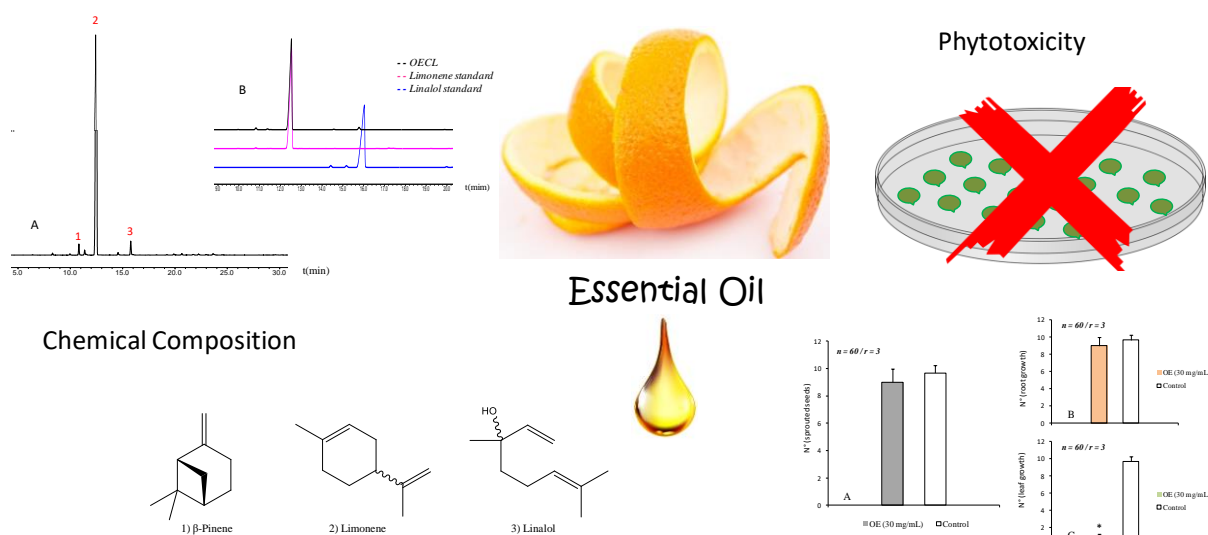






GRAPHICAL ABSTRACT



USO DE CASCAS DE LARANJA PARA EXTRAÇÃO DE ÓLEO ESSENCIAL E AVALIAÇÃO DE SUAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS

USE OF ORANGE PEELS FOR EXTRACTION OF ESSENTIAL OIL AND EVALUATION OF ITS BIOLOGICAL ACTIVITIES

Tércio da Silva de Souza^a, Jaqueline Rodrigues Cindra de Lima Souza^b, Gustavo Rodrigues de Souza^c, Ester do Nascimento Moulin^d

^a Coordenadoria do Proeja. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Espírito Santo – Campus de Alegre, Brasil.

^b Coordenadoria de Laboratórios. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Espírito Santo – Campus de Vila Velha, Brasil.

^c Departamento de Química e Física. Universidade Federal do Espírito Santo – Campus de Alegre, Brasil.

^d Departamento de Ciências Agrárias. Universidade Federal do Espírito Santo – Campus de Alegre, Brasil.

* (tssouza@ifes.edu.br)

Artigo submetido em 24/10/2023, aceito em 15/03/2024 e publicado em 25/03/2024.

ORCID – Tércio S Souza: <https://orcid.org/0000-0002-6667-1806>

ORCID – Jaqueline RCL Souza: <https://orcid.org/0000-0002-2022-8462>

ORCID – Ester N Moulin: <https://orcid.org/0000-0002-0842-3740>

ORCID – Gustavo R de Souza: <https://orcid.org/0000-0001-7801-9068>

Resumo: A expansão da produção de laranja e instalação de agroindústrias mitigam a necessidade de aproveitamento dos resíduos gerados. Este estudo investigou o uso de cascas residuais de laranja para extração de óleo essencial e avaliação de sua potencial atividade biológica. O óleo essencial (OECL) foi obtido da cultivar Valência (*Citrus sinensis* L.), adquirida no município de Jerônimo Monteiro, Brasil. As cascas frescas foram quantificadas quanto ao teor de umidade e de óleo essencial. O OECL foi caracterizado quanto aos seus atributos físicos (densidade e índice de refração), químicos (composição qualitativa/quantitativa) e biológicos (atividade antioxidante, fitotoxicidade e citotoxicidade). As cascas apresentaram 61,5% de umidade e 0,9 % de óleo essencial, este apresentou densidade = 0,8572 g cm⁻³ e índice de refração = 1,4712 tendo em sua composição: Limoneno (96,37%), Linalol (2,26%) e β-Pineno (1,37%). Dentre as atividades biológicas avaliadas destaca-se o forte carácter antioxidante, concentração efetiva de 89 mg mL⁻¹ para sequestro de 50% do radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazil. No teste de fitotoxicidade *in vitro*, com *Lactuca sativa*, verificou-se que 30 mg mL⁻¹ do OECL não alterou significativamente o processo germinativo, nem o crescimento radicular, mas reduziu em 90% a emissão de folíolos. Já no ensaio de citotoxicidade *in vitro*, 30 mg mL⁻¹ do OECL não afetou a viabilidade do crescimento celular da *Saccharomyces cerevisiae*, mas reduziu sua atividade enzimática em 30%. A exploração do OECL apresenta-se promissora quanto ao rendimento de obtenção e atividades biológicas, sendo necessários estudos mais aprofundados de seletividade e mecanismos de ação.

Palavras-chave: Cultivo de laranja; manejo sustentável; antioxidante, fitotoxicidade, citotoxicidade.

Abstract: The expansion of orange production and the installation of agro-industries mitigate the need for waste utilization. This study investigated the use of residual orange peels for essential oil extraction and evaluation of their potential biological activity. The essential oil (OECL) was obtained from the Valência cultivar (*Citrus sinensis* L.), acquired in the municipality of Jerônimo Monteiro, Brazil. The fresh peels were quantified for moisture and essential oil content. The OECL was characterized regarding its physical (density and refractive index), chemical (qualitative/quantitative composition) and biological (antioxidant activity, phytotoxicity and cytotoxicity) attributes. The peels had 61.5% moisture and 0.9% essential oil, which had a density = 0.8572 g cm⁻³ and refractive index = 1.4712, having in its composition: Limonene (96.37%) , Linalool (2.26%) and β-Pinene (1.37%). Among the biological activities evaluated, the strong antioxidant character stands out, with an effective concentration of 89 mg mL⁻¹ for scavenging 50% of the free radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl. In the *in vitro* phytotoxicity test, with *Lactuca sativa*, it was found that 30 mg mL⁻¹ of OECL did not significantly alter the germination process or root growth, but reduced leaflet emission by 90%. In the *in vitro* cytotoxicity assay, 30 mg mL⁻¹ of OECL did not affect the viability of *Saccharomyces cerevisiae* cell growth, but reduced its enzymatic activity by 30%. The exploration of OECL appears promising in terms of yield and biological activities, requiring more in-depth studies of selectivity and mechanisms of action.

Abstract: Keywords: Orange cultivation; Sustainable management; Antioxidant; Phytotoxicity; Cytotoxicity.

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor mundial de laranja e de suco de laranja, com produção de 16.808.446 toneladas na safra 2021/22, sendo responsável por 31% da produção mundial da fruta e por 63,4% do volume global de suco de laranja (USDA, 2022). O estado do Espírito Santo, dentro do cenário nacional apresenta pequena expressão, com produção de 24.150 toneladas de frutos, o que corresponde a 0,14% ($m\ m^{-1}$) da produção nacional (IBGE, 2023). Contudo, pesquisas realizadas com novas cultivares, vem contribuindo para a consolidação e expansão de polos produtores de laranja, em especial na região Sul do estado (INCAPER, 2023).

O polo de laranja localizado no município de Jerônimo Monteiro encontra-se em expansão, e é responsável por 13,38% da produção estadual, sendo cultivadas as variedades *Citrus sinensis*: cv 'Lima', cv 'Bahia', cv 'Salustiana', cv 'Valência e cv 'Folha Murcha' (INCAPER, 2023). Com a expansão da produção de frutos na região surge a demanda por instalação de agroindústrias de processamento do fruto, e como consequência a geração de resíduos. E em se tratando de laranja, estes podem gerar subprodutos de alto valor agregado, como por exemplo, o óleo essencial (OE) (CASAS CARDOSO et al., 2022; PINEDA-LOZANO et al., 2022; SURI et al., 2022). O óleo essencial da laranja tem se mostrado promissor para ser utilizado como bio-herbicidas, bio-pesticidas, agente antimicrobiano, repelente de insetos, etc. (ALANAZ et al., 2023; BATISTA et al., 2023; BATISH et al., 2008; BERESTETSKIY, 2023; ISMAN et al., 2011; MAES et al., 2021; MENDES et al., 2023a,b; PATEIRO et al., 2021; TEKE e MUTLU, 2021; VERDEGUER et al., 2020; WANG et al., 2023).

Os OEs são produzidos pelos vegetais, constituídos por uma mistura complexa de compostos lipofílicos de baixo peso molecular e voláteis, com

predominância de terpenos, terpenóides e fenilpropanóides em sua composição (DEWICK, 2011). Esses podem atuar sobre as células bacterianas, fúngicas, vegetais e animais com vários mecanismos de ação, que incluem: alteração na integridade e permeabilidade da membrana celular, inibição enzimática, alteração do potencial eletroquímico da membrana, indução e recuperação de estresse oxidativo, interferência na síntese de DNA e RNA, modulação de vias de sinalização celular, indução de apoptose e interferência no metabolismo celular (BAKKALI et al., 2008; BASSOLÉ e JULIANI, 2012; BURT, 2004; LI et al., 2020; SHARIFIRAD et al., 2018).

Na composição química do OE da laranja (*Citrus Sinensis*) observa-se a presença majoritária do limoneno, (81,5 a 99,6%) e de outros compostos minoritários, como o linalol, mirceno e α -pineno (BRAHMI et al., 2021; BARROS GOMES et al., 2020; DE SOUSA et al., 2023; MAGALHÃES et al., 2020; SANTOS et al., 2023).

O limoneno apresenta atividade antioxidante, ansiolítica, gastroprotetora, antitumorais comprovadas em ensaios *in vitro* e *in vivo* com baixa toxicidade para animais (ALKANAT et al., 2023; AL KAMALY et al., 2022; BAYER et al., 2023; EDDIN et al., 2021; HIMED et al., 2019; PICCIALLI et al., 2021). Os pinenos têm despertado interesse pelo seu potencial anti-inflamatório, antitumoral e antimicrobiano (BOUZENNA et al., 2017; DA SILVA RIVAS et al., 2012; NAM et al., 2014; XANTHIS et al., 2021) e juntamente com o linalol atuam no metabolismo do óxido nítrico, que está intimamente relacionado à regulação da atividade dos canais iônicos dependentes de voltagem, desempenhando um papel significativo na modulação da função celular e na regulação de processos fisiológicos e patológicos (BAKKALI et al., 2008; JABIR et al., 2018; KIM et al., 2018; NEPALI et al., 2014; PEANA et al., 2006; PEREIRA et al., 2018;

WOJTUNIK-KULESZA, 2019; ZHANG et al., 2023).

Estudos realizados em diferentes espécies vegetais revelam que tanto os terpenos hidrocarbonetos (limoneno, pineno, mirceno, sabineno) quanto os terpenos oxigenados (terpineol e linalol), presentes nos OEs, manifestam ação fitotóxica e citotóxica nas células das plantas: *Allium cepa*, *Arabidopsis thaliana*, *Salvinia minima*, *Raphanus sativus*, *Lepidium sativum*, *Typha domingensis*, *Avena fatua*, *Phalaris minor*, *Echinochloa crus-galli*, *Abutilon theophrasti*, *Aeschynomene indica*, *Digitaria ciliaris*, *Amaranthus viridis*, *Zea mays*. Estas substâncias reduzem a taxa de germinação, o desenvolvimento de raízes, o crescimento de plântulas e o acúmulo de biomassa (ABD-ELGAWAD et al., 2020; ALVES et al., 2023; FAGODIA et al., 2017; GETTYS et al., 2022; IBÁÑEZ et al., 2022; JIANG et al., 2021).

Levando em conta as possíveis aplicações biológicas dos óleos essenciais e a oportunidade de valorização da cadeia produtiva da laranja, este estudo teve como objetivo extrair o óleo essencial de cascas de laranjas residuais e avaliar suas propriedades biológicas.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O óleo essencial foi obtido das cascas de laranja, cultivar média/tardia Valência (*C. sinensis* L.), adquiridas no mercado local, com especificação da unidade produtiva localizada no município de Jerônimo Monteiro, Estado do Espírito Santo. As cascas foram submetidas à quantificação do teor de umidade e extração do óleo essencial (OECL). O OECL extraído foi caracterizado quanto aos atributos físicos (densidade e índice de refração), químicos (composição qualitativa/quantitativa), e biológicos (atividade antioxidante, fitotoxicidade e citotoxicidade).

2.1 QUANTIFICAÇÃO DO TEOR DE CASCA NO FRUTO E UMIDADE NAS CASCAS DE LARANJA

A quantificação do teor de casca no fruto de laranja e o teor de umidade nas cascas foram realizados por gravimetria IAL (2008). O fruto fresco foi pesado, descascado manualmente e medido a massa da casca. Foram realizadas 50 repetições e o resultado expresso em percentagem média \pm erro padrão da média (g g^{-1}). Para determinação do teor de umidade, cerca de um grama de cascas frescas de laranja picadas foram submetidas à secagem em estufa (Estufa QUIMIS®, Q317M-22) a 105°C por 24 horas, tendo sua massa medida após secagem. A análise foi realizada em triplicata e o resultado expresso em percentagem média \pm erro padrão da média.

2.2 EXTRAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DAS CASCAS DE LARANJA (OECL)

Dez frações de 200 g de cascas frescas foram submetidas a extração por hidrodestilação em sistema Clevenger de acordo com metodologia recomendada pela Farmacopeia brasileira (BRASIL, 2022). A proporção de cascas/água utilizada foi de 1:10 com tempo de destilação de 3 horas. O hidrolato foi coletado com auxílio de micropipeta e submetido à centrifugação (Centrífuga Hermle Labortechnik, Z 216 M) a 6000 rpm por 10 minutos. Após centrifugação, o OECL foi transferido para tubos Falcon revestidos com papel alumínio e armazenados em freezer a -20°C para análises posteriores. O rendimento de óleo das cascas foi determinado por gravimetria e o resultado expresso pela média \pm erro padrão da média.

2.3 CARACTERIZAÇÃO FÍSICA DO OECL

A densidade do OECL foi determinada pelo método direto de

medição, proposto por DE JESUS e PALMA (2008), com algumas adaptações. Foram pipetadas 0,50 mL do OECL em dez repetições e medida a sua massa correspondente. Também foi feita a medida da massa de 0,50 mL de água destilada conforme realizada com o OECL. A densidade foi calculada através da (Eq. 1). Sendo: d = densidade do OECL; m_{OE} = massa do OECL; V_{OE} = volume do OECL (0,50 mL); m_A = massa de água e V_A = volume de água (0,50 mL).

$$d_{OE} = (m_{OE}/V_{OE})/(m_A/V_A) \quad (\text{Eq1})$$

Para medir o índice de refração foi utilizada a metodologia descrita pelo Instituto Adolfo Lutz (IAL, 2008). Foi utilizado refratômetro Abbé de bancada (QUIMIS[®], modelo Q767B) ajustado previamente com água destilada e temperatura do ambiente controlada a $20,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$. Os prismas do refratômetro foram limpos e secos e em seguida foram adicionadas três gotas de OECL. Após dois minutos de estabilização térmica foi realizada a leitura. O procedimento foi realizado em triplicata e o resultado expresso pela média \pm erro padrão média.

2.4 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO OECL

Os compostos presentes no OECL foram analisados por cromatografia gasosa com detecção de ionização de chama (CG-DIC) (Shimadzu GC-2010 Plus) e cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG-EM) (Shimadzu GC-MS-2010). As seguintes condições cromatográficas foram aplicadas em ambas as análises: colunas capilar sílica fundida ($30 \text{ m} \times 0,25 \text{ mm}$) com RTX-5MS como fase estacionária (filme de 0,25 μm de espessura); N_2 (na análise CG-DIC) ou He (na análise CG-EM) como gás de arraste com fluxo de $3,0 \text{ mL min}^{-1}$; programa de temperatura do forno de dois minutos à temperatura inicial de 40°C , seguido de aumentos graduais de 3°C min^{-1} até atingir 220°C , permanecendo a esta

temperatura durante um minuto; temperatura do injetor de 220°C ; temperatura do detector de 240°C ; e razão de *split* 1:30. Foi injetado um volume de $1,0 \mu\text{L}$ de solução, contendo 3% de óleo essencial dissolvido em etanol para as análises CG-DIC ou 3% de óleo essencial dissolvido em diclorometano para as análises CG-EM. Estas últimas foram realizadas em equipamento que opera por impacto eletrônico, com energia de impacto de 70 eV; velocidade de varredura de 1000; intervalo de varredura de 0,50 fragmentos/segundo; e fragmentos detectados de 29 a 400 (m/z) (DE SOUZA et al., 2017).

A identificação dos componentes do óleo foi realizada por comparação dos seus espectros de massa com os disponíveis na biblioteca espectral (Wiley Registry of Mass Spectral Data e NIST Mass Spectrometry Data Center), bem como o índice de retenção (LTPRI). Foi utilizada uma mistura de alcanos de cadeia linear (C7-C30; Sigma, EUA) para o cálculo de LTPRI (Eq. 2). O RI calculado para cada composto foi comparado com os valores disponíveis no banco de dados NIST.

$$\text{LTPRI}_i = 100n + 100 * ((t_{R(i)} - t_{R(n)}) / (t_{R(n+1)} - t_{R(n)})) \quad (\text{Eq2})$$

Onde: i , é o composto de interesse; n , é o número de átomos de carbono do hidrocarboneto com tempo de retenção imediatamente anterior ao tempo de retenção de i ; $t_{R(i)}$, é o tempo de retenção ajustado de i ; $t_{R(n)}$, é o tempo de retenção ajustado de n ; $t_{R(n+1)}$, é o tempo de retenção ajustado do hidrocarboneto com tempo de retenção imediatamente posterior ao tempo de retenção de i .

O percentual relativo de cada composto do óleo essencial foi calculado através da razão entre a área integral de seus respectivos picos e a área total de todos os constituintes da amostra, dados estes obtidos pelas análises CG-DIC e ajustados pela Simulação de Fatores de Resposta Relativa (RRF) (Eq. 3) (TISSOT

et al., 2012), sendo considerados os compostos com área relativa acima de 1% para a definição da composição.

$$RRF_i = ((10^3 * MW_i) / (MW_{ISTD} * (-61,5 + 88,8 nC + 18,7 nH - 41,3 nO + 3,8 nN + 64,0 nS - 20,2 nF - 23,5 nCl - 10,2 nBr - 1,07 nI + 127 nBENZ))) \quad (Eq3)$$

Onde: *i* é o composto de interesse; *nC*, *nH*, *nO*, *nN*, *nS*, *nF*, *nCl*, *nBr*, *nI* e *nBENZ* são respectivamente o número de carbonos, hidrogênio, oxigênio, nitrogênio, enxofre, flúor, bromo, iodo, e anéis benzênicos encontrados na estrutura do composto. *MW_i* e *MW_{ISTD}* são os pesos moleculares das substâncias de interesse e do padrão interno (ISTD, methyl octanoate).

2.4.1 ENSAIOS DE SOLUBILIDADE DO OECL

Os testes de solubilidade são utilizados para identificar as classes de substâncias orgânicas: S2 - Sais de ácidos orgânicos; cloridratos de amina; aminoácidos; compostos multifuncionais com grupos funcionais hidrofílicos: hidratos de carbono, compostos poli-hidroxi, ácidos polibásicos, etc. SA - Ácidos carboxílicos monofuncionais com cinco carbonos ou menos; ácidos arilsulfônicos. SB - Aminas monofuncionais com seis carbonos ou menos. S1 - Alcoóis, aldeídos, cetonas, ésteres, nitrilas e amidas, com cinco átomos de carbono ou menos (monofuncionais). A1 - Ácidos orgânicos fortes: ácidos carboxílicos com mais de seis carbonos; fenóis com grupos retiradores de elétrons na(s) posição(ões) orto e/ou para; 1,3-dicetonas (1,3-dicetonas). A2 - Ácidos orgânicos fracos: fenóis, enóis, oximas, imidas, sulfonamidas, tiofenóis, todos com mais de cinco átomos de carbono. Incluem-se também as -dicetonas, os compostos nitro com hidrogênio em e as sulfonamidas. B - Aminas alifáticas com oito ou mais carbonos; anilinas (apenas um grupo fenil ligado ao nitrogênio); alguns éteres. MN -

Compostos neutros diversos contendo nitrogênio ou enxofre e com mais de cinco átomos de carbono. N1 - Álcoois, aldeídos, metilcetonas, cetonas cíclicas e ésteres com um só grupo funcional e mais de cinco átomos de carbono, mas menos do que nove. Éteres com menos de oito átomos de carbono e epóxidos. N2 - Alquenos, alquinos, éteres, compostos aromáticos (especialmente os que têm grupos ativantes) e cetonas (exceto as da classe N1) (SHRINER et al., 2004; COSTA, 2004).

Para a identificação de grupos funcionais predominantes na amostra de OECL utilizou-se a marcha analítica proposta por SHRINER et al., (2004) com adaptações. Os testes de solubilidade foram realizados com os seguintes solventes: água destilada, hidróxido de sódio (5% m v⁻¹); ácido clorídrico (5% m v⁻¹), ácido sulfúrico (98% m v⁻¹) e ácido fosfórico (85% m v⁻¹). O ensaio foi realizado a temperatura ambiente (25±2°C) por adição de 1,5 mL do solvente a 30 mg da amostra de OECL, com a agitação constante por cerca de 3 minutos e, após estabilização, observação da solubilidade da amostra.

2.5 CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA DO OECL

2.5.1 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE IN VITRO DO OECL

A metodologia empregada na determinação da atividade antioxidante foi baseada na extinção da absorção do radical livre DPPH (2,2-difenil-1-picril hidrazil), proposta por BRAND-WILLIAMS et al., (1995), citado por RUFINO et al. (2007), com adaptações. Foram preparadas soluções etanólicas do OECL (10, 20, 40, 83, 167 e 334 mg mL⁻¹), antioxidante sintético BHT (butilhidroxitolueno) (40, 60, 80, 100, 120, 400 mg mL⁻¹) e um controle com etanol absoluto. Também foi construída uma curva padrão de calibração para com soluções etanólicas do DPPH nas

seguintes concentrações (0, 25, 50, 75, 125, 200 e 250 $\mu\text{mol L}^{-1}$).

O ensaio de atividade antioxidante foi realizado em triplicata, partindo de 1,5 mL de solução da amostra (controle, OECL e BHT) e 1,0 mL de DPPH 250 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Para cada concentração de amostra foi feito um branco, utilizando etanol absoluto ao invés do DPPH. Após homogeneização e repouso por uma hora em câmara escuro as leituras de absorvâncias foram efetuadas a 515 nm em espectrofotômetro UV-Vis (EDUTECH, EEQ-9023) com diferentes brancos de acordo com as concentrações utilizadas. O percentual de sequestro do OECL foi calculado através da Eq. 4. Em que: A_0 = absorvância do controle (ausência de antioxidante); A_n = absorvância da amostra.

$$\% \text{Sequestro DPPH} = 100 * [(A_0 - A_n)/A_0] \quad (\text{Eq4})$$

2.5.2 FITOTOXICIDADE

O potencial fitotóxico do OECL foi avaliado conforme método proposto por HAZRATI et al., (2017). Os bioensaios realizados *in vitro* para avaliar a fitotoxicidade de compostos têm sido realizados em plantas comerciais como modelos de dose-resposta. Estas apresentam homogeneidade genética, germinação uniforme, fácil disponibilidade possibilitando ensaios controlados e muitas repetições amostrais (HAZRATI et al., 2017; PAULA et al., 2015; TREVISAN et al., 2012).

Foram preparadas emulsões do OECL nas concentrações zero (controle) e 30 mg mL^{-1} (tratamento) tendo como agente emulsionante o Tween 80 a 30 mg mL^{-1} . As emulsões foram preparadas em cuba de ultrassom (CRISTÓFOLI, USC-0353/06) a 50 Hz por 60 s. O óleo foi misturado em balão volumétrico com Tween 80 e foi sendo adicionada água gradativamente à mistura até o volume desejado. Após homogeneização das emulsões a agitação foi mantida por mais 3 minutos nas mesmas condições.

O ensaio de fitotoxicidade do OECL foi realizado em *Lacuta sativa* (alface). Vinte sementes de alface foram posicionadas em Placa de Petri de ($\varnothing = 9$ cm), contendo papel de filtro umedecido com 2,0 mL das emulsões de OECL (0 ou 30 mg mL^{-1}) em três repetições cada. As placas foram dispostas em delineamento inteiramente casualizado (DIC) em câmara de germinação e incubadas com controle de temperatura ($24^\circ\text{C} \pm 1$), luminosidade ($3,52 \pm 1,50 \text{ J s}^{-1}$) e fotoperíodo (16 horas de luz e 8 horas de escuro). O número de sementes germinadas, o desenvolvimento de raízes e o desenvolvimento da parte aérea foram observados após sete dias de exposição aos tratamentos. Os dados foram submetidos à análise descritiva e testados pelo teste t de Student ($p < 0,05$).

2.5.3 CITOXICIDADE

A avaliação da citotoxicidade do OECL foi realizada em leveduras do tipo (*Saccharomyces cerevisiae*). A *S. cerevisiae* pode ser utilizada como modelo microbiológico unicelular eucariótico em pesquisa *in vitro* nas áreas das ciências Biológicas e Biomédicas relacionadas ao efeito de dose-resposta, por apresentarem características celulares muito semelhantes às de células humanas, além de permitir a realização de experimentos controlados com um grande número de repetições amostrais (BRONZETTI et al., 1990; DE FREITAS et al., 2003; KASEMETS et al., 2009; MORANO et al., 2012). O meio nutritivo utilizado foi sacarose 0,080 mol L^{-1} . Os ensaios foram realizados com o OECL nas concentrações zero (controle) e 30 mg mL^{-1} (tratamento) em três repetições cada.

Para o ensaio foram misturados em tubos do tipo eppendorf, zero ou 60 mg de OECL, 20 mg de fermento biológico seco (marca Fleischmann®) e 2,0 mL de sacarose 0,080 mol L^{-1} . Os tubos foram incubados em estufa a 40°C , com agitação horizontal 30 rpm por 240 minutos, e centrifugados (Hermle Labortechnik, Z 216 M) por 10 minutos a 6000 rpm. Os

sobrenadantes foram submetidos à quantificação dos teores de açúcares redutores (glicose + frutose) pelo método ADNS (VASCONCELOS et al., 2013 e SANTOS et al., 2017) e as massas do corpo de fundo foram medidas após secagem ao ar por 24 horas para mensuração da taxa de crescimento celular (biomassa) (MAUERHOFER et al., 2019; LI e MIRA, 2010). Os dados foram submetidos à análise descritiva e testados pelo teste t de *Student* ($p < 0,05$).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados apontam que, em média, $12,5 \pm 2,0\%$ em massa da laranja correspondem à casca e estas apresentaram $61,496 \pm 0,204\%$ (g g^{-1}) de umidade. O teor de óleo obtido na hidrodestilação das cascas frescas foi de $0,909 \pm 0,050\%$ (g g^{-1}), valor este satisfatório em se tratando de óleo essencial. Em estudos realizados por SANTOS et al., (2023) com 30 diferentes espécies de laranjas, encontrou teor de óleo variando de 0,23 a 5,57% (g g^{-1}).

3.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICA DO OECL

O OECL apresentou-se incolor, translúcido e com aroma cítrico característico da fruta, com densidade (d) = $0,8572 \pm 0,0063 \text{ g cm}^{-3}$ e índice de

refração (IR) = $1,4712 \pm 0,0005$. A medida de densidade e o índice de refração são os parâmetros físicos, o conhecimento destes parâmetros visa garantir o controle de qualidade e pureza do produto, pois são características intrínsecas para cada tipo de óleo, e são alteradas por adulteração, oxidação e degradação térmica (DO et al., 2015; TUREK e STINTZING, 2013). Os valores obtidos para estes parâmetros em conformidade com a ISO 3140 (2019) e Farmacopéia Brasileira (BRASIL, 2019) para óleo essencial, obtido por prensagem das cascas de laranja ($d = 0,842$ a $0,850 \text{ g cm}^{-3}$ e $IR = 1,470$ a $1,476$). Valores semelhantes foram encontrados por diversos autores para óleo essencial de laranja obtido por hidrodestilação das cascas: Oliveira Everton et al. (2020), $d = 0,8500$ e $IR = 1,476$; Borges et al. (2021), $d = 0,849$ e $IR = 1,4724$ e Andriyevsky et al. (2016), $d = 0,845$ e $IR = 1,470$.

3.2 CARACTERIZAÇÃO CROMATOGRÁFICA DO OECL

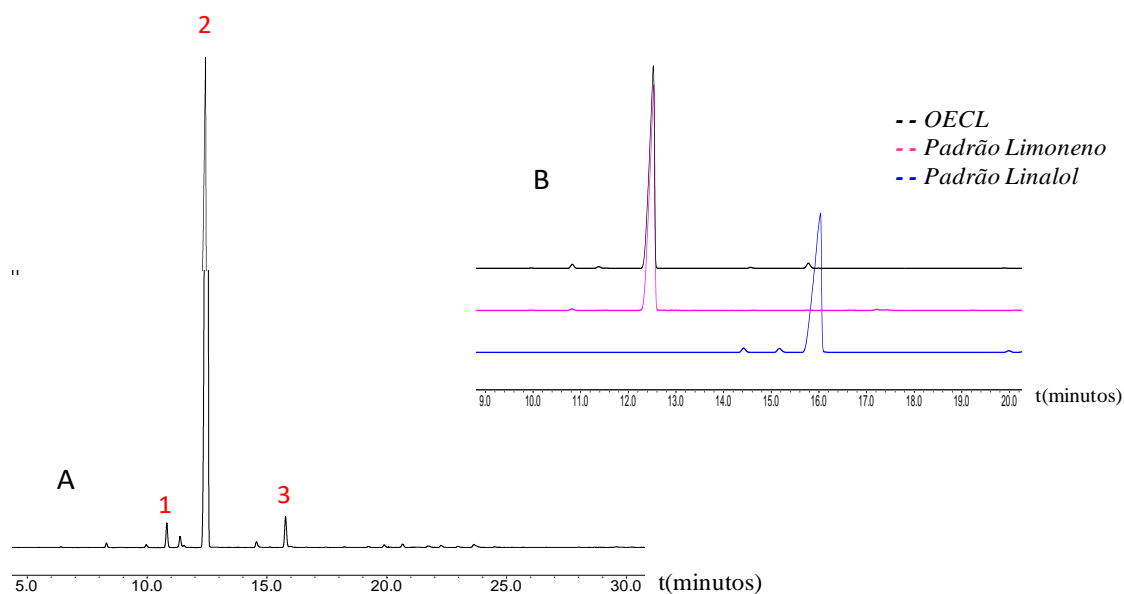
A análise cromatográfica do OECL permitiu a identificação de três compostos majoritários (Figura 1, Tabela 1 e Tabela 2). Os compostos identificados foram o β -Pineno, Limoneno e o Linalol (Figura 2). Com predominância de monoterpenos hidrocarbonetos (97,74%).

Tabela 1 - Caracterização cromatográfica do OECL com detecção por espectrometria de massas.

Compostos	T_R (min.)	Padrão de fragmentação (m/z e intensidade relativa)
β -Pineno	10,825	136(10); 121(10); 107(5); 93(100); 79(30); 69(80); 53(10%); 41(80%)
Limoneno	12,524	136(30); 121(30); 107(30); 93(75); 79(40); 68(100); 53(20); 39(20)
Linalol	15,778	154(5); 136(10); 121(30); 105(10); 93(80); 80(40); 71(100); 55(60); 41(50)

OECL – Óleo essencial da casca da laranja; T_R : tempo de retenção em minutos; m/z: relação massa/carga.
Fonte: Autor (2023).

Figura 1 - Perfil cromatográfico do OECL



OECL – Óleo essencial da casca da laranja; A – Perfil cromatográfico do OECL; B – Perfil cromatográfico OECL comparado com padrões externos.

Fonte: Autor (2024).

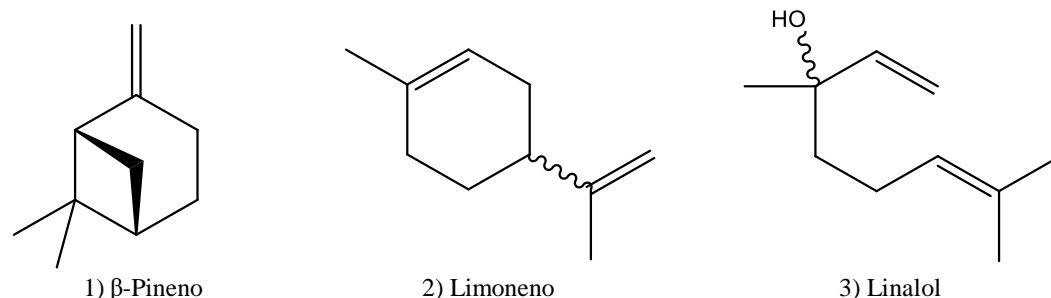
Tabela 2 - Caracterização cromatográfica do OECL com detecção por ionização de chama.

Pico	RT (min.)	%A	%A (RRF)	IK _{Cal}	IR _{Tab}	Composto	Identificação
1	10,852	1.37	1,05(1,37)	991	992	β-Pineno	IK/MS
2	12,524	96.70	73,98(96,37)	1029	1028	Limoneno	IK/MS/Padrão
3	15,778	1.93	1,74(2,26)	1101	1101	Linalol	IK/MS/Padrão
Monoterpeno hidrocarboneto		98,07	75,03(97,74)				
Monoterpeno oxigenado		1,93	1,74(2,26)				
Sesquiterpeno hidrocarboneto		-	-				
Sesquiterpeno oxigenado		-	-				
Total		100,00	76,77(100,00)				

OECL – Óleo essencial da casca da laranja; RT (Tempo de retenção – minutos); %A (área relativa); %A (RRF) (área relativa corrigida pelo RRF); IK_{Cal} (Índice de Retenção Calculado); IK_{Tab} (Índice de Retenção tabelado); MS (Espectrometria da massas).

Fonte: Autor (2024).

Figura 2. Estrutura molecular dos constituintes majoritários do OECL (Óleo essencial da casca da laranja)



Fonte: Autor (2024).

3.3 ENSAIO DE SOLUBILIDADE DO OECL

O OECL, quando em contato com água destilada, solução de NaOH 5% ($m v^{-1}$), HCl 5% ($v v^{-1}$) e H_3PO_4 85% ($m v^{-1}$) apresentou-se insolúvel. Já na presença da solução de H_2SO_4 96% ($m v^{-1}$) apresentou-se solúvel (Tabela 3) sendo classificado na classe N2 (alquenos, alquinos, éteres, compostos aromáticos), o que corrobora

com os resultados obtidos na composição química do OECL, presença de compostos de cadeia hidrocarbônica poli-insaturada e com comportamento apolar (hidrofílico) acentuado: Limoneno (96,37%), β -Pineno (1,37%) e Linalol (2,26%) (Tabela 1, Tabela 2, Figura 1 e Figura 2).

Tabela 3. Resultados obtidos na identificação do OECL pelo teste de solubilidade.

AMOSTRA	Água	NaOH 5% $m v^{-1}$	HCl 5% $m v^{-1}$	H_2SO_4 96% $m v^{-1}$	H_3PO_4 85% $m v^{-1}$	Classe*
OECL	Insolúvel	Insolúvel	Insolúvel	Solúvel	Insolúvel	N2

*Classe N2: Alcenos, alcinos, éteres, alguns compostos aromáticos (com grupos ativantes) (SHRINER et al., 2004; COSTA, 2004).

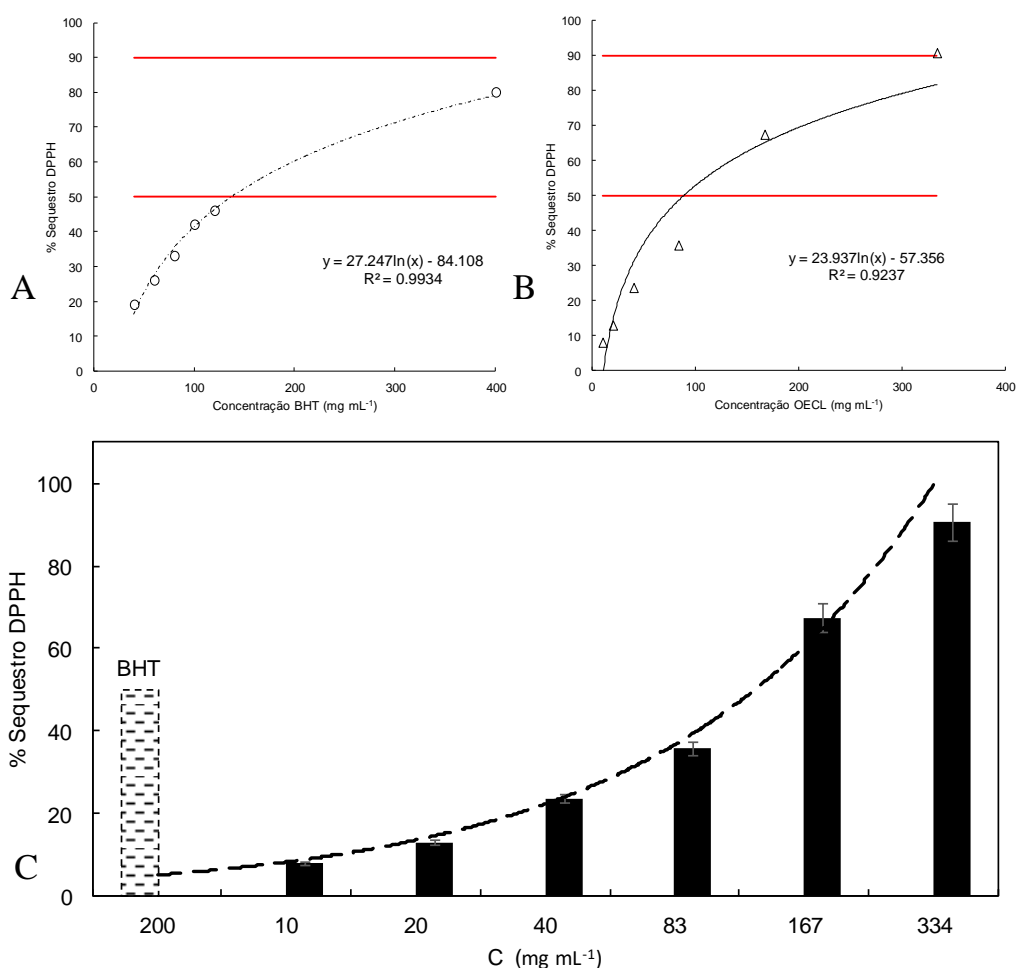
Fonte: autor, 2024

3.4 DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE *IN VITRO* (DPPH)

O estudo comparativo entre OECL e o antioxidante sintético BHT (Figura 3A e 3C), permite dizer que o OECL exerce uma atividade antioxidante três vezes maior que o BHT. OECL apresentou concentrações efetivas de 89 mg mL^{-1} e 472 mg mL^{-1} respectivamente para sequestro de 50% (CE_{50}) e 90% (CE_{90}) do radical livre DPPH ($250 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$),

enquanto as concentrações efetivas do BHT foram, $CE_{50} = 343 \text{ mg mL}^{-1}$ e $CE_{90} = 1489 \text{ mg mL}^{-1}$ (Figura 3B). Relatos da ação antioxidante de óleo essencial de laranja estão disponíveis na literatura, no entanto apontam a utilização de concentrações menores de OECL para obtenção do mesmo efeito sequestrante (CE_{50}): $37,25 \pm 2,85 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ (TORRES-ALVAREZ et al., 2017), $752,26 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ (BEN MIRI et al., 2018) e $4,72 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ (ORSO et al., 2022).

Figura 3- Atividade antioxidante do OECL



OECL – Óleo essencial da casca da laranja; A – Sequestro de DPPH pelo BHT (antioxidante sintético); B – Sequestro de DPPH pelo OECL; C – Estudo comparativo do OECL com BHT 200 (mg mL⁻¹) limite máximo estabelecido para usos em alimentos.

Fonte: Autor (2024).

A ação antioxidante observada está diretamente relacionada aos compostos majoritários presentes no OECL, limoneno, β -pineno e linalol. Estudos realizados *in vitro* e *in vivo* apontam que tratamentos contendo estes compostos em células animais e vegetais exercem efeito citoprotetor através da neutralização de ERO (espécies reativas do oxigênio), otimização dos sistemas de defesa antioxidante e redução do estresse oxidativo (BAYER et al., 2023; BOUZENNA et al., 2017; JABIR et al., 2018; HIMED et al., 2019; PICCIALLI et al., 2021; SEOL et al., 2016; XANTHIS et al., 2021).

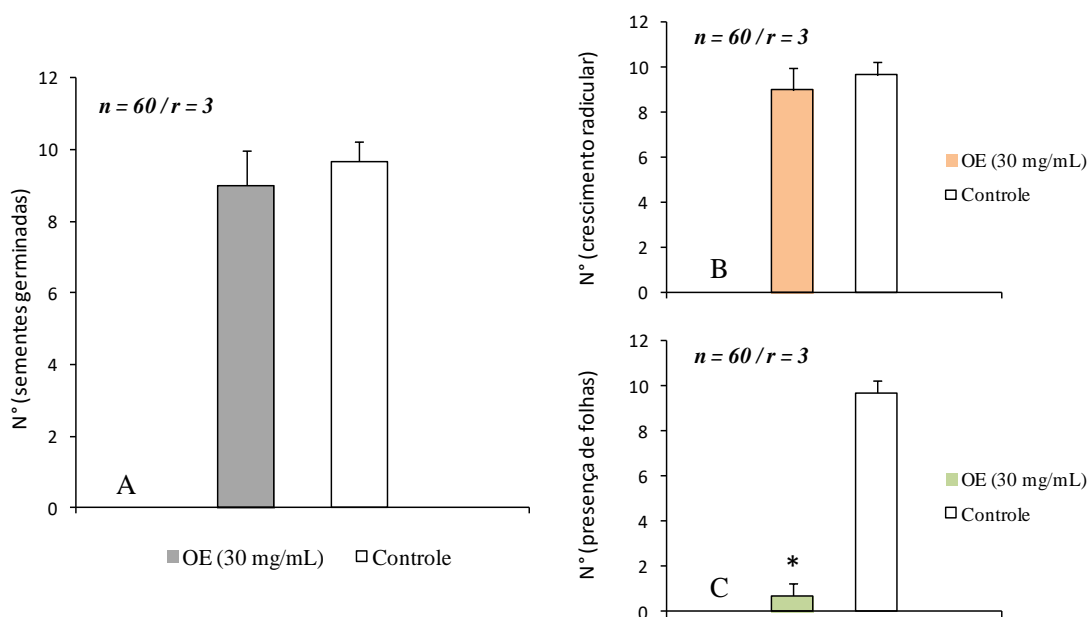
Os resultados obtidos indicam potencialidade para o uso do OECL como agente antioxidante em animais e vegetais. Nos animais os radicais livres são frequentemente produzidos como subprodutos naturais do metabolismo celular; e em vegetais os radicais livres surgem como resposta ao estresse ambiental, como exposição à luz solar intensa ou ação de agentes patogênicos (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2015; FOYER e NOCTOR, 2011; MITTLER, 2002; VALKO et al., 2006).

3.5 AVALIAÇÃO DA FITOTOXICIDADE E CITOTOXICIDADE DO OECL

Os resultados observados para fitotoxicidade apontam que o contato da semente com a emulsão de OECL na concentração 30 mg mL^{-1} (Figura 4A) não alterou significativamente o processo germinativo da *L. sativa*. O mesmo foi observado para o crescimento radicular (Figura 4B), este é um indício que os compostos predominantes presentes no OECL, como os hidrocarbonetos poli-insaturados não afetam os mecanismos de germinação e de emissão de radículas (raízes).

Já o desenvolvimento da parte aérea (folhas) foi drasticamente afetada (Figura 4C), com redução de 90% na emissão de folíolos (folhas). A ação fitotóxica pode ser provocada por alterações bioquímicas que interferem no desenvolvimento celular, com a inibição da síntese ou ação de enzimas que atuam no meristema apical da parte aérea da planta (MARCHI et al., 2008). Possivelmente o caráter lipofílico dos compostos presentes no OECL tem um efeito sobre as rotas metabólicas do desenvolvimento foliar (GOBARA, 2019; TAIZ et al., 2017).

Figura 4. Fitotoxicidade *in vitro* do OECL sobre a *Lacuta sativa*.



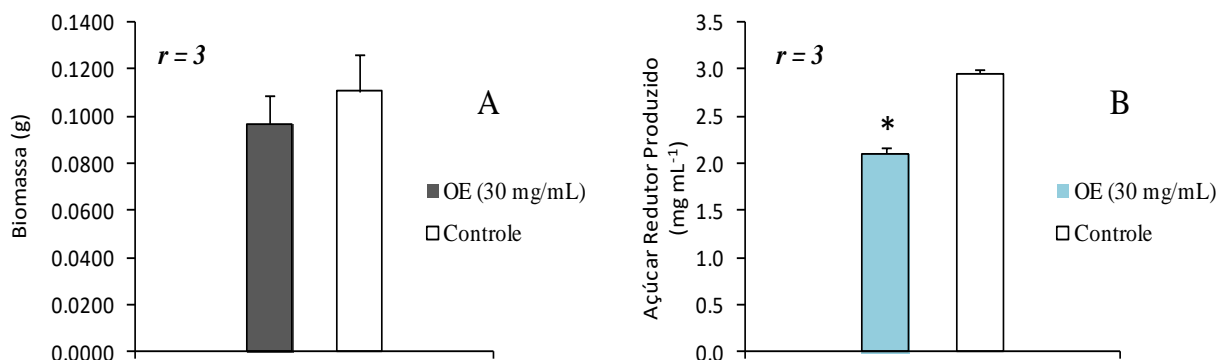
OECL – Óleo essencial da casca da laranja; A – Efeito germinativo; B – Desenvolvimento raízes; C – Desenvolvimento da parte aérea; Teste *t-Student* para amostras independentes com variâncias iguais; $*p < 0,05$, indica diferenças entre médias na presença e ausência do OECL.

Fonte: Autor (2024).

Os resultados observados nos ensaios de citotoxicidade apontam que a presença de 30 mg mL^{-1} de OECL (Figura 5A) no meio nutritivo não afeta a viabilidade celular da *S. cerevisiae*, pois não foram observadas diferenças

estatísticas em relação ao controle no que se refere a taxa de crescimento celular. A viabilidade de crescimento celular manteve-se estável e constante em todos os ensaios realizados.

Figura 5. Citotoxicidade *in vitro* do OECL sobre a *Saccharomyces. cerevisiae*.



OECL – Óleo essencial da casca da laranja; A – Crescimento e viabilidade celular; B – Alteração na eficiência enzimática. Teste *t-Student* para amostras independentes com variâncias iguais; * $p < 0,05$, indica diferenças entre médias na presença e ausência do OECL.

Fonte: Autor (2024).

Já para a atividade enzimática (Figura 4B) foram observadas diferenças estatísticas em relação ao controle no que se refere à capacidade da *Saccharomyces* processar o substrato sacarose pela ação da enzima invertase. Houve redução de 30% na eficiência de conversão da sacarose em glicose e frutose. Indicativo estes de que os compostos presentes no OECL apresentaram propriedades citotóxicas sobre as células (eucarióticas) da levedura alterando seu metabolismo enzimático, mas não sua capacidade reprodutiva (NELSON e COX, 2022; SINGH et al., 2010).

De forma geral, as atividades fitotóxicas e citotóxicas observadas apontam para uma relação direta com a composição do OECL. Embora seus mecanismos de ação não estejam totalmente elucidados, sabe-se que existe uma ação mais efetiva dos monoterpenos oxigenados (hidrofílicos) na germinação, na supressão do ciclo meristemático, e no aumento da formação de aberrações cromossômicas. E por outro lado, os monoterpenos hidrocarbonetos (lipofílicos), devido a sua maior capacidade de penetração nas membranas, reduzem ou restringem a respiração mitocondrial e induzem a peroxidação lipídica, afetando diretamente a formação dos microtúbulo, o que proporciona a

ruptura da membrana plasmática e extravasamento do conteúdo celular (ABD-ELGAWAD et al., 2020; ALVES et al., 2023; FAGODIA et al., 2017; GETTYS et al., 2022; IBÁÑEZ et al., 2022; JIANG et al., 2021).

4 CONCLUSÃO

A exploração do OECL das cascas residuais de laranja apresenta-se promissora quanto ao rendimento de obtenção e atividades biológicas, principalmente por se tratar de um subproduto obtido de uma fonte residual. Foi possível obter um óleo essencial com parâmetros físicos dentro dos padrões de qualidade estabelecidos para óleo de laranja doce, em sua composição química houve predominância de substâncias com atividades biológicas conhecidas, limoneno (96,37%), β -pineno (1,37% e linalol (2,26%). O OECL mostrou-se efetivo como agente antioxidante, com $CE_{50} = 89 \text{ mg mL}^{-1}$ sobre o DPPH, apresentou efeito fitotóxico sobre o desenvolvimento de folíolos em plantas dicotiledôneas e com propriedade de inibição da atividade enzimática em leveduras em concentrações de até 30 mg mL^{-1} . Estudos mais aprofundados devem ser realizados para desenvolvimento de técnicas de aplicação mais eficazes, elucidação dos mecanismos

de ação e a avaliação de sua seletividade e espectro de ação.

AGRADECIMENTOS

Agradecer ao Instituto Federal do Espírito Santo - IFES, a Universidade Federal do Espírito Santo – UFES, a Fundação de Amparo ao Pesquisador Espírito Santo (FAPES) pelo apoio logístico e financeiro.

REFERÊNCIAS

ABD-ELGAWAD, A. M.; EL GENDY, A. E. N. G.; ASSAEED, A. M.; AL-ROWAILY, S. L.; ALHARTHI, A. S.; MOHAMED, T. A.; ELSHAMY, A. I. Phytotoxic effects of plant essential oils: A systematic review and structure-activity relationship based on chemometric analyses. **Plants**, v. 10, n. 1, p.36. 2020. <<https://doi.org/10.3390/plants10010036>>

AL KAMALY, O.; NUMAN, O., ALMRFADI, O. M.; ALANAZI, A.S. CONTE, R. Separation and evaluation of potential antioxidant, analgesic, and anti-inflammatory activities of limonene-rich essential oils from *Citrus sinensis* (L.). **Open Chemistry**, v. 20, n. 1, p. 1517-1530, 2022. <<https://doi.org/10.1515/chem-2022-0254>>

ALANAZ, A.R.; ALOTAIBI, R.S.; ALHARBI, B.M. The Bio-herbicide potential of some wild plants with allelopathic effects from Tabuk Region on selected local weed species. **Frontiers in Plant Science**, v. 14, p. 1286105. 2023. <<https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1286105>>

ALKANAT, M.; ALKANAT, H.; KESKIN, A. D-Limonene decreases depression-like behavior and improves memory via an anti-neuroinflammatory mechanism under chronic restraint stress in rats. **Authorea Preprints**, 2023.

<<https://doi.org/10.22541/au.169111644.46615013/v1>>

ALVES, T. D. A.; VENANCIO, A. N.; ALVES, T. D. A.; VASCONCELOS, L. C.; TULER, A. C.; SILVA, M. A.; PRAÇA-FONTES, M. M. Chemical composition, phytotoxic, and cytogenotoxic properties of essential oils from *Psidium cauliflorum* and *Psidium acidum* (Myrtaceae). **Bragantia**, v. 83, p.e20230180. 2023. <<https://doi.org/10.1590/1678-4499.20230180>>

ANDRIYEVSKY, B.; ANDRIYEVSKA, L.; PIECUCH, T.; KOWALCZYK, A. Optical Refractive Properties of Some Plant Oils. **Rocznik Ochrona Środowiska**, v. 18, n.1, p.597-608. 2016. ISSN 1506-218X. Disponível em <https://www.researchgate.net/publication/328600903_Optical_refractive_properties_of_some_plant_oils/citations> Acessados em 14 de mar. de 2024.

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils - A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 2, p.446-475. 2008. <<https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.09.106>>

BARROS GOMES, P.R.; DA COSTA LEITE JÚNIOR, J.D. D; DE SOUSA, D.A.; OLIVEIRA EVERTON, G.; BATISTA REIS, J.; COSTA LOUZEIRO, H.; MOUCHREK FILHO, V. E. Estudo da composição química, toxicidade e atividade moluscicida do óleo essencial *Citrus sinensis* (L.) Osbeck. **Revista Colombiana de Ciências Químico-Farmacéuticas**, v. 49, n. 1, p. 28-43, 2020. <<https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v49n1.87004>>

BASSOLÉ, I. H.; JULIANI, H. R. Essential oils in combination and their antimicrobial properties. **Molecules**, v. 17,

00_6ed_2019.pdf>. Acesso em 12 de mar. de 2024.

BRONZETTI, G.; MORICHETTI, E.; CROCE, C.D.; CARRATRYORE, R.D.; GIROMINI, L.; GALLI, A. Vanadium: genetical and biochemical investigations. **Mutagenesis**, v. 5, n. 3, p. 293-296, 1990. <<https://doi.org/10.1093/mutage/5.3.293>>

BURT, S. Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods - A review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, n. 3, p.223-253. 2004. <<https://doi.org/10.1016/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022>>

CASAS CARDOSO, L.; CEJUDO BASTANTE, C.; MANTELL SERRANO, C.; MARTÍNEZ DE LA OSSA, E. J. Application of citrus by-products in the production of active food packaging. **Antioxidants**, v. 11, n. 4, p. 738, 2022. <<https://doi.org/10.3390/antiox11040738>>

COSTA NETO, C. **Análise orgânica: métodos e procedimentos para a caracterização de organoquímios**. Rio de Janeiro: Editora UFRJ. 1500p. 2004. ISBN: 857108260X.

DA SILVA RIVAS, A.C.; LOPES, P.M.; DE AZEVEDO BARROS, M.M.; COSTA MACHADO, D.C.; ALVIANO, C.S.; ALVIANO, D.S. Biological activities of α -pinene and β -pinene enantiomers. **Molecules**, v. 17, n. 6, p.6305-6316. 2012. <<https://doi.org/10.3390/molecules17066305>>

DE FREITAS, J.; WINTZ, H.; HYOUN KIM, J.; POYNTON, H.; FOX, T.; VULPE, C. Yeast, a model organism for iron and copper metabolism studies. **Biometals**, v. 16, n. 1, p.185-197, 2003. <<https://doi.org/10.1023/A:1020771000746>>

DE JESUS, V.L.B.; PALMA, D.A. Medição da densidade do óleo: uma discussão sobre sua otimização e diminuição dos custos via incerteza relativa da medição. **Revista Brasileira de Ensino de Física**, v. 30, n. 3, p.3302.1-3302.6. 2008. <<https://doi.org/10.1590/S1806-11172008005000002>>

DE SOUSA, A. E.; MELO, R. P.; GAGLIARDI, P. R.; NUNES, G. H. D. S.; OSTER, A. H.; SILVA, E. D. O. Antifungal action of essential oils against *Fusarium rot* in melon. **Revista Caatinga**, v. 36, p.486-493. 2023. <<https://doi.org/10.1590/1983-21252023v36n301rc>>

DE SOUZA, T.D.S.; DA SILVA FERREIRA, M.F.; MENINI, L.; DE LIMA SOUZA, J.R.C.; PARREIRA, L. A.; CECON, P.R.; FERREIRA, A. Essential oil of *Psidium guajava*: Influence of genotypes and environment. **Scientia Horticulturae**, v. 216, p.38-44. 2017. <<http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2016.12.026>>

DEWICK, P.M. **Medicinal natural products: a biosynthetic approach**. 3 ed. John Wiley & Sons, 2011. ISBN 9781119964575.

DO, T.K.T.; HADJI-MINAGLOU, F.; ANTONIOTTI, S.; FERNANDEZ, X. Authenticity of essential oils. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 66, p.146-157. 2015. <<https://doi.org/10.1016/j.trac.2014.10.007>>

EDDIN, L. B.; JHA, N. K.; MEERAN, M. N.; KESARI, K. K., BEIRAM, R.; OJHA, S. Neuroprotective potential of limonene and limonene containing natural products. **Molecules**, v. 26, n. 15, p.4535. 2021. <<https://doi.org/10.3390/molecules26154535>>

- FAGODIA, S. K.; SINGH, H. P.; BATISH, D. R.; KOHLI, R. K. Phytotoxicity and cytotoxicity of *Citrus aurantiifolia* essential oil and its major constituents: Limonene and citral. **Industrial crops and products**, v. 108, p.708-715. 2017. <<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.07.005>>
- FOYER, C. H.; NOCTOR, G. Ascorbate and glutathione: the heart of the redox hub. **Plant physiology**, 155(1), 2-18. 2011. <<https://doi.org/10.1104/pp.110.167569>>
- GETTYS, L. A.; THAYER, K. L.; SIGMON, J. W. Phytotoxic effects of acetic acid and d-limonene on four aquatic plants. **HortTechnology**, v. 32, n. 2, p.110-118. 2022. <<https://doi.org/10.21273/HORTTECH04986-21>>
- GOBARA, B.N.K. **Participação do ácido abscísico como mediador de respostas do metabolismo e desenvolvimento foliar em *Guzmania monostachia* sob restrição hídrica**. 2019. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. <<https://doi.org/10.11606/T.41.2020.tde-13022020-111413>>
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free radicals in biology and medicine**. Oxford university press, USA, 2015. ISBN 978-0-19-871747-8. Disponível em: <https://books.google.com.br/books?hl=pt-BR&lr=&id=3DIKCgAAQBAJ&oi=fnd&pg=PP1&dq=Free+radicals+in+biology+and+medicine&ots=bqiA8TBqpS&sig=rY-lz8C_QS2sXpZbb1dS7xipCFc#v=onepage&q=Free%20radicals%20in%20biology%20and%20medicine&f=false>
- HAZRATI, H.; SAHARKHIZ, M.J.; NIAKOUSARI, M.; MOEIN, M. Natural herbicide activity of *Satureja hortensis* L. essential oil nanoemulsion on the seed germination and morphophysiological features of two important weed species. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 142, p. 423-430, 2017. <<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.04.041>>
- HIMED, L.; MERNIZ, S.; MONTEAGUDO-OLIVAN, R.; BARKAT, M.; CORONAS, J. Antioxidant activity of the essential oil of *Citrus limon* before and after its encapsulation in amorphous SiO₂. **Scientific African**, v. 6, p.e00181. 2019. <<https://doi.org/10.1016/j.sciaf.2019.e00181>>
- IAL - INSTITUTO ADOLFO LUTZ, I. A. L. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. 4 ed., 1020p 2008. Disponível em <https://wp.ufpel.edu.br/nutricaoobromatologia/files/2013/07/NormasADOLFOLUTZ.pdf> Acessado em 30 de mai. de 2023.
- IBÁÑEZ, M. D.; SANCHEZ-BALLESTER, N. M.; BLÁZQUEZ, M. A. Encapsulated limonene: A pleasant lemon-like aroma with promising application in the agri-food industry. A review. **Molecules**, v. 25, n. 11, p.2598. 2022. <<https://doi.org/10.3390/molecules25112598>>
- IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Levantamento Sistemático da Produção Agrícola**. Rio de Janeiro, 2023. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/home/lspa/espírito-santo>>. Acesso em 12 de mar. 2024.
- INCAPER - INSTITUTO CAPIXABA DE PESQUISA, ASSISTÊNCIA TÉCNICA E EXTENSÃO RURAL. **Polos de Fruticultura - Laranja**. Vitória, 2023. Disponível em: <<https://incaper.es.gov.br/fruticultura-laranja>>. Acesso em 09 de mar. 2024.
- INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. ISO

- 3140:2019(E). Essential oil of sweet orange expressed [*Citrus sinensis* (L.)]. Geneva: ISO, 2019. Disponível em: <<https://cdn.standards.iteh.ai/samples/74546/29e56c6708e14f9996fc5bda21efc05b/ISO-3140-2019.pdf>>. Acesso em 14 de mar. de 2024.
- ISMAN, M.B., MIRESMALLI, S., MACHIAL, C. Commercial opportunities for pesticides based on plant essential oils in agriculture, industry and consumer products. **Phytochemistry Review**. v. 10, p. 197–204. 2011. <<https://doi.org/10.1007/s11101-010-9170-4>>
- JABIR, M.S.; TAHA, A.A.; SAHIB, U. I. Antioxidant activity of Linalool. **Engineering and Technology Journal**, v. 36, n. 1, 2018. <<https://doi.org/10.1016/10.30684/etj.36.1.B.11>>
- JIANG, C.; ZHOU, S.; LIU, L.; TOSHMATOV, Z.; HUANG, L.; SHI, K.; E SHAO, H. Evaluation of the phytotoxic effect of the essential oil from *Artemisia absinthium*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 226, p.112856. 2021. <<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112856>>
- KASEMETS, K.; IVASK, A.; DUBOURGUIER, H. C.; KAHRU, A. Toxicity of nanoparticles of ZnO, CuO and TiO₂ to yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Toxicology in Vitro**, v. 23, n. 6, p.1116-1122. 2009. <<https://doi.org/10.1016/j.tiv.2009.05.015>>
- KIM, M.; SOWNDHARARAJAN, K.; PARK, S.J.; E KIM, S. Effect of inhalation of isomers (+)- α -pinene and (+)- β -pinene on human electroencephalographic activity according to gender difference. **European Journal of Integrative Medicine**, v. 17, p.33-39. 2018. <<https://doi.org/10.1016/j.eujim.2017.11.005>>
- LI, E.; MIRA DE ORDUÑA, R. A rapid method for the determination of microbial biomass by dry weight using a moisture analyser with an infrared heating source and an analytical balance. **Letters in applied microbiology**, v. 50, n. 3, p.283-288. 2010. <<https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2009.02789.x>>
- LI, Y., FAN, L., SUN, P., XIN, X. Mechanism of action of essential oil from *Saussurea involucreta* on the apoptosis and cell cycle of colon cancer cells. **Food Science & Nutrition**, v. 8, n. 1, p.285-293. 2020. <<https://doi.org/10.1016/10.1002/fsn3.1283>>
- MAES, C.; MEERSMANS, J.; LINS, L.; BOUQUILLON, S.; FAUCONNIER, M. L. Essential Oil-Based Bioherbicides: Human Health Risks Analysis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 17, p. 9396, 2021. <<https://doi.org/10.3390/ijms22179396>>
- MAGALHÃES, M. L.; IONTA, M.; FERREIRA, G. Á.; CAMPIDELLI, M. L. L.; NELSON, D. L.; FERREIRA, V. R. F.; CARDOSO, M. D. G. Biological activities of the essential oil from the Moro orange peel (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck). **Flavour and fragrance journal**, v. 35, n. 3, p.294-301. 2020. <<https://doi.org/10.1002/ffj.3561>>
- MARCHI, G.; MARCHI, E.C.S.; GUIMARÃES, T.G.. **Herbicidas: mecanismos de ação e uso**. 2008. Disponível em: <<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/571939/1/doc227.pdf>> Acessado em 20 de junho de 2023.
- MAUERHOFER, L.; PAPPENREITER, P.; PAULIK, C.; SEIFERT, A.H.; BERNACCHI, S.; SIMON, K.M.R.

Methods for quantification of growth and productivity in anaerobic microbiology and biotechnology. **Folia microbiologica**, v. 64, n. 3, p.321-360. 2019. <<https://doi.org/10.1007/s12223-018-0658-4>>

MENDESa, L. A.; SILVA, R. R. A.; DE OLIVEIRA, E. E.; CORRÊA, M. J. M.; MARQUES, C. S.; DA SILVA FERREIRA, M. F.; MOREIRA, R. P. L. Optimization of inclusion complex's preparation of *Psidium cattleianum* S. essential oil and 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin by central composite design for application as larvicide in *Aedes aegypti* L. **Industrial Crops and Products**, v. 194, p. 116333. 2023. <[2023.https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2023.116333](https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2023.116333)>

MENDESb, L. A.; VASCONCELOS, L. C.; FONTES, M. M. P.; DA SILVA FERREIRA, M. F.; TEIXEIRA, R. R.; MOREIRA, R. P. L. Complexos de inclusão de óleos essenciais de *Psidium* para aplicação larvicida, herbicida e citogenotóxica. **Seven Editora**, 2023. <<https://doi.org/10.56238/tecnolocienagrariabiosoci-003>>

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in plant science**, v.7, n. 9, p.405-410. 2002. <[https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(02\)02312-9](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(02)02312-9)>

MORANO, K.A.; GRANT, C.M.; MOYEROWLEY, W.S.. The response to heat shock and oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae*. **Genetics**, v. 190, n. 4, p.1157-1195. 2012. <<https://doi.org/10.1534/genetics.111.128033>>

NAM, S.Y.; CHUNG, C.K.; SEO, J.H.; RAH, S.Y.; KIM, H.M.; E JEONG, H.J. The therapeutic efficacy of α -pinene in an experimental mouse model of allergic rhinitis. **International**

immunopharmacology, v. 23, n. 1, p.273-282. 2014. <<https://doi.org/10.1016/j.intimp.2014.09.010>>

NELSON, D.L.; COX, M.M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 8 ed. Porto Alegre: Artmed, 2022. 1278 p. ISBN 978-13-1922-800-2. Disponível em: <https://books.google.com.br/books?hl=pt-BR&lr=&id=HVSbEAAAQBAJ&oi=fnd&pg=PT8&dq=Princ%C3%ADpios+de+bioqu%C3%ADmica+de+Lehninger&ots=fWfukNPL8G&sig=XdvJCik_iOVV93gpfSU97tmYeRc#v=onepage&q=Princ%C3%ADpios%20de%20bioqu%C3%ADmica%20de%20Lehninger&f=false> Acessado em 13 de out. de 2023.

NEPALI, K.; SHARMA, S.; SHARMA, M.; BEDI, P. M. S.; DHAR, K. L. Rational approaches, design strategies, structure activity relationship and mechanistic insights for anticancer hybrids. **European journal of medicinal chemistry**, v. 77, p. 422-487, 2014. <<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.03.018>>

OLIVEIRA EVERTON, G.; PEREIRA ARAÚJO, R.J.; DA SILVA DOS SANTOS, A.B.; SERRA ROSA, P.V.; DE OLIVEIRA CARVALHO JUNIOR, R. G.; TELES, A. M.; MOUCHREK FILHO, V.E. Caracterização química, atividade antimicrobiana e toxicidade dos óleos essenciais da Pimenta dioica L.(pimenta da Jamaica) e *Citrus sinensis* L. Osbeck (laranja doce). **Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas**, v. 49, n. 3, p. 641-655, 2020. <<https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v49n3.91253>>

ORSO, V.T.; RODRIGUES, W.L.; CORT, J.D.; ZANETTI, M.; COLPANI, G.L.; ZEFERINO, R.C.F. Attainment and Characterization of Orange Essential Oil Obtained from Residues of *Citrus sinensis* 'Valencia'. **Research, Society and**

Development, [S. l.], v. 11, n. 9, p.e34211931876. 2022. <<https://doi.org/10.33448/rsd-v11i9.31876>>

PATEIRO, M.; MUNEKATA, PE; SANT'ANA, AS; DOMÍNGUEZ, R.; RODRÍGUEZ-LÁZARO, D.; LORENZO, JM. Application of essential oils as antimicrobial agents against spoilage and pathogenic microorganisms in meat products. **International Journal of Food Microbiology**, v. 337, p.108966. 2021. <<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108966>>

PAULA, C.S.; CANTELI, V.C.D.; DA SILVA, C.B.; MIGUEL, O.G.; MIGUEL, M.D. Potencial fitotóxico com enfoque alelopático de *Bauhinia unguolata* L. sobre sementes e plântulas de alface e cebola. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 36, n. 3, 2015. Disponível em <<https://rcfba.fcfar.unesp.br/index.php/ojs/article/view/34/33>> Acessado em 18 de mai. de 2023.

PEANA, A. T.; MARZOCCO, S.; POPOLO, A.; PINTO, A. (-)-Linalool inhibits *in vitro* NO formation: probable involvement in the antinociceptive activity of this monoterpene compound. **Life sciences**, v. 78, n. 7, p.719-723. 2006. <<https://doi.org/10.1016/j.lfs.2005.05.065>>

PEREIRA, I.; SEVERINO, P.; SANTOS, A. C.; SILVA, A. M.; SOUTO, E. B. Linalool bioactive properties and potential applicability in drug delivery systems. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 171, p.566-578. 2018. <<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.08.001>>

PICCIALLI, I.; TEDESCHI, V.; CAPUTO, L.; AMATO, G.; DE MARTINO, L.; DE FEO, V.; PANNAZIONE, A. The antioxidant activity of limonene counteracts

neurotoxicity triggered by A β 1-42 oligomers in primary cortical neurons. **Antioxidants**, v. 10, n. 6, p.937. 2021. <<https://doi.org/10.3390/antiox10060937>>

PINEDA-LOZANO, J. E.; FONSECA-BUSTOS, V.; MARTINEZ-MORENO, A. G.; VIRGEN-CARRILLO, C. A. The biological effect of orange (*Citrus sinensis* L.) by-products on metabolic biomarkers. **A systematic review**. 2022. <<https://doi.org/10.3389/fsufs.2022.1003144>>

RUFINO, M.D.S.M.; ALVES, R.E.; DE BRITO, E.S.; DE MORAIS, S.M.; SAMPAIO, C.D.G.; PÉREZ-JIMENEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F.D. Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH. **Embrapa Agroindústria Tropical-Comunicado Técnico** (INFOTECA-E), 2007. Disponível em <<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/426953/1/Cot127.pdf>> Acessado em mai. de 2023.

SANTOS, A.A.D.; DEOTI, J.R.; MÜLLER, G.; DÁRIO, M.G.; STAMBUK, B.U.; ALVES, S.L. Dosagem de açúcares redutores com o reativo DNS em microplaca. **Brazilian Journal of Food Technology**, 20. 2017. <<https://doi.org/10.1590/1981-67>>

SANTOS, F. R. D.; SOUZA, J. L. D. C.; SILVA, B. R. D.; PEREIRA, C. C. D. O.; FLORES, R. A.; SOUZA, E. R. B. D. Yield of essential oil from varieties of *Citrus sinensis* (L.) Osbeck. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 45, p.e-496. 2023. <<https://doi.org/10.1590/0100-29452023496>>

SEOL, G.H.; KANG, P.; LEE, H.S.; SEOL, G.H. Antioxidant activity of linalool in patients with carpal tunnel syndrome. **BMC neurology**, v. 16, p.1-6.

2016. <<https://doi.org/10.1186/s12883-016-0541-3>>

SHARIFI-RAD, M., VARONI, E. M., IRITI, M., MARTORELL, M., SETZER, W. N., e DEL MAR CONTRERAS, M. Carvacrol and human health: A comprehensive review. **Phytotherapy Research**, v. 32, n.9, p.1675-1687. 2018. <<https://doi.org/10.1016/10.1002/ptr.6103>>

SHRINER, R.L.; HERMANN, C.K.; MORRILL, T.C., CURTIN, D.Y.; FUSON, R.C. **The systematic identification of organic compounds**. John Wiley & Sons, 2004. ISBN 0-471-21503-1. Disponível em <https://celqusb.files.wordpress.com/2018/04/kupdf-com_systematic-identification-of-organic-compounds-wiley-shrinerhermannmorrillcurtinfuson.pdf> Acessado em 03 de fev. de 2024.

SINGH, P.; SHUKLA, R.; PRAKASH, B.; KUMAR, A.; SINGH, S.; MISHRA, P. K.; DUBEY, N.K. Chemical profile, antifungal, antiaflatoxic and antioxidant activity of *Citrus maxima* Burm. and *Citrus sinensis* (L.) Osbeck essential oils and their cyclic monoterpene, DL-limonene. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, n. 6, p. 1734-1740, 2010. <<https://doi.org/10.1016/j.fct.2010.04.001>>

SURI, S.; SINGH, A.; NEMA, P.K. Current applications of citrus fruit processing waste: A scientific outlook. **Applied Food Research**, p. 100050, 2022. <<https://doi.org/10.1016/j.afres.2022.100050>>

TAIZ, L.; ZEIGER, E.; MØLLER, I. M.; MURPHY, A. **Fisiologia e desenvolvimento vegetal**. 6 ed. Porto Alegre. Artmed Editora, 2017. ISBN 978-16-05352-55-8. Disponível em: <<https://books.google.com.br/books?hl=pt-BR&lr=&id=PpO4DQAAQBAJ&oi=fnd&>

[pg=PR1&dq=Fisiologia+e+desenvolvimento+vegetal&ots=7SBguZIOPb&sig=Z3ysXRrVj4jjBUUdo6xf6fZ68-w#v=onepage&q=Fisiologia%20e%20desenvolvimento%20vegetal&f=false](https://doi.org/10.1016/j.afres.2022.100050)> Acessado em 13 out. de 2023.

TEKE, M. A.; MUTLU, Ç. Insecticidal and behavioral effects of some plant essential oils against *Sitophilus granarius* L. and *Tribolium castaneum* (Herbst). **Journal of Plant Diseases and Protection**, v. 128, n. 1, p. 109-119, 2021. <<https://doi.org/10.1007/s41348-020-00377-z>>

TISSOT, E.; ROCHAT, S.; DEBONNEVILLE, C.; CHAINTREAU, A. Rapid GC-FID quantification technique without authentic samples using predicted response factors. **Flavour and fragrance journal**, 27(4), 290-296, 2012. <<https://doi.org/10.1002/ffj.3098>>

TORRES-ALVAREZ, C.; NÚÑEZ GONZÁLEZ, A.; RODRÍGUEZ, J.; CASTILLO, S.; LEOS-RIVAS, C.; BÁEZ-GONZÁLEZ, J.G. Chemical composition, antimicrobial, and antioxidant activities of orange essential oil and its concentrated oils. **CyTA-Journal of Food**, v. 5, n. 1, p.129-135. 2017. <<https://doi.org/10.1080/19476337.2016.1220021>>

TREVISAN, R.R.; LIMA, C.P.; MIYAZAKI, C.M.S.; PESCI, F.A.; SILVA, C.B.; HIROTA, B.C.K.; ZANIN, S.M.W. Avaliação da atividade fitotóxica com enfoque alelopático do extrato das cascas de *Celtis iguanaea* (Jacq.) Sargent Ulmaceae e purificação de dois triterpenos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, p. 494-499, 2012. <<https://doi.org/10.1590/S1516-05722012000300011>>

TUREK, C.; STINTZING, F.C. Stability of essential oils: a review. **Comprehensive reviews in food science and food safety**,

v. 12, n. 1, p.40-53. 2013.
<<https://doi.org/10.1111/1541-4337.12006>>

USDA - UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. **Citrus: World Markets and Trade**. Jan 2023. Disponível em: <<https://www.fas.usda.gov/data/citrus-world-markets-and-trade>> Acesso em 12 de mar. 2024.

VALKO, M.; RHODES, C.J.; MONCOL, J.; IZAKOVIC, M.; MAZUR, M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chemico-biological interactions**, v. 160, n. 1, p.1-40. 2006.
<<https://doi.org/10.1016/j.cbi.2005.12.009>>

VASCONCELOS, N.M.; PINTO, G.A.S.; DE ARAGAO, F.A.S. Determinação de açúcares redutores pelo ácido 3,5-dinitrosalicílico: histórico do desenvolvimento do método e estabelecimento de um protocolo para o laboratório de bioprocessos. **Embrapa Agroindústria Tropical-Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento (INFOTECA-E)**, 2013. ISSN 1679-6543.
<<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/982130/1/BPD13017.pdf>>
Acessado em mer. de 2024.

VERDEGUER, M.; SÁNCHEZ-MOREIRAS, A. M.; ARANITI, F. Phytotoxic effects and mechanism of action of essential oils and terpenoids. **Plants**, v. 9, n. 11, p.1571. 2020.
<<https://doi.org/10.3390/plants9111571>>

WANG, J.; ZHAO, F.; HUANG, J.; LI, Q.; YANG, Q.; JU, J. Application of essential oils as slow-release antimicrobial agents in food preservation: Preparation strategies, release mechanisms and application cases. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, p. 1-11. 2023.

<<https://doi.org/10.1080/10408398.2023.2167066>>

WOJTUNIK-KULESZA, K. A.; KASPRZAK, K.; ONISZCZUK, T.; ONISZCZUK, A. Natural monoterpenes: Much more than only a scent. **Chemistry & biodiversity**, v. 16, n. 12, p. e1900434. 2019.
<<https://doi.org/10.1002/cbdv.201900434>>

XANTHIS, V.; FITSIOU, E.; VOULGARIDOU, G. P.; BOGADAKIS, A.; CHLICHLIA, K.; GALANIS, A.; PAPPA, A. Antioxidant and cytoprotective potential of the essential oil Pistacia lentiscus var. chia and its major components myrcene and α -pinene. **Antioxidants**, v. 10, n. 1, p.127. 2021.
<<https://doi.org/10.3390/antiox10010127>>

ZHANG, L.; SUN, W., LI, L.; ZHANG, X.; TONG, J. Neuro-protective effect of Linalool against spinal cord injury in rats and the mechanism involved. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, v. 22, n. 2, 2023. <<https://doi.org/10.37360/blacpma.23.22.2.16>>

