bebida não concentrada e não diluída composta por 100% de suco sem adição de açúcar, enquanto que néctar é a bebida diluída em água composta por 99% a 25% de suco adoçado podendo ser adicionada de ácidos para correção da acidez; já o refresco é a bebida diluída em água composta por menos de 25% de suco, adicionada de açúcar, ácidos e outros ingredientes (Brasil, 2002; Brasil 2000; Brasil, 1997, Brasil 1994).

O suco de tangerina tem grande aceitação pelo mercado consumidor devido ao seu sabor agradável e delicado. Sabor pode ser definido como a combinação de sensações básicas de gosto, aroma e sensações químico-táteis que são percebidas simultaneamente durante a ingestão de alimentos e bebidas (Goff & Klee, 2006). Gosto pode ser definido como as

sensações de doce, azedo, salgado, amargo e *umami* (a sensação dada pelo glutamato monossódico e aminoácidos relacionados) proporcionada por compostos não voláteis (Reineccius, 2006). Enquanto que aroma (ou odor) é uma sensação muito mais complexa se comparada ao gosto, com mais de 8.000 compostos voláteis já identificados como potenciais contribuidores para o aroma dos alimentos (Grosch, 2001; Boelens, 1997). Cada um destes compostos voláteis relacionados ao aroma pode potencialmente contribuir para a percepção do odor do alimento ou bebida, dependendo de suas concentrações, limites sensoriais, volatilidade e interações com outros componentes da matriz do alimento. As sensações químico-táteis ou chemestese referem-se à sensibilidade química a compostos capazes de provocar sensações de frio (mentol), calor (piperina) ou adstringência (fenólicos) (CHEMESTHESIS, 2019).

A composição química do suco integral de tangerina pode variar devido a diversos fatores, que podem estar relacionados à natureza da fruta, tais como variedade, condições de cultivo, e estágio de maturação dos frutos; ao tempo e temperatura de armazenagem dos frutos antes da obtenção do suco; e às condições de processamento como tipo de extrator e utilização de processos de pasteurização ou concentração do suco (Rouseff et al., 2009).

O aroma fresco e agradável do suco de tangerina provém de uma combinação de diversos compostos voláteis, muitos dos quais podem ser encontrados tanto no óleo essencial, quanto no suco da fruta. O aroma de tangerina não é tão bem conhecido como o de laranja, mas aparenta ser derivado de uma mistura de voláteis, a qual inclui diversas classes químicas, especialmente terpenos presentes nos óleos essenciais, que são transferidos para o suco durante a sua obtenção industrial (Pérez-López & Carbonell-Barrachina, 2006). Os principais voláteis para o aroma da tangerina são linalol (notas de aroma floral e lavanda), α -terpineol (óleo, anis, hortelã), terpinen-4-ol (terebintina, noz-moscada, mofo), nonanal (gorduroso, cítrico, verde), decanal (sabão, casca de laranja, sebo), carvona (hortelã, alcarávia), limoneno (limão, laranja, cítrico), α -pineno (pinho, terebetina) e mirceno (balsâmico, mofado, tempero), enquanto que o gosto da tangerina é influenciado principalmente pelos níveis de ácidos orgânicos e açúcares presentes nos sucos, majoritariamente compostos por glicose, sacarose, frutose, ácido málico e ácido cítrico (Goldenberg et al., 2018).

1.3 Tangerina Fremont IAC 543

A tangerina Fremont IAC 543 é um híbrido resistente à mancha marrom de alternária (*Alternaria alternata* f. sp. *citri*), principal doença fúngica que acomete a cultura. Esta

variedade de tangerina é originária do cruzamento das tangerinas Clementina (*Citrus clementina* hort. ex Tanaka) e Ponkan (*Citrus reiculata* Blanco). Geralmente a tangerina Fremont IAC 543 é cultivada em diferentes porta-enxertos como, por exemplo, limão Cravo (*Citrus limonia* Osbeck), citrumelo Swingle [*C. paradisi* Macfad. x *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.], trifoliata [*Poncirus trifoliata* (L.) Raf.] e trifoliata *Flying Dragon* [*Poncirus trifoliata* (L.) Raf var. *monstrosa*] (Pacheco, 2015). Enxertia é um método de propagação vegetativa de plantas frutíferas. Neste procedimento, o enxerto advém de uma gema lateral, chamada de borbulha (ex.: tangerina Fremont IAC 543), normalmente de um ramo, que é enxertado (introduzido) na base de uma muda de uma segunda planta (chamada de porta-enxerto), normalmente de outra espécie (Figura 11). A enxertia pode ser utilizada para gerar mudas de plantas de difícil reprodução ou para aproveitar características de resistência a doenças. No entanto, o uso de porta-enxertos pode levar à produção de frutos com diferentes características de qualidade como por exemplo, tamanho e peso dos frutos, cor e espessura da casca, conteúdo de suco, sólidos solúveis totais, acidez, composição química dos voláteis relacionados ao sabor, conteúdo e composição química dos óleos essenciais e conservação pós-colheita (Ribeiro et al., 2005).

A presente dissertação trata-se de uma pesquisa original que é a continuação de um estudo anterior que avaliou a resistência da tangerina Fremont IAC 543 frente à mancha marrom de alternária, a eficiência produtiva em diferentes porta-enxertos, a qualidade dos frutos e a interação genótipo x ambiente em locais de clima contrastantes (sudeste do Brasil – clima tropical e Córsega/França – clima mediterrâneo) (Pacheco, 2015). A presente pesquisa foi conduzida para trazer novas informações sobre a composição química e rendimento de óleos essenciais da casca e composição de voláteis e não voláteis do suco desta tangerina.

Figura 11. Processo de enxertia em citros por borbulhia em T invertido.

Fonte: Autoria própria.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a influência de diferentes porta-enxertos (limão Cravo, citrumelo Swingle, trifoliata e trifoliata *Flying Dragon*) no rendimento e composição química dos óleos essenciais e do suco integral de tangerinas Fremont IAC 543.

2.2 Objetivos específicos

- Obter os óleos essenciais da casca de tangerinas Fremont IAC 543 cultivadas em diferentes porta-enxertos empregando hidrodestilação por arraste de vapor a fim de estimar a produtividade de óleo essencial em litros por hectare segundo os diferentes porta-enxertos.
- Caracterizar os óleos essenciais por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS) e semi-quantificar seus constituintes por cromatografia gasosa acoplada a detector de ionização em chama (GC-FID) a fim de verificar diferenças na composição química dos óleos essenciais em função do tipo de porta-enxerto.
- Otimizar a extração dos voláteis dos sucos recém-espremidos de tangerinas IAC 543 cultivadas em diferentes porta-enxertos através da técnica de micro extração em fase sólida de *headspace* (HS-SPME).
- Caracterizar os voláteis dos sucos recém-espremidos de tangerinas cultivadas em diferentes porta-enxertos através de GC-MS.
- Caracterizar os compostos não voláteis majoritários presentes nos sucos recém-espremidos de tangerinas IAC 543 cultivadas em diferentes porta-enxertos através da técnica de Ressonância Magnética Nuclear (RMN).
- Analisar os dados de óleo essencial, composição dos voláteis e não voláteis através de ferramentas quimiométricas (análise de componentes principais) a fim de visualizar a variabilidade máxima dos grupos de amostras, identificar padrões, correlacionar as amostras conforme o porta-enxerto e a composição da matriz analisada.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Amostras de tangerina

Amostras de tangerinas Fremont IAC 543 cultivadas em diferentes porta-enxertos foram obtidas (4 kg de cada tipo) junto ao Centro de Citricultura 'Sylvio Moreira' do Instituto Agrônômico (IAC) localizado em Cordeirópolis – SP. As frutas foram colhidas no Sítio

Lagoa Bonita, situada no Município de Mogi Mirim – SP, sobre as coordenadas geográficas 22°25'22.94"S, 47°05'35.61"O e altitude de 652 m, de forma aleatória em pelo menos 3 diferentes árvores e em diferentes alturas das copas das árvores. A colheita das amostras foi realizada no mês de setembro de 2017. Uma vez colhidas, as amostras foram imediatamente transportadas para o IQSC-USP para as análises.

3.2 Obtenção dos óleos essenciais de tangerina

Os óleos essenciais presentes nas cascas das tangerinas foram obtidos via hidrodestilação, utilizando um aparelho do tipo Clevenger modificado (Figura 12). Nessa etapa, 120 g de casca foram cortados em pedaços pequenos de aproximadamente 1 cm². Estes foram inseridos em um balão de fundo redondo de 2 L, e a amostra foi hidrodestilada durante 1 hora. O óleo obtido foi seco em sulfato de sódio anidro e armazenado em atmosfera de nitrogênio em frasco âmbar a -20 °C por no máximo 24 horas até o momento das análises. As hidrodestilações foram realizadas em triplicata.

Figura 12. Sistema de hidrodestilação do tipo Clevenger modificado utilizado para a obtenção dos óleos essenciais.

Fonte: Autoria própria.

3.3 Análise dos óleos essenciais de tangerina por GC-FID e GC-MS

Para as análises, o óleo essencial foi diluído em diclorometano (30% v/v) e 1 µL da solução foi injetada em um GC-MS Shimadzu modelo GCMS-QP2010 Plus, equipado com uma coluna capilar de sílica fundida VF-5ms (30 m x 0,25 mm d.i. x 0,25 µm), sob as seguintes condições cromatográficas: injetor a 220 °C operando em modo *split* 1:20 por 1,0 min; gás de arraste hélio a 1,0 mL min⁻¹; rampa de temperatura do forno: 60 °C, com incremento de 3 °C min⁻¹ até 240 °C; temperatura de interface: 240 °C, fonte de ionização por elétrons +70 eV, modo de varredura entre 35 e 350 m/z. Uma solução de n-alcenos (C₇-C₃₀) foi injetada no GC-MS sob as mesmas condições da amostra, com a finalidade de obter os índices de retenção de temperatura programada (LTPRI – *linear temperature programmed retention index*) dos compostos voláteis. A identificação tentativa dos analitos foi realizada comparando-se os LTPRI e os espectros de massa obtidos para a amostra com os espectros de massa e LTPRI da literatura (NIST, 2008), com similaridade de, no mínimo, 85 % para os espectros de massa, e variação máxima nos LTPRI de ± 10. A análise semi-quantitativa (% relativa) dos componentes do óleo essencial foi realizada em um GC-FID Shimadzu modelo GC-2010 sob as mesmas condições de análise descritas para o GC-MS. Para esta última análise os fatores de resposta diferencial do detector de ionização em chama foram considerados como iguais a 1 (Bicchi et al., 2008). Todas as análises cromatográficas foram realizadas em triplicata.

3.4 Análise dos voláteis do suco fresco de tangerina

3.4.1 Obtenção do suco de tangerina recém-espremido (suco fresco)

Para obtenção do suco fresco de tangerina, os frutos foram lavados em água corrente e em seguida foram cortados ao meio e espremidos em espremedor de suco manual de uso doméstico. Foram utilizados cinco frutos por vez para obtenção do suco. O suco obtido foi coado em coador doméstico para eliminar a presença de sementes e imediatamente submetido a extração dos voláteis.

3.4.2 Extração dos voláteis do suco fresco de tangerina por HS-SPME

Alíquotas de 10,0 mL do suco de tangerina foram transferidas para frascos de 40 mL, dotados de tampa de rosca e septo de PTFE/silicone próprios para extração por SPME. Adicionou-se 3 g de cloreto de sódio sobre o suco no frasco de extração, com o intuito de aumentar a eficiência de extração (efeito *salting-out*) conforme descrito por Charve et al.

(2011). A mistura foi agitada em vórtex por 1 minuto e submetida à extração por HS-SPME em banho termostático utilizando béquer encamisado para melhor controle de temperatura durante extração (Figura 13).

Figura 13. Sistema para extração de voláteis do suco fresco de tangerina por HS-SPME utilizando béquer encamisado com circulação de água, para controle de temperatura.

Fonte: autoria própria.

Foram testados cinco diferentes materiais de recobrimento de fibras de SPME, de diferentes polaridades e mecanismos de extração, com o objetivo de escolher aquele que apresentasse maior capacidade de extração dos voláteis do suco fresco de tangerina: CAR/PDMS (carboxen/polidimetilsiloxano) 75 μm , PDMS/DVB (polidimetilsiloxano/divinilbenzeno) 65 μm , DVB/CAR/PDMS (divinilbenzeno/carboxen/polidimetilsiloxano) 50/30 μm , PDMS (polidimetilsiloxano) 100 μm e PA (poliacrilato) 85 μm . As fibras foram adquiridas da Supelco, (Bellefonte, PA, USA). Todas as fibras foram previamente condicionadas, segundo as recomendações do fabricante. Cada fibra foi exposta ao *headspace* da amostra sob as seguintes condições, estabelecidas arbitrariamente apenas para a etapa de escolha da fibra: tempo de equilíbrio de 10 min, tempo de extração 30 min, temperatura de extração 40 °C. Após a extração, as fibras foram introduzidas no injetor do cromatógrafo a gás para dessorção dos analitos a uma temperatura de 250 °C, em modo *splitless*, por um período de 1,0 min. Após o procedimento de extração e dessorção, as fibras foram recondicionadas por 15 min a 250 °C. O procedimento de recondicionamento das fibras foi realizado para garantir a inexistência de picos nos brancos

de corrida e a boa qualidade dos procedimentos de extração por SPME. Todas as fibras foram testadas em triplicata e os resultados apresentados representam as médias das mesmas.

3.5 Estratégia de otimização da extração dos voláteis do suco fresco de tangerina por HS-SPME

Uma vez escolhida a fibra com a maior capacidade de extração dos voláteis do suco integral de tangerina, foram otimizadas as condições de extração através de um delineamento composto central (DCC), baseado num planejamento fatorial, com quatro pontos axiais e quatro repetições no ponto central (Bogusz et al., 2011). As variáveis otimizadas foram tempo de extração (t, min) e temperatura de extração (T, °C), os níveis de cada variável investigada podem ser visualizados na Tabela 2.

Tabela 2. Fatores, níveis e domínio experimental das condições aplicadas para otimizar a extração por HS-SPME do suco integral de tangerina.

Variáveis	Variáveis codificadas				
	-1,5714	-1,1429	0	1	1,4286
Temperatura de extração (T, °C)	22	25	33	40	43
Tempo de extração (t. ext., min)	-1,4000	-1	0	1	1,4000
	6	10	20	30	34

Fonte: Autoria própria.

No total, doze experimentos aleatórios foram realizados com o suco fresco de tangerina, conforme pode ser visualizado na Tabela 3. A resposta avaliada para o planejamento foi área total do cromatograma. As análises estatísticas foram realizadas empregando o software Statistica v. 13 (Statsoft Inc., Tulsa, OK, USA).

Tabela 3. Experimentos realizados no delineamento composto central na etapa de otimização das condições de extração dos compostos voláteis em suco integral de tangerina por HS-SPME.

Ensaio	Tempo de extração (min)		Temperatura de extração (°C)	
1	-1	10	-1,1429	25
2	1	30	-1,1429	25
3	-1	10	1	40
4	1	30	1	40
5	0	20	0	33
6	0	20	0	33
7	0	20	0	33
8	0	20	0	33
9	-1,4000	6	0	33
10	1,4000	34	0	33
11	0	20	-1,5714	22
12	0	20	1,4286	43

Fonte: Autoria própria.

3.6 Análise dos voláteis do suco fresco de tangerina por GC-MS

Os compostos voláteis que foram extraídos por HS-SPME foram injetados em um GC-MS Shimadzu modelo GC-2010, dotado de uma coluna capilar de sílica fundida VF-5ms (30 m x 0,25 mm d.i. x 0,25 μ m), sob as seguintes condições cromatográficas: injetor a 250 °C operando em modo *splitless* por 1,0 min; gás de arraste hélio a 1,0 mL min⁻¹; rampa de temperatura do forno: 60 °C, com incremento de 3 °C min⁻¹ até 240 °C; temperatura de interface: 240 °C, fonte de ionização por elétrons +70 eV, 35-350 m/z. Uma solução de n-alcanos (C₇-C₃₀) foi injetada no GC-MS sob as mesmas condições da amostra, com a finalidade de obter os índices de retenção de temperatura programada (LTPRI – *linear temperature programmed retention index*) dos compostos voláteis. A identificação tentativa dos analitos foi realizada comparando-se os LTPRI e os espectros de massa obtidos para a amostra com os espectros de massa e LTPRI da literatura (NIST, 2008), com similaridade de, no mínimo, 85 % para os espectros de massa, e variação máxima nos LTPRI de ± 10 .

3.7 Análise dos compostos não voláteis do suco fresco de tangerina por RMN

Antes dos experimentos de RMN de ¹H, 1500 μ L de suco fresco de tangerina foram centrifugados a 5000 rpm por 5 min. Uma alíquota de 900 μ L foi retirada do sobrenadante e adicionada de 100 μ L da solução tampão fosfato pH 7,2 e 10 μ L do padrão interno ácido trimetilsililpropanoico (TSP) na concentração de 3,5 mg mL⁻¹. A solução tampão foi adicionada à amostra para minimizar o efeito da força iônica nas mudanças de frequências nos espectros de RMN. A solução final (600 μ L) foi transferida para os tubos de RMN de 5 mm. O procedimento foi realizado em triplicata.

Os experimentos de RMN foram realizados em um equipamento DRX 600 BRUKER de 14,1 Tesla (600 MHz para a frequência do hidrogênio) utilizando uma sonda com detecção inversa e gradiente de campo na coordenada z. Os espectros de RMN foram obtidos utilizando a sequência de pulso noesygppr1d para a supressão do sinal da água (aproximadamente 4,9 ppm). Os dados foram obtidos com calibração de pulsos, 256 scans, tempo de aquisição 2,0 s, janela espectral 20 ppm e temperatura 25 °C. O processamento desses espectros foi realizado com 64 k pontos, acrescidos de uma multiplicação exponencial utilizando um fator lb=0,30Hz e correção automática de linha de base. O modo manual foi usado para o processamento de integração dos sinais escolhendo a mesma largura para cada metabólito.

3.8 Análises quimiométricas

As análises de componentes principais (PCA) foram realizadas utilizando o software Matlab v.7.12 (Mathworks, USA).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Rendimento e produtividade de óleos essenciais segundo os diferentes porta-enxertos

Os frutos de tangerina Fremont IAC 543 apresentaram tamanho, forma e cor similares (Figura 14), independente do porta-enxerto. Também, apresentaram resultados qualitativos e quantitativos de óleos essenciais similares. A tangerina cultivada no porta-enxerto de limão Cravo apresentou o menor rendimento dentre as variedades testadas (0,36 %), enquanto que a cultivada em trifoliata apresentou o maior rendimento de óleo essencial (0,47 %). As tangerinas cultivadas em porta-enxerto de citrumelo Swingle e trifoliata *Flying Dragon*, apresentaram rendimento de óleo essencial muito próximos (0,44 e 0,40 %), não diferindo estatisticamente. O teor de óleo essencial encontrado para as amostras está de acordo com o encontrado na literatura, o qual varia de 0,08 a 1,29% para tangerinas e mexericas (Teixeira et al., 2014; Kamal et al., 2011; Lota et al., 2000).

Figura 14. Fotografia dos frutos de tangerina Fremont IAC 543 cultivadas em diferentes porta-enxertos. A= limão Cravo; B= citrumelo Swingle; C= trifoliata; D= trifoliata *Flying Dragon*.

Fonte: Autoria própria.

Figura 15. Rendimento de óleo essencial, em mL de óleo por 100 g de amostra (casca), obtido via hidrodestilação das tangerinas Fremont IAC 543 cultivadas em diferentes porta-enxertos.

Letras diferentes indicam diferenças estatísticas significativas a $p < 0,05$ pelo teste de ANOVA e Tukey.

Além do rendimento de óleo essencial de cada uma das variedades, estimou-se também a produtividade de óleo essencial, em litros por hectare, levando-se em consideração a produtividade de frutos por hectare, a quantidade de casca por fruto e o rendimento de extração de óleos essenciais das cascas. A Tabela 4 exhibe os valores de produtividade.

Tabela 4. Produtividade em kg de fruto por hectare, rendimento de casca do fruto, kg de casca por hectare, percentagem de óleo essencial e produtividade de óleo essencial por hectare das tangerinas Fremont IAC 543 cultivadas em diferentes porta-enxertos.

Variedade	kg fruto ha ⁻¹	% de casca no fruto	kg casca ha ⁻¹	% Óleo essencial (mL 100 g ⁻¹)	Produtividade (L ha ⁻¹)
Limão Cravo	32.619	32,92	10.739	0,36	38,5
Citrumelo Swingle	38.615	30,72	11.861	0,44	52,5
Trifoliata	31.659	33,03	10.456	0,47	48,7
Trifoliata <i>Flying Dragon</i>	30.610	30,21	9.248	0,40	37,5

Fonte: Autoria própria.

Observando os valores de produtividade, é possível verificar que a tangerina Fremont IAC 543 cultivada em porta-enxerto de citrumelo Swingle é a que é capaz de fornecer a maior quantidade de óleo essencial por hectare (52,2 L ha⁻¹). Assim, dentre as variedades de porta-enxertos estudados neste trabalho, a utilização do porta-enxerto de citrumelo Swingle poderia

ser recomendada caso o objetivo seja obter uma maior quantidade de óleo essencial agregando valor à produção citrícola.

4.2 Análise dos óleos essenciais por GC-FID E GC-MS

Considerando as quatro amostras de óleo essencial analisadas por GC-FID e GC-MS, foi possível identificar 59 compostos voláteis, que podem ser agrupados da seguinte forma: 15 sesquiterpenos, 13 álcoois, 11 aldeídos, 10 monoterpenos 6 ésteres, 2 cetonas e 2 ácidos. O número de compostos identificados nos óleos essenciais está de acordo com a literatura, que reporta desde 29 até 116 compostos nos óleos essenciais de diferentes variedades de tangerinas (Asikin et al., 2018; Yi et al, 2018; Dugo et al., 2011; Kamal et al., 2011; Fanciullino et al., 2006; Dugo et al., 2005; Choi, 2004; Feger et al., 2003).

Os compostos identificados por GC-MS, assim como suas porcentagens relativas obtidas por GC-FID, são apresentados na Tabela 5. A quantidade relativa dos compostos é muito próxima para a maioria das amostras de óleo essencial, porém há compostos como o linalol e o octanal que apresentaram uma diferença mais acentuada dependendo do tipo de porta-enxerto. Nas quatro amostras de tangerina, o teor médio de limoneno foi de aproximadamente 93%, o que está de acordo com a literatura (Kamal et al., 2011; Fanciullino et al., 2006; Dugo et al., 2005; Feger et al., 2003; Lota et al., 2000).

O limoneno é um terpeno monocíclico, composto por duas unidades de isopreno, e possui duas formas com atividade ótica: L-limoneno, com odor de pinho, e D-limoneno, com odor cítrico, o qual é mais comum na natureza e está presente em diversas frutas cítricas, tais como laranja, limão e tangerina. Sua utilização mais comum é como aditivo de fragrância e sabor na indústria alimentícia, de cosméticos e de produtos de limpeza. Além disso, também pode ser utilizado em formulações de repelentes para insetos, consideradas não prejudiciais ao meio ambiente, como solvente para limpeza industrial e como substituto de hidrocarbonetos clorados e clorofluorocarbonetos (CFCs), bem como agente desengordurante em produtos de limpeza (Ravichandran et al., 2018; Vieira et al., 2018; Nikfar et al., 2014; Sun, 2007).

Tabela 5. Composição química e % relativa dos óleos essenciais das tangerinas Fremont IAC 543 cultivadas em diferentes porta-enxertos.

Nome	LTPRI _{Calc.}	LTPRI _{Teor.}	Δ	Porcentagem Relativa (%)*			
				Limão Cravo	Citrumelo Swingle	Trifoliata	T. F. Dragon
Ácidos							
ácido palmítico	1972	1971	-1	0,04±0,00 ^{a,b}	0,04±0,00 ^{a,b}	0,05±0,00 ^a	0,02±0,00 ^b
ácido linoleico	2141	2140	-1	0,03±0,00 ^a	0,03±0,00 ^a	0,03±0,00 ^a	0,01±0,00 ^b
Álcoois							
linalol	1107	1101	-6	2,38±0,02 ^a	2,14±0,00 ^b	1,85±0,01 ^c	1,56±0,01 ^d
trans-p-menta-2,8-dien-1-ol	1127	1122	-5	0,06±0,00 ^a	0,04±0,00 ^d	0,05±0,00 ^b	0,05±0,00 ^c
cis-p-menta-2,8-dien-1-ol	1142	1138	-4	0,01±0,00 ^a	0,01±0,00 ^b	0,01±0,00 ^a	0,01±0,00 ^b
trans-p-ment-2-en-1-ol	1148	1142	-6	tr	tr	tr	tr
isopulegol	1160	1155	-5	0,01±0,00 ^a	tr	tr	tr
terpinen-4-ol	1185	1182	-3	0,12±0,00 ^d	0,13±0,00 ^c	0,14±0,00 ^b	0,15±0,00 ^a
isocarveol	1195	1186	-9	0,22±0,00 ^a	0,21±0,00 ^b	0,19±0,00 ^c	0,12±0,00 ^d
α -terpineol	1201	1192	-9	0,04±0,00 ^{a,b}	0,04±0,00 ^{b,c}	0,04±0,00 ^a	0,03±0,00 ^c
cis-carveol	1224	1226	2	tr	tr	tr	tr
álcool perílico	1300	1295	-5	0,03±0,00 ^b	0,04±0,00 ^a	0,03±0,00 ^c	0,02±0,00 ^d
elemol	1551	1549	-2	tr	tr	tr	tr
nerolidol	1564	1564	0	tr	tr	tr	tr
intermedeol	1668	1667	-1	tr	tr	tr	tr
Aldeídos							
octanal	1010	1003	-7	0,35±0,00 ^b	0,37±0,00 ^a	0,18±0,00 ^c	0,18±0,00 ^c
citronelal	1156	1154	-2	0,11±0,00 ^c	0,11±0,00 ^c	0,12±0,00 ^b	0,13±0,00 ^a
decanal	1210	1205	-5	0,27±0,00 ^c	0,29±0,00 ^b	0,29±0,00 ^b	0,35±0,00 ^a
neral	1244	1242	-2	0,02±0,00 ^b	0,02±0,00 ^{a,b}	0,03±0,00 ^a	0,02±0,00 ^b

Continuação da Tabela 5

2-decenal	1267	1262	-5	tr	tr	tr	tr
aldeído perílico	1282	1274	-8	0,23±0,00 ^a	0,19±0,00 ^b	0,19±0,00 ^b	0,16±0,00 ^c
2,4-decadienal	1324	1317	-7	0,08±0,00 ^c	0,07±0,00 ^d	0,11±0,00 ^a	0,09±0,00 ^b
tetradecanal	1617	1613	-4	tr	tr	tr	tr
pentadecanal	1719	1717	-2	tr	tr	tr	0,02±0,00 ^a
α-sinensal	1758	1758	0	0,04±0,00 ^a	0,04±0,00 ^a	0,04±0,00 ^a	0,03±0,00 ^a
hexadecanal	1821	1817	-4	tr	tr	tr	tr
Cetonas							
eucarvona	1227	1233	6	0,08±0,00 ^a	0,05±0,00 ^c	0,07±0,00 ^{a,b}	0,07±0,00 ^b
carvona	1250	1246	-4	0,06±0,00 ^a	0,06±0,00 ^a	0,06±0,00 ^a	0,05±0,00 ^b
Ésteres							
acetato de dihidrocarvila	1306	1304	-2	tr	tr	tr	tr
acetato de α-terpinila	1350	1351	1	tr	tr	tr	0,01±0,00 ^a
acetato de citronelila	1353	1351	-2	0,02±0,00 ^a	0,02±0,00 ^a	0,02±0,00 ^a	0,02±0,00 ^a
acetato de nerila	1363	1361	-2	0,01±0,00 ^a	0,01±0,00 ^a	0,01±0,00 ^a	0,02±0,01 ^a
acetato de geranila	1381	1379	-2	tr	tr	tr	0,02±0,01 ^a
acetato de perila	1439	1436	-3	tr	tr	tr	0,01±0,00 ^a
Monoterpenos							
α-tujeno	928	932	4	tr	tr	tr	tr
α-pineno	936	942	6	0,23±0,00 ^b	0,22±0,00 ^c	0,23±0,00 ^b	0,24±0,00 ^a
canfeno	953	953	0	tr	tr	tr	tr
sabineno	976	979	3	0,20±0,01 ^{b,c}	0,23±0,00 ^a	0,20±0,00 ^c	0,21±0,00 ^b
β-pineno	983	984	1	0,01±0,01 ^a	0,02±0,00 ^a	0,02±0,00 ^a	0,02±0,00 ^a
mirceno	993	991	-2	1,48±0,00 ^a	1,45±0,00 ^c	1,46±0,00 ^b	1,47±0,00 ^b

Continuação da Tabela 5

limoneno	1034	1035	1	92,61±0,06 ^b	92,93±0,02 ^b	93,29±0,03 ^a	93,40±0,11 ^a
ocimeno	1052	1048	-4	0,02±0,00 ^b	0,02±0,00 ^b	0,02±0,00 ^b	0,03±0,00 ^a
γ-terpineno	1063	1064	1	0,03±0,00 ^c	tr	0,04±0,00 ^a	0,04±0,00 ^b
terpinoleno	1090	1089	-1	0,02±0,00 ^a	0,02±0,00 ^a	0,02±0,00 ^a	0,00±0,00 ^b
Sesquiterpenos							
α-cubebeno	1375	1372	-3	tr	0,02±0,00 ^a	0,02±0,00 ^a	0,03±0,02 ^a
β-cubebeno	1388	1390	2	0,02±0,00 ^a	0,02±0,00 ^a	0,03±0,00 ^a	0,02±0,01 ^a
β-elemeneno	1389	1391	2	tr	tr	tr	0,02±0,01 ^a
β-cariofileno	1419	1419	0	0,03±0,00 ^a	0,02±0,00 ^a	0,04±0,00 ^a	0,03±0,00 ^a
β-copaeno	1429	1430	1	tr	tr	tr	0,01±0,00 ^a
β-gurjuneno	1430	1432	2	0,03±0,00 ^a	0,02±0,00 ^{a,b}	0,01±0,00 ^b	0,02±0,00 ^{a,b}
α-guaieno	1434	1435	1	tr	tr	tr	tr
β-farneseno	1453	1459	6	0,01±0,00 ^a	0,01±0,00 ^a	0,02±0,00 ^a	0,02±0,00 ^a
α-humuleno	1455	1457	2	tr	tr	tr	tr
germacreno D	1481	1481	0	tr	tr	tr	tr
valenceno	1493	1491	-2	tr	tr	tr	0,01±0,01 ^a
α-muuroleno	1499	1499	0	0,16±0,01 ^a	0,08±0,00 ^a	0,08±0,00 ^a	0,13±0,01 ^a
α-farneseno	1505	1506	1	0,01±0,00 ^a	0,01±0,00 ^a	0,01±0,00 ^a	0,01±0,00 ^a
δ-cadineno	1519	1524	5	tr	tr	tr	tr
β-Sesquifelandreno	1525	1525	0	tr	tr	tr	0,01±0,00 ^a

LTPRI_{Calc.} = índice de retenção obtido experimentalmente (calculado); LTPRI_{Teor.} = índice de retenção encontrado na literatura (teórico); Δ = diferença entre os índices de retenção teórico e calculado: LTPRI_{Teor.} - LTPRI_{Calc.}; * área relativa do cromatograma; tr = teor a nível traço (área relativa <0,01). Letras diferentes indicam diferenças estatísticas significativas a p<0,05 pelo teste de ANOVA e Tukey.

Quando comparamos a composição dos óleos essenciais das amostras de tangerina Fremont IAC 543 cultivadas nos diferentes porta-enxertos verificamos como majoritários o limoneno (92,59 a 93,20 %), linalol (1,56 a 2,38%), mirceno (1,45 a 1,48%), octanal (0,18 a 0,37 %), decanal (0,27 a 0,35 %), α -pineno (0,22 a 0,24 %), perilal (0,16 a 0,23 %), sabineno (0,20 a 0,23%), isocarveol (0 a 0,22 %), terpinen-4-ol (0,12 a 0,15 %) e citrônella (0,11 a 0,13 %), que somados representam de 97,6 a 98,3 % de toda a composição dos óleos essenciais. Li et al. (2018), observaram em óleo essencial de citros os seguintes compostos majoritários: limoneno (90,23 %), linalol (2,01 %), α -terpineno (1,98 %), mirceno (1,78 %), α -pineno (1,02 %). Estes autores também ressaltam que o limoneno possui propriedades antioxidantes e baixa toxicidade e que linalol, α -terpineno, mirceno e α -pineno são capazes de desacelerar o crescimento de microrganismos, o que sugere um efeito de redução da taxa de crescimento microbiano. A Figura 16 ilustra um cromatograma típico dos óleos essenciais das tangerinas Fremont IAC 543 investigadas nesta pesquisa.

Figura 16. Cromatograma por GC-FID do óleo essencial da tangerina Fremont IAC 543 porta-enxertada em Limão Cravo. Em destaque: 1. α -pineno; 2. sabineno; 3. mirceno; 4. octanal; 5. limoneno; 6. linalol; 7. citrônella; 8. terpinen-4-ol; 9. isocarveol; 10. decanal; 11. perilal.

Fonte: Autoria própria.

Dos compostos identificados, oito são amplamente citados na literatura, por serem considerados como compostos importantes para o aroma dos frutos de tangerina: linalol, α -terpineol, terpinen-4-ol, decanal, carvona, limoneno, α -pineno e mirceno

(Tietel et al., 2011). Segundo Pérez-López e Carbonell-Barrachina (2006), os principais compostos que contribuem para o odor do óleo de tangerina são o limoneno, mirceno, α -pineno e γ -terpineno.

O teor de um composto no óleo essencial não é necessariamente uma medida de seu impacto sensorial, uma vez que, este depende do limiar de percepção de odor humano, além dos efeitos sinérgicos e antagônicos dos demais compostos presentes. Assim, apesar dos terpenos estarem em maior quantidade, outros compostos que estão em menor concentração também podem exercer influência direta sobre o aroma (Asikin et al., 2018; Alvarez et al., 2011). Pérez-Cacho & Roussef (2008) mencionam que os compostos octanal, decanal, neral, citronelal, terpinen-4-ol, linalol e carvona apresentam atividade odorífera. Ren et al. (2015), em um estudo com análise sensorial, relataram que os compostos α -pineno, β -mirceno, D-limoneno, linalol, terpinen-4-ol, α -terpineol, decanal e citral, estão associados ao atributo sensorial de aroma de laranja, enquanto que o γ -terpineno está associado ao descritor de aroma cítrico. Além disso, a presença dos compostos cariofileno e acetato de nerila no óleo essencial de citros podem ter influência sobre os odores azedo e frutado.

4.3 Otimização da extração dos voláteis do suco recém-espremido de tangerinas IAC 543 por HS-SPME

Na Figura 17 são exibidos os valores médios de área total para os cromatogramas quando da escolha das fibras de SPME testadas para extração dos voláteis do suco fresco das tangerinas. Neste estudo, a fibra de DVB/PDMS foi a que apresentou a maior capacidade de captura dos voláteis do suco fresco de tangerina com significativa diferença ($p < 0,05$) em relação às demais fibras testadas. Isto, provavelmente, é resultante do fato de que este recobrimento possui “polaridade mista”, isto é, capaz de capturar compostos polares e apolares e possui porosidade uniforme se comparado ao recobrimento com Carboxen 1006 em sua composição, o que permite capturar maior quantidade de compostos que possuem tamanho similar, uma vez que o processo de captura depende do diâmetro do poro (Pawliszyn, 2012).

Figura 17. Capacidade de extração das fibras de SPME de DVB/PDMS, DVB/CAR/PDMS, CAR/PDMS, PDMS e PA, na extração dos compostos voláteis do suco fresco das tangerinas. O resultado é expresso como média das triplicatas de área total do cromatograma, obtidas no GC-FID.

Condições de extração: 10 mL de suco fresco, 3 g de NaCl, tempo de equilíbrio 10 min, tempo de extração 30 min e temperatura de extração 40 °C. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas significativas a $p < 0,05$ pelo teste de ANOVA e Tukey.

A Tabela 6 apresenta as respostas de área total dos cromatogramas obtidas na etapa de otimização. É possível observar que as condições de extração que forneceram os maiores valores de área total foram o tempo de extração de 30 min e a temperatura de extração de 40 °C (experimento 4).

Tabela 6. Condições experimentais e valores da resposta área total obtidos no delineamento composto central rotacional na etapa de otimização das condições de extração dos compostos voláteis em suco integral de tangerina por HS-SPME com fibra DVB/PDMS.

Ensaio	Tempo de extração (min)		Temperatura de extração (°C)		Área total
1	-1	10	-1,1429	25	7,36E+08
2	1	30	-1,1429	25	1,04E+09
3	-1	10	1	40	9,73E+08
4	1	30	1	40	1,39E+09
5	0	20	0	33	1,17E+09
6	0	20	0	33	1,08E+09
7	0	20	0	33	1,17E+09
8	0	20	0	33	1,11E+09
9	-1,4000	6	0	33	6,67E+08
10	1,4000	34	0	33	1,27E+09
11	0	20	-1,5714	22	9,21E+08
12	0	20	1,4286	43	1,38E+09

Fonte: Autoria própria.

Na Tabela 7 são apresentados os resultados de ANOVA para os DCC com resposta de área total. Observa-se que a significância estatística da regressão dada pela razão entre a média dos quadrados da regressão pela média quadrática dos resíduos (MQ_R/MQ_R) ou F_1 calculado, é de 73,11, enquanto que valor de F_1 tabelado ao nível de significância de 95% (5, 6, 95%) é de 4,39. Assim, verifica-se que F_1 calculado $<$ F_1 tabelado aproximadamente 16,65 vezes, o que indica a existência de uma adequada correlação entre as variáveis independentes e a área total obtida no cromatograma. Ao se analisar a significância estatística da falta de ajuste do modelo, dada pela razão entre a média quadrática da falta de ajuste pela média quadrática do erro puro (MQ_{faj}/MQ_{ep}), ou F calculado, é de 0,62, enquanto que valor de F tabelado ao nível de significância de 95% (3, 3, 95%) é de 9,28. Verifica-se então que F_2 calculado $>$ F_2 tabelado aproximadamente 14,96 vezes, indicando que o modelo obtido não apresenta falta de ajuste aos resultados experimentais, o que possibilita fazer previsões sobre as respostas para outros valores das variáveis estudadas, com base no modelo obtido.

Tabela 7. Análise da variância (ANOVA) pelo método dos mínimos quadrados, para a resposta área total do cromatograma e os parâmetros temperatura e tempo de extração dos compostos voláteis de suco de tangerina por HS-SPME com a fibra DVB/PDMS.

Fontes de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Média dos Quadrados	F_{cal}	F_{tab}	F_{cal}/F_{tab}
Regressão	5,53E+17	5	1,11E+17	76,67	4,39	17,48
Resíduos	8,65E+15	6	1,44E+15			
Total	5,61E+17	11	5,10E+16			
Erro Puro	5,57E+15	3	1,86E+15	0,55	9,28	0,06
Falta de Ajuste	3,07E+15	3	1,02E+15			
R^2	0,98					

% variação explicada pelo modelo: 98,5 % Fonte: Autoria própria.

Na Figura 18, pode ser observado o diagrama de Pareto, no qual estão resumidos os resultados obtidos com o delineamento experimental. Nele, é possível observar que todos os parâmetros estudados foram significativos ($p=0,05$), mas os coeficientes da interação variáveis tempo e temperatura de extração e a temperatura quadrática não foram significativos.

Figura 18. Diagrama de Pareto dos efeitos das variáveis estudadas no procedimento de extração dos voláteis em suco fresco de tangerina por SPME. Resposta: área total, 2 fatores, 1 bloco, 11 experimentos, erro puro 1,86E+15.

Fonte: Autoria própria.

A superfície de resposta obtida no delineamento composto central pode ser observada na Figura 19. Através da equação da superfície de resposta, calcularam-se os valores de tempo e temperatura de extração ótimos, os quais foram 31 minutos e 43 °C.

Figura 19. Superfície de resposta obtida pelo modelo quadrático: $z = 1,14E+09 + 1,97E+08*x - 9,03E+07*x^2 + 1,44E+08*y$, para a otimização das condições de temperatura de extração (x, °C) e tempo de extração (y, min) dos voláteis de suco integral de tangerina por HS-SPME e resposta área total do cromatograma.

Fonte: Autoria própria.

4.4 Voláteis do suco fresco das tangerinas Fremont IAC 543 por GC-MS

Utilizando as condições otimizadas de extração por HS-SPME, os voláteis dos sucos frescos das tangerinas foram extraídos e analisados por GC-MS. Os resultados da composição dos voláteis dos sucos podem ser observados na Tabela 8. Nas variedades de tangerina Fremont IAC 543, foram identificados 49 compostos no total, subdivididos em cinco classes químicas diferentes: 12 sesquiterpenos, 12 aldeídos, 9 álcoois, 6 monoterpenos, 5 ésteres, 4 cetonas e 3 hidrocarbonetos. A quantidade de compostos identificada está de acordo com a literatura, que reporta entre 32 e 61 compostos voláteis identificados em sucos de tangerinas (Xiao et al., 2017; Goldenberg et al., 2016; Ni et al., 2015; Ren et al., 2015; Alvarez et al., 2011; Tietel et al., 2011; Barboni et al., 2009).

Observando os valores da Tabela 8 para o restante desses compostos, podemos observar que o terpinen-4-ol e o decanal não possuem diferença estatística significativa entre as amostras de suco. Em relação aos compostos α -pineno e mirceno houve diferenciação apenas entre as amostras cultivadas em citrumelo Swingle e trifoliata *Flying Dragon*. As variedades plantadas sobre limão Cravo e citrumelo Swingle foram as que apresentaram maior quantidade de linalol, enquanto a variedade trifoliata *Flying Dragon* apresentou a menor quantidade de carvona e foi a única a conter o composto nonanal.

Quanto à importância odorífera dos voláteis identificados, Tietel et al. (2011) relatam que 9 compostos voláteis podem ser considerados como importantes para a percepção do aroma do suco de tangerina: linalol (notas de aroma floral e lavanda), α -terpineol (óleo, anis, hortelã), terpinen-4-ol (terebintina, noz-moscada, mofo), nonanal (gorduroso, cítrico, verde), decanal (sabão, casca de laranja, sebo), carvona (hortelã, alcarávia), limoneno (limão, laranja, cítrico), α -pineno (pinho, terebetina) e mirceno (balsâmico, mofado, tempero). Xiao et al. (2017) relatam que compostos como nonanal, hexanal (gramíneo, sebo, gordura), linalol e limoneno são compostos importantes para o aroma do suco de tangerina, e que os compostos β -ionona (violeta, flor, framboesa), decanal, γ -terpineno (terebintina) e butirato de metila (éter, fruta, adocicado) possuem também grande impacto odorífero para o suco quando estão presentes. Destes, o hexanal, o β -ionona, o γ -terpineno e o butirato de metila não foram identificados nas amostras de suco analisadas.

Moshonas & Shaw (1997), a partir do suco de 15 diferentes cultivares de tangerinas, relataram 42 componentes voláteis importantes para o sabor do suco das frutas, destacando os compostos limoneno, linalol, mirceno e γ -terpineno, os quais também foram identificados em nosso estudo. Pérez-López et al. (2006) analisaram duas variedades de tangerinas espanholas (Clemenules e Fortuna), quantificando 12 componentes do aroma do suco e concluíram que o limoneno, mirceno, sabineno, α -pineno e linalol foram os compostos predominantes. Os mesmos autores também relataram que medidas de estabilidade do limoneno e linalol, bem como a formação de α -terpineol e terpinen-4-ol podem auxiliar produtores de suco de tangerina a avaliar a qualidade de seus produtos, uma vez que o aumento do conteúdo de α -terpineol e terpinen-4-ol está correlacionado a diminuição de aceitação dos sucos.

Tabela 8. Compostos voláteis identificados em suco fresco de tangerinas Fremont IAC 543 cultivadas em diferentes porta-enxertos por HS-SPME e GC-MS.

	LTPRI Calc.	LTPRI Teor.	Δ	Área Bruta do Cromatograma ($\times 10^6$)			
				Limão Cravo	Citrumelo Swingle	Trifoliata	T. F. Dragon
Álcoois							
linalol	1104	1101	3	22,50 $\pm$ 2,26 ^a	23,21 $\pm$ 1,36 ^a	11,09 $\pm$ 2,75 ^c	17,26 $\pm$ 0,23 ^b
trans-p-mentha-2,8-dien-1-ol	1127	1123	4	1,95 $\pm$ 0,18 ^{a,b}	1,37 $\pm$ 0,06 ^b	2,29 $\pm$ 0,55 ^a	0,00 $\pm$ 0,00 ^c
cis-p-mentha-2,8-dien-1-ol	1140	1141	-1	1,31 $\pm$ 0,10 ^{a,b}	0,80 $\pm$ 0,03 ^b	1,69 $\pm$ 0,40 ^a	0,00 $\pm$ 0,00 ^c
terpinen-4-ol	1185	1185	0	3,86 $\pm$ 0,81 ^a	2,88 $\pm$ 1,05 ^a	2,24 $\pm$ 0,42 ^a	1,86 $\pm$ 0,84 ^a
α -terpineol	1201	1204	-3	1,85 $\pm$ 0,08 ^a	0,87 $\pm$ 0,05 ^c	1,24 $\pm$ 0,36 ^{b,c}	1,56 $\pm$ 0,12 ^{a,b}
trans-carveol	1226	1225	1	1,02 $\pm$ 0,06 ^b	0,82 $\pm$ 0,08 ^b	1,54 $\pm$ 0,37 ^a	0,29 $\pm$ 0,04 ^c
citronelol	1232	1227	5	0,67 $\pm$ 0,16 ^b	2,93 $\pm$ 0,42 ^a	1,49 $\pm$ 0,43 ^b	0,91 $\pm$ 0,11 ^b
Aldeídos							
octanal	1010	1004	6	0,00 $\pm$ 0,00 ^b	0,00 $\pm$ 0,00 ^b	0,00 $\pm$ 0,00 ^b	1,73 $\pm$ 0,72 ^a
nonanal	1108	1104	4	0,00 $\pm$ 0,00 ^b	0,00 $\pm$ 0,00 ^b	0,00 $\pm$ 0,00 ^b	4,64 $\pm$ 0,34 ^a
citronelal	1156	1152	4	0,85 $\pm$ 0,88 ^a	0,00 $\pm$ 0,00 ^a	0,49 $\pm$ 0,69 ^a	0,00 $\pm$ 0,00 ^a
decanal	1209	1210	-1	9,08 $\pm$ 0,68 ^a	8,29 $\pm$ 5,68 ^a	9,44 $\pm$ 3,01 ^a	10,28 $\pm$ 2,62 ^a
neral	1245	1242	3	0,11 $\pm$ 0,01 ^a	0,00 $\pm$ 0,00 ^b	0,00 $\pm$ 0,00 ^b	0,00 $\pm$ 0,00 ^b
2-decenal	1268	1264	4	0,04 $\pm$ 0,02 ^a	0,00 $\pm$ 0,00 ^a	0,21 $\pm$ 0,13 ^a	0,11 $\pm$ 0,11 ^a
aldeído perílico	1282	1274	8	1,73 $\pm$ 0,06 ^b	2,62 $\pm$ 0,06 ^a	1,95 $\pm$ 0,45 ^b	1,78 $\pm$ 0,08 ^b
undecanal	1311	1307	4	0,22 $\pm$ 0,05 ^a	0,18 $\pm$ 0,07 ^a	0,23 $\pm$ 0,08 ^a	0,44 $\pm$ 0,17 ^a
dodecanal	1412	1407	5	1,71 $\pm$ 0,05 ^a	2,48 $\pm$ 0,79 ^a	2,38 $\pm$ 0,63 ^a	1,93 $\pm$ 0,11 ^a
tridecanal	1516	1512	4	0,03 $\pm$ 0,00 ^{a,b}	0,00 $\pm$ 0,00 ^b	0,00 $\pm$ 0,00 ^b	0,05 $\pm$ 0,02 ^a
α -sinensal	1756	1758	-2	0,12 $\pm$ 0,01 ^b	0,14 $\pm$ 0,01 ^b	0,17 $\pm$ 0,02 ^a	0,00 $\pm$ 0,00 ^c
hexadecanal	1822	1822	0	0,00 $\pm$ 0,00 ^b	0,07 $\pm$ 0,03 ^a	0,03 $\pm$ 0,01 ^{a,b}	0,05 $\pm$ 0,01 ^a
Cetonas							
carvona	1251	1250	1	0,61 $\pm$ 0,02 ^b	0,64 $\pm$ 0,06 ^{a,b}	0,94 $\pm$ 0,23 ^a	0,27 $\pm$ 0,01 ^c
isopiperitona	1778	-	-	0,00 $\pm$ 0,00 ^b	0,00 $\pm$ 0,00 ^b	0,35 $\pm$ 0,07 ^a	0,00 $\pm$ 0,00 ^b

Continuação da Tabela 8

geranil acetona	1452	1454	-2	0,48±0,04 ^a	0,41±0,18 ^a	0,48±0,25 ^a	0,76±0,10 ^a
nootkatone	1810	1807	3	0,00±0,00 ^b	0,00±0,00 ^b	0,09±0,01 ^a	0,00±0,00 ^b
Ésteres							
acetato de terpinila	1349	1351	-2	0,23±0,05 ^a	0,30±0,02 ^a	0,21±0,08 ^a	0,23±0,02 ^a
acetato de citronelila	1352	1351	1	0,14±0,04 ^b	0,19±0,00 ^b	0,21±0,07 ^{a,b}	0,31±0,01 ^a
acetato de nerila	1361	1361	0	0,49±0,06 ^{a,b}	0,51±0,06 ^{a,b}	0,55±0,15 ^a	0,29±0,01 ^b
acetato de geranila	1382	1382	0	0,29±0,03 ^b	0,48±0,06 ^{a,b}	0,71±0,23 ^a	0,49±0,02 ^{a,b}
acetato de p-ment-1-en-9-ila	1423	1424	-1	0,00±0,00 ^c	0,06±0,00 ^b	0,15±0,04 ^a	0,06±0,00 ^b
Hidrocarbonetos							
tridecano	1298	1300	-2	0,30±0,07 ^b	0,64±0,23 ^a	0,16±0,04 ^b	0,41±0,04 ^{a,b}
tetradecano	1398	1400	-2	0,44±0,04 ^{a,b}	0,61±0,29 ^a	0,81±0,24 ^a	0,00±0,00 ^b
hexadecano	1599	1600	-1	0,11±0,02 ^a	0,11±0,03 ^a	0,09±0,02 ^a	0,12±0,01 ^a
Monoterpenos							
α-pineno	938	939	-1	5,51±0,86 ^{a,b}	9,81±2,77 ^a	8,18±1,98 ^{a,b}	5,05±0,70 ^b
sabineno	976	979	-3	2,73±0,68 ^a	5,48±2,37 ^a	2,69±0,76 ^a	2,18±0,62 ^a
β-pineno	983	984	-1	2,31±0,56 ^a	3,93±1,48 ^a	2,13±0,57 ^a	1,79±0,43 ^a
mirceno	993	992	1	24,70±4,58 ^{a,b}	41,17±12,96 ^a	30,95±5,60 ^{a,b}	19,42±1,79 ^b
limoneno	1034	1034	0	*	*	*	*
terpinoleno	1089	1089	0	0,09±0,01 ^b	0,40±0,05 ^a	0,08±0,02 ^b	0,06±0,00 ^b
Sesquiterpenos							
α-copaeno	1374	1372	2	0,00±0,00 ^b	0,00±0,00 ^b	0,43±0,15 ^a	0,00±0,00 ^b
β-elemeneno	1388	1391	-3	0,10±0,01 ^b	0,26±0,03 ^b	0,82±0,22 ^a	0,15±0,02 ^b
β-cariofileno	1418	1419	-1	0,14±0,00 ^b	0,26±0,04 ^b	0,51±0,14 ^a	0,15±0,01 ^b
β-ilangeno	1429	1422	7	0,00±0,00 ^c	0,09±0,01 ^b	0,21±0,06 ^a	0,00±0,00 ^c
spirolepechineno	1447	1450	-3	0,00±0,00 ^b	0,07±0,00 ^b	0,26±0,10 ^a	0,06±0,00 ^b
germacreno D	1480	1481	-1	0,00±0,00 ^b	0,05±0,02 ^b	0,16±0,05 ^a	0,00±0,00 ^b
β-Chamigreno	1483	1476	7	0,00±0,00 ^b	0,17±0,01 ^b	0,83±0,31 ^a	0,20±0,01 ^b

Continuação da Tabela 8

valenceno	1493	1491	2	1,17±0,01 ^b	3,43±0,37 ^b	12,41±1,86 ^a	2,39±0,30 ^b
α-selineno	1495	1494	1	0,09±0,02 ^b	0,25±0,06 ^b	1,35±0,26 ^a	0,00±0,00 ^b
ledeno	1502	1497	5	0,00±0,00 ^b	0,00±0,00 ^b	0,29±0,08 ^a	0,00±0,00 ^b
α-farneseno	1504	1506	-2	0,09±0,02 ^c	0,22±0,04 ^b	0,32±0,03 ^a	0,20±0,05 ^b
ω-cadineno	1518	1526	-8	0,28±0,00 ^b	0,50±0,04 ^b	1,42±0,17 ^a	0,33±0,04 ^b

LTPRI_{Calc.} = índice de retenção obtido experimentalmente (calculado); LTPRI_{Teor.} = índice de retenção encontrado na literatura (teórico); Δ = diferença entre os índices de retenção teórico e calculado; LTPRI_{Teor.} - LTPRI_{Calc.}; * o limoneno não foi quantificado, pois sua alta concentração saturava o detector do equipamento. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas significativas a p<0,05 por ANOVA e Tukey. Fonte: autoria própria.

A Figura 20 ilustra um cromatograma típico dos voláteis do suco fresco de tangerinas Fremont IAC 543.

Figura 20. Cromatograma do suco fresco de tangerinas Fremont IAC 543 porta-enxertada com limão Cravo por GC-MS. Em destaque: 1. mirceno; 2. limoneno (omitido na corrida); 3. linalol; 4. decanal; 5. valenceno.

Fonte: Autoria própria.

Barboni et al. (2009) estudaram a composição de voláteis do suco de várias tangerinas híbridas e quantificaram 44 voláteis. Estes autores sugeriram que é possível discriminar diferentes híbridos de cruzamentos entre tangerina e Clementine (*Citrus reticulata* × *Citrus sinensis*) através da razão entre quantidade de limoneno e γ -terpineno. Em nosso trabalho não identificamos o composto γ -terpineno nas amostras analisadas.

Quando comparamos a composição dos voláteis dos sucos integrais das amostras de tangerina Fremont IAC 543 cultivadas nos diferentes porta-enxertos verificamos como majoritários o limoneno (o qual foi omitido nas corridas cromatográficas devido à alta intensidade do pico que saturava o detector), mirceno (24,93 a 34,82%), linalol (10,54 a 25,85%), decanal (6,66 a 13,12%), α -pineno (6,29 a 8,35%). Diferente dos óleos essenciais, houve bastante variação na composição dos sucos integrais de acordo com o porta-enxerto utilizado. Há casos em que se encontram compostos presentes em apenas uma das variedades como, por exemplo, o octanal e o nonanal que foram identificados apenas na variedade plantada sobre o porta-enxerto de trifoliata *Flying Dragon*, enquanto os compostos isopiperitona e α -copaeno foram identificados apenas no suco fresco obtido da planta enxertada com trifoliata. Também há outros casos em que não foi identificado um composto em apenas uma das variedades como, por exemplo, o hexadecanal, que estava ausente apenas na amostra cultivada sobre o porta-enxerto de limão Cravo e assim como 2-decanal que não foi

identificado na amostra cultivada sobre o porta-enxerto de citrumelo Swingle. Tal fato evidencia uma influência do porta-enxerto na composição dos voláteis do suco fresco das tangerinas investigadas nesta pesquisa. Assim, dada a diferença na quantidade dos compostos considerados como os principais para o aroma do suco de tangerina, espera-se que as diferentes variedades apresentem diferentes respostas sensoriais de odor.

4.5 Análise dos compostos não voláteis no suco fresco das Tangerinas Fremont IAC 543 por RMN

As Figuras 21 e 22 apresentam a comparação entre os espectros de ressonância magnética nuclear de ^1H 600 MHz dos diferentes sucos de tangerinas cultivadas em diferentes porta-enxertos e as Figuras 23, 24 e 25 ilustram três faixas de deslocamento químico, apontando os compostos identificados. A primeira região, até 2,0 ppm, caracteriza-se pela presença de aminoácidos. A segunda região, que compreende de 2,0 a 5,0 ppm, observamos os sinais correspondentes aos açúcares e aos ácidos. Por fim, a terceira região, acima de 6,5 ppm, notamos novamente a presença de sinais correspondentes a aminoácidos.

Figura 21. Espectro de ressonância magnética nuclear de ^1H 600 MHz do suco integral de tangerinas Fremont IAC 543 cultivada em diferentes porta-enxertos. Região de deslocamento químico de 0,8 a 5,8 ppm.

Figura 22. Espectro de ressonância magnética nuclear de ^1H 600 MHz do suco integral de tangerinas Fremont IAC 543 cultivada em diferentes porta-enxertos. Região de deslocamento químico de 6,0 a 10,0 ppm.

Figura 23. Espectro de ressonância magnética nuclear de ^1H 600 MHz do suco integral de tangerinas Fremont IAC 543 porta-enxertada com limão Cravo. Região de deslocamento químico de 1 a 2,5 ppm.

GABA = ácido gama-aminobutírico. Fonte: Autoria própria.

Figura 24. Espectro de ressonância magnética nuclear de ^1H 600 MHz do suco integral de tangerinas Fremont IAC 543 porta-enxertada com limão Cravo. Região de deslocamento químico de 1 a 5,5 ppm.

Fonte: Autoria própria.

Figura 25. Espectro de ressonância magnética nuclear de ^1H 600 MHz do suco integral de tangerinas Fremont IAC 543 porta-enxertada com limão Cravo. Região de deslocamento químico de 6,5 a 9 ppm.

Fonte: Autoria própria.

A Tabela 9 a seguir resume as áreas dos principais compostos identificados por RMN nos sucos das tangerinas Fremont IAC 543 plantadas em diferentes porta-enxertos.

Tabela 9. Compostos não voláteis identificados em suco fresco de tangerina Fremont IAC 543 cultivadas em diferentes porta-enxertos por RMN ^1H 600 MHz.

Composto	Desloamento Químico (ppm)	Área Bruta do Espectro ($\times 10^{-6}$)			
		Limão Cravo	Citrumelo Swingle	Trifoliata	T. F. Dragon
Ácido Cítrico	2.56	170,51 $\pm$ 5,94 ^c	265,09 $\pm$ 5,76 ^a	249,68 $\pm$ 3,23 ^a	231,79 $\pm$ 7,90 ^b
Ácido Málico	4.30	65,34 $\pm$ 12,17 ^a	28,51 $\pm$ 1,12 ^b	44,00 $\pm$ 0,47 ^b	42,81 $\pm$ 1,54 ^b
Alanina	1.48	8,20 $\pm$ 1,12 ^b	8,47 $\pm$ 0,40 ^b	10,30 $\pm$ 0,14 ^a	7,47 $\pm$ 0,32 ^b
Etanol	1.18	29,88 $\pm$ 1,18 ^b	34,28 $\pm$ 1,76 ^a	22,22 $\pm$ 0,37 ^c	4,23 $\pm$ 0,53 ^d
Glicose	4.65	111,81 $\pm$ 5,41 ^c	135,57 $\pm$ 4,10 ^b	153,60 $\pm$ 3,85 ^a	110,70 $\pm$ 2,27 ^c
Sacarose	5.41	472,83 $\pm$ 4,26 ^b	368,14 $\pm$ 10,17 ^c	567,62 $\pm$ 8,03 ^a	466,27 $\pm$ 16,38 ^b
Tirosina	7.34	2,86 $\pm$ 0,31 ^a	2,70 $\pm$ 0,11 ^{a,b}	2,43 $\pm$ 0,03 ^{a,b}	2,31 $\pm$ 0,09 ^b

Fonte: Autoria própria. Letras diferentes em uma mesma linha indicam diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$) por ANOVA e Tukey.

A variedade plantada sobre o porta-enxerto de limão Cravo apresentou as maiores áreas de ácido málico e tirosina. A amostra cultivada sobre o porta-enxerto de citrumelo Swingle apresentou maiores áreas de ácido cítrico e etanol. A tangerina enxertada com trifoliata apresentou maiores áreas de alanina, glicose e sacarose. A tangerina cultivada com porta-enxerto de trifoliata *Flying Dragon* apresentou menor área de etanol.

A presença de etanol nos sucos possivelmente está relacionada ao metabolismo pós-colheita da fruta a qual, através da enzima álcool desidrogenase, transforma o acetaldeído em etanol. O etanol é também associado ao amadurecimento da fruta, tendo influência da remoção da adstringência e na formação de compostos voláteis (Pesis, 2005).

O sabor e o gosto da tangerina são diretamente afetados pela quantidade de açúcares e ácidos presentes no suco, de modo que a relação entre a sacarose, a glicose o ácido cítrico e o ácido málico, é comumente utilizada como parâmetro de qualidade da fruta, uma vez que os açúcares são responsáveis pela sensação do gosto doce, enquanto os ácidos pela sensação do gosto azedo (Lado et al., 2018; Putnik et al., 2017; Bermejo et al., 2016).

Em termos nutricionais, os sucos apresentam açúcares principalmente na forma de glicose, frutose e sacarose, sendo uma importante fonte de energia. Alguns fatores como a variedade da fruta, maturidade e efeitos climáticos podem causar variação na composição desses carboidratos. Em um estudo realizado considerando diversos frutos, foi observado que, para o suco de tangerina, a proporção de glicose, frutose e sacarose é cerca de 1:1:3, com valores encontrados de $2,22 \pm 0,05$ g 100 mL^{-1} , $2,44 \pm 0,07$ g 100 mL^{-1} e $6,16 \pm 0,46$ g 100 mL^{-1} , respectivamente (Sanz; Villamiel; Martínez-Castro, 2004). Metabolicamente, a sacarose é a principal forma de transporte dos carboidratos na maioria das plantas, sendo um dissacarídeo que produz a glicose e frutose por hidrólise. Como esses açúcares são solúveis em água, juntos seus teores estão relacionados com o gosto doce das frutas (Vicente et al, 2009).

Os aminoácidos livres estão presentes nos sucos devido a sua solubilidade em água e são considerados importantes em relação à qualidade sensorial e tecnológica dos produtos finais, além do aspecto da autenticidade da matéria-prima. A composição dos aminoácidos livres pode ser influenciada por diversos fatores, tais como: condições climáticas, fatores culturais, época de colheita e maturação da fruta (Oliveira et al., 2002).

Quando se examina os sabores dos aminoácidos, estes podem ser classificados como amargos ou doces. A L-tirosina apresenta uma estrutura química hidrofóbica e possui gosto amargo enquanto a L-alanina também apresenta estrutura hidrofóbica, mas apresenta gosto doce. A característica hidrofóbica está associada ao gosto amargo,

estando a L-tirosina entre os principais contribuintes para este gosto. As formas enantioméricas D de aminoácidos são conhecidas por serem muitas vezes mais doces do que as formas enantioméricas L. Dos 21 aminoácidos metabolizados pelo corpo humano, apenas a L-alanina e a glicina possuem capacidade edulcorante significativa. Os aminoácidos hidrofóbicos na forma D podem ser até mais doces do que a sacarose. A alanina é um dos aminoácidos mais empregados na construção de proteínas, é caracterizada como glicogênica por converter-se em glicose no fígado, sendo, portanto, uma fonte de energia além de auxiliar na produção de anticorpos (Aditivos-aminoácidos, 2016).

4.6 Análises quimiométricas

Os resultados das análises de óleos essenciais, voláteis e não voláteis do suco fresco das tangerinas foram submetidos à Análise de Componentes Principais a fim de visualizar a variabilidade máxima dos grupos de amostras, identificar padrões, correlacionar as amostras conforme o porta-enxerto e a composição da matriz analisada. A matriz de dados era composta de 4 amostras em triplicata (totalizando 12 indivíduos analisados) e 59 variáveis para os dados de óleo essencial, 48 variáveis para os dados de compostos voláteis do suco e 7 variáveis para os compostos não voláteis presentes nos sucos, as quais tiveram seus valores auto-escalados para que todas as variáveis exercessem a mesma influência na PCA. Os resultados da análise de PCA podem ser observados nas Figuras 26 a 31.

Pelo gráfico de *Scores* é possível observar que as amostras são diferenciáveis entre si utilizando individualmente as informações de composição dos óleos essenciais, compostos voláteis e compostos não voláteis presentes nos sucos. A PC1 é capaz de separar as quatro amostras nos três casos, enquanto a PC2 não é capaz de diferir as amostras trifoliata e trifoliata *Flying Dragon* em termos de óleo essencial e compostos voláteis; enquanto que o mesmo ocorre para as amostras limão Cravo, citrumelo Swingle e Trifoliata em relação aos compostos não voláteis presentes nos sucos. Através da análise do gráfico de *Loadings* é possível observar quais variáveis são responsáveis pela separação das amostras na PCA.

Figura 26. Gráfico de *Scores* das duas primeiras componentes principais (PC1 e PC2) da PCA dos óleos essenciais das Tangerinas Fremont IAC 543 porta-enxertadas com limão Cravo (1, 2 e 3), citrumelo Swingle (4, 5 e 6) trifoliata (7, 8 e 9) e trifoliata *Flying Dragon* (10, 11 e 12).

Fonte: Autoria própria.

Figura 27. Gráfico de *Loadings* das duas primeiras componentes principais (PC1 e PC2) da PCA dos óleos essenciais das Tangerinas Fremont IAC 543 plantadas em diferentes porta-enxertos.

Variáveis codificadas em números são: 1. α -tujeno; 2. α -pineno; 3. canfeno; 4. sabinene; 5. β -pineno; 6. mircenol; 7. octanal; 8. limoneno; 9. ocimeno; 10. γ -terpineno; 11. terpinoleno; 12. linalol; 13. trans-p-menta-2,8-dien-1-ol; 14. cis-p-menta-2,8-dien-1-ol; 15. trans-p-ment-2-en-1-ol; 16. citronelal; 17. isopulegol; 18. terpinen-4-ol; 19. p-menta-1(7),8-dien-2-ol; 20. α -terpineol; 21. decanal; 22. cis-carveol; 23. eucarvona; 24. neral; 25. carvona; 26. 2-decenal; 27. aldeído perfílico; 28. álcool perfílico; 29. acetato de dihidrocarvila; 30. 2,4-decadienal; 31. acetato de α -terpinila; 32. acetato de citronelila; 33. acetato de nerila; 34. α -cubebeno; 35. acetato de geranila; 36. β -cubebeno; 37. β -elemeno; 38. β -cariofileno; 39. β -copaeno; 40. β -gurjuneno; 41. α -guaieno; 42. acetato de perila; 43. β -farneseno; 44. α -humuleno; 45. germacreno D; 46. valenceno; 47. α -muuroleno; 48. α -farneseno; 49. δ -cadineno; 50. β -sesquifelandreno; 51. elemol; 52. nerolidol; 53. aldeído mirístico; 54. intermedeol; 55. pentadecanal; 56. α -sinensal; 57. hexadecanal; 58. ácido palmítico; 59. ácido linoleico. Fonte: Autoria própria.

Para os dados de óleo essencial, através da análise dos compostos da PC1 e comparando-os com os valores da Tabela 5, podemos observar que a variedade plantada com o porta-enxerto de limão Cravo possui maior quantidade relativa de linalol (12) e aldeído perílico (27); a variedade enxertada em citrumelo Swingle possui maiores teores de álcool perílico (28) e octanal (7); a variedade enxertada em trifoliata *Flying Dragon* possui maiores teores de α -pineno (2), citronelal (16) e β -copaeno (39). De forma análoga, avaliando a PC2, podemos observar que a variedade enxertada em limão Cravo possui maiores teores de trans-p-ment-2,8-dien-1-ol (13), eucarvona (23) e β -gurjuneno (40), enquanto a variedade enxertada em citrumelo Swingle possui maior teor de Sabineno (4).

Figura 28. Gráfico de *Scores* das duas primeiras componentes principais (PC1 e PC2) da PCA dos compostos voláteis dos sucos integrais das Tangerinas Fremont IAC 543 porta-enxertadas com limão Cravo (1, 2 e 3), citrumelo Swingle (4, 5 e 6) trifoliata (7, 8 e 9) e trifoliata *Flying Dragon* (10, 11 e 12).

Fonte: Autoria própria.

Figura 29. Gráfico de *Loadings* das duas primeiras componentes principais (PC1 e PC2) da PCA dos compostos voláteis dos sucos integrais das Tangerinas Fremont IAC 543 plantadas em diferentes porta-enxertos.

Variáveis codificadas em números são: 1. α -pineno; 2. sabineno; 3. β -pineno; 4. mircenol; 5. octanal; 6. terpinoleno; 7. linalol; 8. nonanal; 9. trans-p-menta-2,8-dien-1-ol; 10. cis-p-menta-2,8-dien-1-ol; 11. citrônalo; 12. terpinen-4-ol; 13. α -terpineol; 14. decanal; 15. trans-carveol; 16. citrônalo; 17. neral; 18. carvona; 19. 2-decenal; 20. isopiperitona; 21. aldeído perílico; 22. tridecano; 23. undecanal; 24. acetato de terpinila; 25. acetato de citrônalo; 26. acetato de nerila; 27. α -copaeno; 28. acetato de geranila; 29. β -elemeno; 30. tetradecano; 31. dodecano; 32. β -cariofileno; 33. acetato de p-ment-1-en-9-ila; 34. β -ilangeno; 35. spirolepechineno; 36. acetona de geranila; 37. germacreno D; 38. β -chamigreno; 39. valenceno; 40. α -selineno; 41. ledeno; 42. α -farneseno; 43. tridecano; 44. ω -cadineno; 45. hexadecano; 46. α -sinensal; 47. *nootkatone*; 48. hexadecanal. Fonte: Autoria própria.

Para os dados de compostos voláteis no suco, através da análise dos compostos distribuídos nas PCs e comparando-os com os valores da Tabela 8, podemos observar que a variedade plantada com o porta-enxerto de limão Cravo possui maior quantidade de terpinen-4-ol (12) e α -terpineol (27) e é a única variedade que apresentou o composto neral (17); a variedade plantada com citrumelo Swingle possui maiores quantidades de tridecano (22) e hexadecanal (48); a variedade plantada com trifoliata possui maiores teores de sesquiterpenos como β -elemeno (29) e β -cariofileno (32), além de ser a única variedade que apresentou os compostos isopiperitona (20), α -copaeno (27) ledeno (41) e *nootkatone* (47); a variedade plantada com trifoliata *Flying Dragon* possui maiores teores de undecanal (23) e acetato de citrônalo (25), sendo a única variedade a apresentar os compostos octanal (5) e nonanal (8).

Figura 30. Gráfico de *Scores* das duas primeiras componentes principais (PC1 e PC2) da PCA dos compostos não voláteis identificados por RMN presentes nos sucos integrais das Tangerinas Fremont IAC 543 porta-enxertadas com limão Cravo (1, 2 e 3), citrumelo Swingle (4, 5 e 6) trifoliata (7, 8 e 9) e trifoliata *Flying Dragon* (10, 11 e 12).

Fonte: Autoria própria.

Figura 31. Gráfico de *Loadings* das duas primeiras componentes principais (PC1 e PC2) da PCA dos compostos não voláteis identificados por RMN presentes nos sucos integrais das Tangerinas Fremont IAC 543 plantadas em diferentes porta-enxertos.

Variáveis codificadas em números são: 1. ácido cítrico; 2. ácido málico; 3. alanina; 4. etanol; 5. glicose; 6. sacarose; 7. tirosina. Fonte: Autoria própria.

Para os dados de compostos não voláteis presentes nos sucos integrais, através da análise dos componentes das PCs e comparando-os com os valores da Tabela 9, podemos observar que a variedade plantada com o porta-enxerto de limão Cravo possui maior quantidade de ácido málico (2) e tirosina (7); a variedade plantada com citrumelo

Swingle possui maior quantidade de etanol (4); a variedade plantada com trifoliata possui maiores teores de alanina (3) e glucose (5); a variedade plantada com trifoliata *Flying Dragon* possui menor teor de etanol (4).

Assim, como foi observado, a partir da correlação entre os gráficos de *Scores* e *Loadings*, é possível diferenciar as amostras com base na análise de seus componentes de óleo essencial e compostos voláteis e não-voláteis do suco integral.

5. CONCLUSÕES

Os teores de óleos essenciais das tangerinas investigadas variaram de 0,36% a 0,47%, sendo que a tangerina cultivada em porta-enxerto de citrumelo Swingle foi a que apresentou maior produtividade de óleo essencial. Devido à maior produtividade da variedade cultivada sobre o porta-enxerto de citrumelo Swingle (52,2 L ha⁻¹), esta é a mais indicada para produção de óleo essencial de tangerina dentre as variedades investigadas. Verificou-se que a melhor condição para extrair os voláteis do suco é utilizando a fibra de DVB/PDMS, temperatura de extração de 43 °C durante 31 min. Diferente dos óleos essenciais, houve bastante variação na composição dos sucos integrais de acordo com o porta-enxerto utilizado. Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear mostraram que os sucos das quatro amostras analisadas possuem perfis complexos, porém semelhantes. Através da análise quimiométrica (PCA), foi possível diferenciar as amostras a partir da análise de seus componentes de óleo essencial e compostos voláteis e não-voláteis do suco de cada uma das variedades enxertadas nos diferentes porta-enxertos.

6. REFERÊNCIAS

ADITIVOS-ÁCIDOS. Disponível em:
<http://aditivosingredientes.com.br/upload_arquivos/201609/2016090363220001474476544.pdf>. Acesso em: 23-01-19.

ADITIVOS-AMINOÁCIDOS. Disponível em:
<http://aditivosingredientes.com.br/upload_arquivos/201603/2016030096000001459173448.pdf>

ALVAREZ, R. Q.; PASSARO, C. C.; LARA, O. G.; LONDONO, J. L. Relationship between chromatographic profiling by HS-SPME and sensory quality of mandarin juices: effect of squeeze technology. **Procedia Food Science**, v. 1, p. 1396 – 1403, 2011. DOI: 10.1016/j.profoo.2011.09.207.

ANDREW, R. L.; KESZEI, A.; FOLEY, W. J. Intensive sampling identifies previously unknown chemotypes, population divergence and biosynthetic connections among terpenoids in *Eucalyptus tricarpa*. **Phytochemistry**, v. 94, p. 148-158, 2013. DOI: 10.1016/j.phytochem.2013.05.002.

ASIKIN, Y.; KAWAHIRA, S.; GOKI, M.; HIROSE, N.; KYODA, S.; WADA, K. Extended aroma extract dilution analysis profile of Shiikuwasha (*Citrus depressa* Hayata) pulp essential oil. **Journal of Food and Drugs Analysis**, v. 26, p. 268-276, 2018. DOI: 10.1016/j.jfda.2017.04.002.

BARBONI, T.; LURO, F.; CHIARAMONTI, N.; DESJOBERT, J.-M.; MUSELLI, A.; COSTA, J. Volatile composition of hybrids *Citrus* juices by headspace solid-phase micro extraction/gas chromatography/mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 116, p. 382 – 390, 2009. DOI:10.1016/j.foodchem.2009.02.031.

BASER, K. H. C.; BUCHBAUER, G. **Handbook of essential oils: science, technology and applications**. Boca Raton: CRC Press, Taylor & Francis Group, 2016. 2 ed. 1114 p. ISBN 9781466590465.

BERGER, R.G. **Flavours and fragrances: Chemistry, bioprocessing and sustainability**. Leipzig: Springer, 2007. 648 p. ISBN 978-3-540-49338-9.

BERMEJO, A.; PARDO, J. L.; MORALES, J.; CANO, A. Comparative Study of Bioactive Components and Quality from Juices of Different Mandarins: Discriminant

Multivariate Analysis of Their Primary and Secondary Metabolites. **Agricultural Sciences**, v. 7, n. 6, p. 341-351, 2016. DOI: 10.4236/as.2016.76035.

BICCHI, C.; JOULAIN, D. Techniques for preparing essential oils and aromatic extracts. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 33, p. 133-134, 2018. DOI: 10.1002/ffj.3433.

BICCHI, C.; LIBERTO, E.; MATTEODO, M.; SGORBINI, B.; MONDELLO, L.; ZELLNER, B. A.; COSTA, R.; RUBIOLO, P. Quantitative analysis of essential oils: a complex task. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 23, p. 382-391, 2008. DOI: 10.1002/ffj.1905

BIZZO, H. R. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 588-594, 2009.

BOELEN, M. H. Volatile compounds in food-database (from Volatile Compounds in Food, Qualitative and Quantitative Data, 7th ed., (1996), Supplement 1 (1997) and Supplement 2 (1999), TNO Nutrition and Food Research Institute, Zeist, The Netherlands, 2000.

BOGUSZ JUNIOR, S.; MELO, A. M. T.; ZINI, C. A.; GODOY, H. T. Optimization of the extraction conditions of the volatile compounds from chili peppers by headspace solid phase micro-extraction. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, p. 3345–3350, 2011. DOI:10.1016/j.chroma.2010.12.060.

Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Decreto nº 2.314, de 04 de setembro de 1997. Regulamenta a Lei nº 8.918, de 14 de julho de 1994, que dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas.

Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Decreto nº 3.510, de 16 de junho de 2000. Altera dispositivos do Regulamento aprovado pelo Decreto nº 2.314, de 4 de setembro de 1997, que dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas.

Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Lei nº 8.918, de 14 de Julho de 1994. Dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas, autoriza a criação da comissão intersectorial de bebidas e dá outras providências.

Brasil. Resolução RDC nº 259, de 20 de setembro de 2002. A Diretoria Colegiada da ANVISA/MS aprova o regulamento técnico para rotulagem de alimentos embalados. Diário Oficial da União. 2002; 23 set; (184):33; Seção 1.

BREITMAIER, E. **Terpenes:** flavors, fragrances, pharma, pheromones. Wiley-VCH, 2006, 214 p. ISBN 3-527-31786-4

CHARVE, J.; CHEN, C.; HEGEMAN, A. D.; REINECCIUS, G. A. Evaluation of instrumental methods for the untargeted analysis of chemical stimuli of orange juice flavor. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 26, p. 429 – 440, 2011. DOI: 10.1002/ffj.2078.

CHEMESTHESIS. Society of Sensory Professionals, 2019. What is “chemesthesis?”. Disponível em: <<https://www.sensorysociety.org/knowledge/sspwiki/Pages/chemesthesis.aspx?fbclid=IwAR1djHkpFcYrcLCmH-RhhVvqfulLRDqYnB3Y7oNZapDcq8TjgR4PoofWQnk>>. Acesso em: 28-01-19.

CHOI H.-S. Volatile constituents of satsuma mandarins growing in Korea. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 19, p. 406 – 412, 2004. DOI: 10.1002/ffj.1283.

Cultura Mix. Disponível em: <<http://flores.culturamix.com/flores/naturais/como-fazer-enxerto-de-rosas>> Acesso em: 07 jan. 2018.

DUGO, G.; BONACCORSI, I.; SCIARRONE, D.; SCHIPILLITI, L.; RUSSO, M.; COTRONEO, A.; DUGO, P.; MODELLO, L.; RAYMO, V. Characterization of cold-pressed and processed bergamot oils by using GC-FID, GC-MS, GC-C-IRMS, enantio-GC, MDGC, HPLC and HPLC-MS-IT-TOF. **The Journal of Essential Oil Research**, v. 24, n. 2, p. 93-117, 2012.

DUGO, G.; DI GIACOMO, A. Citrus: The Genus Citrus. In: Medicinal and Aromatic Plants – Industrial Profiles. New York: Taylor & Francis, 2002. V. 26. 642 p.

DUGO, P.; BONACCORSI, I.; RAGONESE, C.; RUSSO, M.; DONATO, P.; SANTI, L.; MONDELLO, L. Analytical characterization of mandarin (*Citrus deliciosa* Ten.) essential oil. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 26, p. 34-46, 2011. DOI: 10.1002/ffj.2014

DUGO, P.; MONDELLO, L.; FAVOINO, O.; CICERO, L.; ZENTENO, N.A.R.; DUGO, G. Characterization of cold-pressed Mexican dancy tangerine oils. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 20, p. 60 – 66, 2005. DOI: 10.1002/ffj.1367.

EBERL, M.; HINTZ, M.; REICHENBERG, A.; KOLLAS, A.; WIESNER, J.; JOMAA, H. Microbial isoprenoid biosynthesis and human $\gamma\delta$ T cell activation. **FEBS Letters**, v.544, p. 4-10, 2003. DOI: 10.1016/S0014-5793(03)00483-6.

EUROPEAN Pharmacopeia, 6th ed. Strasbourg: Council of Europe, 2007-2010. Ph. Eur. 2355: *Citri reticulatae aetheroleum* (Óleo essencial de Tangerina).

FALLEIROS, A.B.; BERTO-JÚNIOR V. Comunidade de Insetos Frugívoros de Averrhoa carambola L. (Oxalidaceae): Efeito do Estágio de Maturação e do Peso dos Frutos. **Interbio**, v.6, n.2, 2012. ISSN 1981-3775.

FANCIULLINO, A.; TOMI, F.; LURO, F.; DESJOBERT, J. M.; CASANOVA, J. Chemical variability of peel and leaf oil mandarins. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 21, p. 359 – 367, 2006. DOI: 10.1002/ffj.1658.

FAO - Food and Agriculture Organization. Faostat: Statistical database. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>>. Acesso em: 07 jan. 2018.

FEGER, W.; BRANDAUER, H.; ZIEGLER, H. Analytical investigation of Murcott (honey) tangerine peel oil. **Journal of Essential Oil Research**, v. 15, n. 3, p. 143 – 147, 2003. DOI: 10.1080/10412905.2003.9712097.

GHOSH, S.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U. C. Production of shikimic acid. **Biotechnology Advances**, v. 30, p. 1425-1431, 2012. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2012.03.001.

GOFF, S. A.; KLEE, H. J. Plant volatile compounds: sensory cues for health and nutritional value? **Science**, v. 311, p. 815–819, 2006.

GOLDENBERG, L.; YANIV, Y.; DORON-FAINGENBOIM, A.; CARMI, N.; PORAT, R. Diversity among mandarin varieties and natural sub-groups in aroma volatiles compositions. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 96, p. 57 – 65, 2016. DOI 10.1002/jsfa.7191

GOLDENBERG, L.; YANIV, Y.; PORAT, R.; CARMI, N. Mandarin fruit quality: a review. **Journal of the Science Food and Agriculture**, v. 98, p. 18-26, 2018. DOI: 10.1002/jsfa.8495.

GONÇALVES, D.; COSTA, P.; RODRIGUES, C. E. C.; RODRIGUES, A. E. Effect os *citrus sinensis* essential oil deterpenation on the aroma profile of the phases obtained by solvente etraction. **The Journal of Chemical Thermodynamics**, v. 116, p. 166-175, 2018. DOI: 10.1016/j.jct.2017.09.011.

GROSCH, W. Evaluation of the key odorants of foods by dilution experiments, aroma models ans omission. **Chemical Senses**, v. 26, p. 533-45, 2001.

HASHEMI, S. M. B.; KHANEGHAH, A. M.; SANT'ANA, A. S. **Essential Oils in Food Processing: Chemistry, Safety and Applications**. John Wiley & Sons, 2018.

HUNTER, W. N. The non-mevalonate pathway of isoprenoid precursor biosynthesis. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 30, p. 21573–21577, 2007. DOI: 10.1074/jbc.R700005200.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/Tabela/1613#resultado>>. Acesso em: 07 jan. 2018.

IEA – Instituto de Economia Agrícola. Disponível em: <<http://www.iesa.gov.br/out/TerTexto.php?codTexto=13565>>. Acesso em: 15 jan. 2018.

JIANG, S.; SINGH, G. Chemical synthesis of shikimic acid and its analogues. **Tetrehedron**, v. 54, p. 4697-4753, 1998.

KAMAL, G. M.; ANWAR, F.; HUSSAIN, A. I.; SARRI, N. ASHRAF, M. Y. Yeild and chemical composition of *Citrus* essential oils as affected by drying pretreatment of peels. **International Food Research Journal**, v. 18, n. 4, p. 1275 – 1282, 2011.

KOUGAN, G. B.; TABOPDA, T.; KUETE, V.; VERPOORTE, R. Simple phenols, phenolic acids, and related esters from the medicinal plants of Africa. In: **MEDICINAL plant research in Africa: pharmacology and chemistry**. Elsevier, 2013. 1^a Ed., p. 225-249. DOI: 10.1016/B978-0-12-405927-6.00006-0.

KUETE, V. Phenylpropanoids and related compounds from the medicinal plants of africa. In: **MEDICINAL plant research in Africa: pharmacology and chemistry**. Elsevier, 2013. 1^a Ed., p. 251-260. DOI: 10.1016/B978-0-12-405927-6.00007-2.

LADO, J.; GAMBETTA, G.; ZACARIAS, L. Key determinants of citrus fruit quality: Metabolites and main changes during maturation. **Scientia Horticulturae**, v. 233, p. 238-248, 2018. DOI: 10.1016/j.scienta.2018.01.055.

LI, Y.; WU, C.; WU, T.; WANG, L.; CHEN, S.; DING, T.; HU, Y. Preparation and characterization of citrus essential oils loaded in chitosan microcapsules by using different emulsifiers. **Journal of Food Engineering**, v. 217, p. 108-114, 2018. DOI: 10.1016/j.jfoodeng.2017.08.026.

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

MARTINS, A. P.; NOGUEIRA, M. T.; COSTA, M. C.; SALGUEIRO, L. Requisitos de qualidade em óleos essenciais: a importância das monografias da Farmacopeia Europeia e das normas ISO. **Revista de Fitoterapia**, v. 11, n. 2, p. 133-145, 2011.

MORAIS, L. A. S. Influência dos fatores abióticos na composição química dos óleos essenciais. **Horticultura Brasileira**, v. 27, p. S4050-S4063, 2009.

MOSHONAS, M. G.; SHAW, P. E. Quantitation of volatile constituents in mandarin juices and its use for comparison with orange juices by multivariate analysis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, p. 3968–3972, 1997.

NI, H.; HONG, P.; JI, H. F.; SUN, H.; CHEN, Y. H.; XIAO, A. F.; CHEN, F. Comparative analyses of aromas of fresh, naringinase-treated and resin-absorbed juices of pummelo by GC-MS and sensory evaluation. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 30, 245 – 253, 2015. DOI 10.1002/ffj.3239.

NIKFAR, S.; BEHBOUNDI, A. F. Limonene. **Encyclopedia of Toxicology**, v. 3, p. 78-82, 2014. DOI: 10.1016/B978-0-12-386454-3.00628-X.

OLIVEIRA, M.E.B; OLIVEIRA, G.S.F; MAIA, G.A; MOREIRA, R.A; MONTEIRO, A.C.O. Aminoácidos livres majoritários no suco de caju: variação ao longo da safra. **Revista Brasileira de Fruticultura**, vol. 24, n. 1, 2002. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-29452002000100029>

PACHECO, Camilla de Andrade. **Aspectos histológicos, físico-químicos, sensoriais e fitotécnicos da tangerina Fremont**. 2015. 99 f. Tese (Doutorado em Agricultura Tropical e Subtropical) – Instituto Agronômico, Campinas, 2015.

PALAZZOLO, E.; LAUDICINA, V. A.; GERMANÀ, M. A. Current and potential use of citrus essential oils. **Current Organic Chemistry**, v. 17, p. 3042-3049, 2013.

PAWLISZYN, J. **Handbook of Solid Phase Microextraction**. Waterloo: Elsevier, 2012. 478 p.

PEREZ-CACHO, P. R.; ROUSEFF, R. Processing and storage effects on orange juice aroma: A review. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 9785-9796, 2008. DOI: 10.1080/10408390701638902.

PÉREZ-LÓPEZ, A. J.; CARBONELL-BARRACHINA, A. A. Volatile odour components and sensory quality of fresh and processed mandarin juices. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 86, p. 2404–2411, 2006.

PÉREZ-LÓPEZ, A. J.; SAURA, D.; LORENTE, J.; CARBONELL-BARRACHINA, Á. A. Limonene, linalool, α -terpineol, and terpinen-4-ol as quality control parameters in mandarin juice processing. **European Food Research and Technology**, v. 222, p. 281–285, 2006. DOI 10.1007/s00217-005-0055-5.

PESIS, E. The role of metabolites, acetaldehyde and ethanol, in fruit ripening, enhancement of fruit quality and fruit deterioration. **Postharvest Biology and Technology** v. 37, p. 1–19, 2005. DOI:10.1016/j.postharvbio.2005.03.001

PUTNIK, P.; BARBA, F. J.; LORENZO, J. M.; GABRIĆ, D.; SHPIGELMAN, A.; GRAVOTTO, G.; KOVAČEVIĆ, D. B. An integrated approach to mandarin processing: Food safety and nutritional quality, consumer preference, and nutrient bioaccessibility. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 16, p. 1345-1358, 2017. DOI: 10.1111/1541-4337.12310.

RAVICHANDRAN, C.; BADGUJAR, P. C.; GUNDEV, P.; UPADHYAY, A.; Review of toxicological assessment of d-limonene, a food and cosmetics additive. **Food and Chemical Toxicology**, v. 120, p. 668-680, 2018. DOI: 10.1016/j.fct.2018.07.052.

REINECCIUS, G. A. **Flavor chemistry and technology**. 2006. CRC Press, Taylor & Francis Group.

REN, J.-N.; TAI, Y.-N.; DONG, M.; SHAO, J.-H.; YANG, S.-Z.; PAN, S.-Y.; FAN, G. Characterisation of free and bound volatile compounds from six different varieties of citrus fruits. **Food Chemistry**, v. 185, p. 25-32, 2015.

RIBEIRO, G. D.; COSTA, J. N. M.; VIEIRA, A. H.; SANTOS, M. R. A. Enxertia de Fruteiras. **EMBRAPA**, Recomendações Técnicas, 92. Porto Velho, 2005, 8 p.

ROUSEFF, R. L.; PEREZ-CACHO, P. R.; JABALPURWALA, F. Historical review of citrus flavor research during the past 100 years. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 2009, 57, 8115-8124. DOI:10.1021/jf900112y.

SANTOS NETO, A.G.; RÊGO, E.S.B.; PADILHA, F.F.; MACEDO, M.L.H. Isolamento de leveduras de frutas cítricas. Instituto de Tecnologia e Pesquisa/UNIT, 2016. INSS: 1807-2518.

SANZ, M.L.; VILLAMIEL, M.; MARTÍNEZ-CASTRO, I. Inositols and Carbohydrates in Different Fresh Fruit Juices. **Food Chemistry**, vol. 87, p. 325-328, 2004.

SIMÕES, O. M. C.; SCHENKEL, P. E.; GOSMAN, G.; MELLO, P. C. J.; MENTZ, A. L.; PETROVICK, R. P. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 3. ed. Porto Alegre: UFRGS, 2001. 833 p.

SOUZA, S. A. M.; MEIRA, M. R.; FIGUEIREDO, L. S.; MARTINS, E. R. Óleos essenciais: Aspectos econômicos e sustentáveis. **Enciclopédia Biosfera**, v. 6, n. 10, p. 1-11, 2010.

SUN, J. D-limonene: Safety and clinical applications. **Alternative Medicine Review**, v. 12, n. 3, p. 259-264, 2007.

TACO – Tabela Brasileira de Composição dos Alimentos/ NEPA – UNICAMP, 4ª ed. revisada e ampliada. Campinas: NEPA-UNICAMP, 2011. 161 p.

TAMBORRA, P.; BOLLETIERI, D.; LATORRACA, M.; TAMBORRA, M.; PARADISO, F.; SAVINO, M. The shikimic acid: an important metabolite for the *Aglianico del Vulture* wines. **Italian Journal of Agronomy**, v. 9, n. 615, p.182-184, 2014. DOI: 10.4081/ija.2014.615.

TEIXEIRA, J. P. F.; MARQUES, M. O. M.; PIO, R. M. Caracterização dos óleos essenciais em frutos de nove genótipos de tangerina. **Citrus Research & Technology**, v. 35, n.1, p.1-10, 2014. DOI: 10.5935/2236-3122.20140001.

TIETEL, Z.; PLOTTO, A.; FALLIK, E.; LEWINSOHN, E.; PORAT, R. Taste and aroma of fresh and stored mandarins. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 91, p. 14 – 23, 2011.

TZIN, V.; ROGACHEV, I.; MEIR, S.; ZVI, M. M. B.; MASCI, T.; VAINSTEIN, A.; AHARONI, A.; GALILI, G. Altered levels of aroma and volatiles by metabolic engineering of shikimate pathway genes in tomato fruits. **AIMS Bioengineering**, v. 2, n. 2, p.75-92, 2015. DOI: 10.3934/bioeng.2015.2.75.

VICENTE, A.R.; MANGANARIS, G.A.; SOZZI, G.O.; CRISOSTO, C.H. Nutricional Quality of Fruits and Vegetables. In: Postharvest Handling: A system Approach. Elsevier, 2009, 2 ed, p. 58-93. Disponível em: <<https://ucanr.edu/datastoreFiles/234-1260.pdf>>. Acesso em: 25-01-19.

VIEIRA, A. J.; BESERRA, F. P.; SOUZA, M. C.; TOTTI, B. M.; ROZZA, A. L. Limonene: Aroma of innovation in health and disease. **Chemico-Biological Interactions**, v. 28, p. 97-106, 2018.

XIAO, Z.; WU, Q.; NIU, Y.; WU, M.; ZHU, J.; ZHOU, X.; CHEN, X.; WANG, H.; LI, J.; KONG, J. Characterization of the key aroma compounds in five varieties of mandarins by gas chromatography-olfactometry, odor activity values, aroma recombination, and omission analysis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 65, p. 8392-8401, 2017. DOI: 10.1021/acs.jafc.7b02703.

YI, F.; JIN, R.; SUN, J.; MA, B.; BAO, X. Evaluation of mechanical-pressed essential oil from Nanfeng mandarin (*Citrus reticulata* Blanco cv. Kinokuni) as a food preservative based on antimicrobial and antioxidant activities. **LWT – Food Science and Technology**, v. 95, p 346-353, 2018. DOI: 10.1016/j.lwt.2018.05.011.

ZEBC, Z.; WILKES, J.; JERVIS, A. J.; SCRUTTON, N. S.; TAKANO, E.; BREITLING, R. Towards synthesis of monoterpenes and derivatives using synthetic biology. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 34, p. 37-43, 2016. DOI: 10.1016/j.cbpa.2016.06.002.