



Valorização de sementes de Citrus limonia como ingrediente funcional: atividade antioxidante e antimicrobiana

Valorization of Citrus limonia seeds as a functional ingredient: antioxidant and antimicrobial activity

João Paulo Martins Miranda¹, Lilian de Souza Vismara¹, Milene Oliveira Pereira¹

AUTHOR AFILIATIONS

1 – Universidade Federal
Tecnológica do Paraná

ORCIDS AND CONTACT

João Paulo Martins Miranda
Orcid: 0009-0002-0551-066X
Email:
joaopaulomartins97@hotmail.com
Lilian de Souza Vismara
Orcid: 0000-0002-2879-1401
Email:
lilianvismara@professores.utfpr.edu.br
Milene Oliveira Pereira
Orcid: 0000-0002-6183-2893
Email:
milenepereira@utfpr.edu.br

ABSTRACT

Citrus fruit extracts are important sources of phenolic acids and flavonoids. However, the citrus processing industry generates approximately 60% of waste, such as peels, seeds, and pomace, after processing. The objective was to evaluate the antioxidant and antimicrobial potential of *Citrus limonia* seeds. The extraction of bioactive compounds was carried out using a triple factorial with control treatment in a completely randomized design, where the effect of temperature (40; 55; 70°C), time (15; 37.5; 60 min), and ethyl alcohol concentration as solvent (60; 75; 90%) were evaluated, maintaining a constant seed:solvent ratio of 1:25 (w:v). The extracts were quantified for phenolic compound content by the Folin-Ciocalteu method and antioxidant activity by the DPPH•, ABTS•+, and FRAP methods. The highest content of phenolic compounds ($2985.20 \pm 29.76 \mu\text{g EAG}\cdot\text{g}^{-1}$) was obtained using 90% solvent at 70°C for 15 minutes, also allowing the best extraction of antioxidant compounds detected by the ABTS•+ method ($1.61 \pm 0.03 \mu\text{g ET}\cdot\text{g}^{-1}$). *Citrus limonia* seeds demonstrated antibacterial action against *Staphylococcus aureus*.

Keywords: Natural antioxidants, bioactive compounds, citrus seed, citrus byproduct, reuse.

RESUMO

Extratos de frutas cítricas são importantes fontes de ácidos fenólicos e de flavonoides. Por outro lado, a indústria de processamento de cítricos gera cerca de 60% de resíduo, tais como cascas, sementes e bagaço após o processamento. O objetivo foi avaliar o potencial antioxidante e antimicrobiano das sementes de *Citrus limonia*. O processo de extração dos compostos bioativos foi realizado

utilizando fatorial triplo com tratamento controle em um delineamento inteiramente casualizado, onde foi avaliado o efeito da temperatura (40; 55; 70 °C), tempo (15; 37,5; 60 minutos) e concentração de álcool etílico como solvente (60; 75; 90%), mantendo constante a proporção de semente:solvente em 1:25 (m:v). Os extratos foram quantificados quanto ao teor de compostos fenólicos pelo método de Folin-Ciocalteu e atividade antioxidante pelos métodos de DPPH•, ABTS•+ e FRAP. O maior teor de compostos fenólicos ($2985,20 \pm 29,76 \mu\text{g EAG}\cdot\text{g}^{-1}$) foi obtido utilizando 90% de solvente a 70°C durante 15 minutos, permitindo também a melhor extração de compostos antioxidantes detectados pelo método de ABTS•+ ($1,61 \pm 0,03 \mu\text{g ET}\cdot\text{g}^{-1}$). A semente de limão-cravo demonstrou ação antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus*.

Palavras-chave: Antioxidantes naturais, compostos bioativos, semente de citrus, subproduto cítrico, reaproveitamento.

INTRODUÇÃO

A produção mundial de limas ácidas e limões é estimada, pela FAO, em 21 milhões de toneladas em 1,3 milhão de hectares (ha), sendo a Índia, México, China, Argentina e Brasil os principais produtores. No Brasil, a produção foi de aproximadamente 1,6 milhão de toneladas com uma área de 63 mil ha, resultando em uma produtividade por área 60% maior que a média mundial (FAO, 2024).

A denominação 'limão' é genericamente usada para as frutas cítricas com o suco muito ácido, como siciliano, tahitiano ou persian lime e galego. No entanto, Tahiti (*Citrus latifolia*) e Galego (*C. aurantiifolia*) são, na verdade, limas ácidas sendo o limão, apenas o Siciliano (*C. limon*), também conhecido como limão verdadeiro (Silva & Landau, 2020). E ainda se tem o limão-cravo (*C. limonia*), que apesar de ser principalmente utilizado como porta-enxerto, seus frutos têm boa aceitação no mercado de

frutas frescas (Bastianel, 2022; Soares Filho et al., 2003).

O limão-cravo, conhecido também como limão rosa ou limão china, tem origem híbrida entre uma cidra e uma tangerina e desta, provavelmente, herdou a cor alaranjada intensa da sua casca e do suco, diferentemente das limas ácidas e limões. Suas plantas também são vigorosas, de tamanho médio, com poucos espinhos. Os frutos são de tamanho pequeno a médio (cerca de 100g), arredondados, com coloração amarelada a laranja avermelhada (Rebequi *et al.* 2009). O limão é uma fruta cítrica rica em vitaminas, principalmente vitamina C, fibras e potássio (Ferrari & Torres 2002). É extensamente cultivado em pomares e viveiros, pois induz a maturação precoce das frutas, proporcionando melhores preços no início da safra.

Uma grande parte das frutas cítricas é utilizada na indústria de processamento de

alimentos, principalmente na produção de suco, além de ser tecnologicamente empregada como flavorizante em alimentos, devido ao óleo essencial presente em sua casca (Reda *et al.* 2005). Aproximadamente 60% da massa do fruto permanece após o processamento, como cascas, sementes e resíduo de membrana, sendo estes resíduos transformados em outros produtos.

Nesse contexto, as sementes representam um desafio para a indústria de resíduos de uma perspectiva ambiental, uma vez que as mesmas são parcialmente utilizadas e, na sua maior parte, são aterradas, incineradas ou compostadas (Teigiserova *et al.* 2021). Por outro lado, frutas cítricas são conhecidas por conterem antioxidantes naturais no óleo, na polpa, na semente e na casca, e por isso despertam interesse industrial em retardar a oxidação e melhorar a qualidade nutricional dos alimentos (Kang *et al.* 2006).

De uma perspectiva da bioeconomia circular, uma opção é usar resíduos de frutas cítricas para extrair compostos de alto valor (Ozturk *et al.* 2019), como, por exemplo, o limoneno, o qual pode ser obtido no óleo essencial da casca, levando à valorização mais lucrativa desse resíduo. Além de óleo essencial, frutas cítricas, como o limão, são importantes fontes de ácidos fenólicos, como o ácido hidroxicinâmico e de flavonóides (flavononas e flavonóis) (Dimitrios 2006; Economos & Clay 1999). Esses compostos podem agir como redutores, interruptores de radicais livres,

inibidores ou supressores de oxigênio singlete e como inativadores de metais pró-oxidantes.

Diante disso, o objetivo desse trabalho foi determinar a composição centesimal da semente de limão-cravo (*Citrus limonia*) e determinar as condições experimentais de concentração de etanol, tempo e temperatura de extração capazes de maximizar a eficiência do processo.

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal

As sementes analisadas foram oriundas de limões maduros, da variedade cravo (*Citrus limonia* Osbeck), os quais foram coletados no pomar da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, campus Dois Vizinhos – Paraná. O clima local, segundo a classificação de Köppen, é do tipo Cfa, com precipitação média anual variando entre 1900 e 2200 mm e temperatura média anual entre 18 e 20°C. O relevo é constituído por planaltos com altitudes variando entre 600 e 800 m e encostas relativamente íngremes (IAPAR, 2024). Após a obtenção das sementes, estas foram lavadas com água destilada para a remoção de resíduos da polpa, secas em estufa com circulação de ar a 45°C por 24 horas para a redução do teor de umidade e trituradas (Mesh 20) em moinho analítico – IKA A11.

Análise centesimal da semente de limão

A caracterização das sementes de limão foi determinada de acordo com a metodologia oficial do Instituto Adolfo Lutz (2008), sendo analisados, em triplicata, o teor de umidade (método 012-IV), cinzas (método 018-IV), lipídios (método 032-IV), proteínas (método 036-IV), fibra bruta (método 044-IV), e os carboidratos foram quantificados por diferença.

Desenho experimental

O estudo foi realizado no Laboratório de Biotecnologia Ambiental e de Alimentos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), Campus Dois Vizinhos. Foram realizados dois experimentos: (1) para avaliar as causas de variação sobre a extração das sementes de limão em relação às variáveis-resposta como teor de compostos fenólicos (TCF), atividades antioxidantes pelo método do 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH), do 2,2'-Azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico (ABTS) e do complexo férrico-tripiridiltriazina (FRAP); e (2) para avaliar o efeito antimicrobiano contra *Staphylococcus aureus*.

No experimento (1) o delineamento foi inteiramente casualizado em esquema fatorial triplo: tempo (t: 15 min e 60 min), concentração do solvente álcool etílico (Êxodo) grau analítico (S: 60% e 90%) e temperatura (T: 40°C e 70°C) de extração das sementes de limão, com tratamento adicional como testemunha referência (controle: t=37,5 min, S=75% e T= 55°C),

inteiramente casualizado e balanceado considerando o modelo fixo, com três repetições (triplicatas).

Já o experimento (2) foi delineado inteiramente casualizado (DIC) balanceado, considerando o modelo fixo, com três repetições (triplicatas). Neste estudo, foram selecionados três extratos de sementes de limão, com melhor desempenho em relação ao experimento (1).

Extrato da semente de limão

O extrato hidroalcoólico da semente de limão foi obtido de acordo com Luzia & Jorge (2010), com modificações. Para os tratamentos, a proporção de semente:volume de solvente foi 1:12 (m:v). Os parâmetros concentração de solvente, tempo e temperatura de extração foram determinados de acordo com a Tabela 2. Cada ensaio foi submetido a uma etapa de reextração, de forma que o extrato final teve seu volume completado para 25 mL.

Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos totais foram quantificados pelo método de Folin-Ciocalteu descrito por Singleton *et al.* (1999) utilizando o ácido gálico entre 0 e 200 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ como padrão ($R^2=0,9986$). Um volume de 0,5 mL da solução de extrato foi misturado com 2,5 mL do reagente de Folin Ciocalteu 100 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ e 2 mL de solução de carbonato de sódio 40 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Essa mistura permaneceu em repouso por 90 minutos a

temperatura ambiente em ausência de luz. A absorbância foi registrada a 740 nm. Os resultados foram expressos em teor de compostos fenólicos como μg de equivalentes de ácido gálico (EAG) por grama de amostra ($\mu\text{g EAG}\cdot\text{g}^{-1}$).

Atividade antioxidante por DPPH

A atividade antioxidante do extrato de semente de limão foi analisada por meio do método do radical DPPH• (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) conforme descrito por Brand-Williams *et al.* (1995), com modificações, sendo utilizado como padrão o Trolox com uma curva padrão variando entre 200 e 2000 μmol de Trolox·L⁻¹ ($R^2=0,9976$). A reação ocorreu contendo 0,5 mL de extrato, 3,0 mL de etanol e 0,3 mL de uma solução de DPPH• na concentração de 0,6 mM. O experimento foi mantido em temperatura ambiente em ausência de luz por 30 minutos. Os valores de absorbância foram medidos em espectrofotômetro a 517 nm, sendo os resultados expressos em micrograma de equivalentes de Trolox por grama de amostra ($\mu\text{g ET}\cdot\text{g}^{-1}$).

Atividade antioxidante por ABTS

A determinação da atividade antioxidante pelo método do radical ABTS•+ foi segundo Re *et al.* (1999), sendo utilizado como padrão o Trolox nas concentrações entre 0 e 100 μmol de Trolox·g⁻¹ ($R^2= 0,9981$). Foram misturados 30 μL do extrato e 3,0 mL da solução contendo o radical

ABTS•+, sendo determinada a absorbância a 734 nm. Os resultados foram expressos em micrograma de equivalentes de Trolox por grama de amostra ($\mu\text{g ET}\cdot\text{g}^{-1}$).

Atividade antioxidante por FRAP

O poder redutor das amostras pelo método FRAP foi segundo Rufino *et al.* (2006), com modificações, sendo utilizado como padrão a solução de sulfato ferroso com uma curva padrão variando entre 50 e 2000 μmol de sulfato ferroso ($R^2= 0,9981$). A reação foi realizada com a mistura de 90 μL do extrato em 3 mL da solução do reagente FRAP, sendo a mistura mantida em banho-maria a 37°C durante trinta minutos. A absorbância foi medida em espectrofotômetro a 595 nm. O resultado foi expresso em micrograma de equivalente de Fe⁺² por grama de amostra ($\mu\text{g EFe}^{+2}\cdot\text{g}^{-1}$).

Atividade antimicrobiana do extrato de semente de limão

A ação antimicrobiana dos extratos obtidos da semente de limão foi analisada contra o microrganismo Gram-positivo (*Staphylococcus aureus*), sendo este um microrganismo indicado na Resolução nº 161/2022, estabelecida pela ANVISA (2022). Para uma análise qualitativa, foi aplicada a metodologia de difusão em ágar de acordo com NCCLS (2003), e para a análise quantitativa, foi aplicada a metodologia de Concentração Inibitória Mínima (CLSI, 2015)

dos extratos que apresentaram maior teor de compostos fenólicos para cada solvente utilizado.

Análise estatística

Para análise dos dados utilizou-se a ferramenta computacional R, versão 4.4.3. (R CORE TEAM, 2025) e os pacotes ExpDes.pt versão 1.2.2. (Ferreira et al., 2021), DescTools versão 0.99.28 (Signorell, 2019) e visreg versão 4.4.3.

Na análise do experimento (1), para verificar o pressuposto de normalidade dos resíduos, utilizou-se ao nível de 5% de significância o teste de Shapiro-Wilk (1965). Como foi atendido o pressuposto de normalidade, não foi necessário implementar uma transformação de dados das variáveis respostas observadas (compostos fenólicos, DPPH, ABTS, FRAP). Em seguida, foi realizada a análise de variância (ANAVA), sendo a estatística para tomada de decisão foi o valor-p, sendo, $p \leq 5\%$ (Ferreira et al., 2021). O teste de Dunnett foi aplicado para comparar o tratamento adicional (controle: 37,5 minutos, concentração do solvente: 75% e 55°C) com os diferentes níveis do fatorial (tempo: 15 e 60 min, concentração: 60 e 90% e temperatura: 40 e 70°C) (Signorell, 2019).

Para a análise do experimento (2), relacionado ao efeito antimicrobiano dos extratos, verificou-se os pressupostos do DIC com o teste de Shapiro-Wilk (1965) e de Bartlett (1937) para

verificar a homogeneidade de variâncias, ao nível 5% de significância. Na sequência, realizou-se a análise de variância (ANAVA), procedeu-se o teste de comparação de médias de Tukey, ao nível 5% de probabilidade de erro ($p \leq 5\%$) (Ferreira et al., 2021).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A composição centesimal obtida para as sementes de limão-cravo é descrita na Tabela 1.

Tabela 1 - Composição centesimal da semente de limão-cravo (*Citrus limonia*).

Componente	Luzia (2008)		
	Base úmida (%)	Base seca (g·g ⁻¹)	Base úmida (%)
Fibra Bruta	30,04 ± 4,90	0,40 ± 0,03	25,72
Umidade	23,99 ± 0,11	-	7,57
Lipídio	18,67 ± 0,37	0,25 ± 0,01	34,61
Proteína	15,21 ± 1,73	0,20 ± 0,00	17,83
Cinzas	7,24 ± 0,39	0,10 ± 0,00	2,22
Carboidratos	4,85	0,05	12,05

As sementes apresentaram elevado teor de fibra bruta (30,04%), estando superior ao valor obtido por Luzia (2008), que relatou quantidades de 25,72% e 19,80% de fibra bruta para sementes de limão-cravo e galego, respectivamente. A ingestão recomendada de fibras alimentares é de 25–30 g·dia⁻¹ (Bernaud & Rodrigues, 2013), assim as sementes de *Citrus limonia* podem constituir uma contribuição valiosa para atender às necessidades diárias de fibras. O uso da semente de limão pode ser sugerido também na forma de farinha destinada à ração animal.

A quantidade de lipídios (18,67%) e proteínas (15,21%) se mostrou superior aos valores demonstrados por Pereira (1996), que obteve 13,0% de lipídios e 10,4% de proteínas quando avaliou *Citrus limonia*. No entanto, são inferiores aos resultados reportados por Luzia (2008), que encontrou 34,61% de lipídios e 17,83% de proteínas.

Não há na literatura muitos trabalhos que avaliaram a composição nutricional da semente de limão-cravo (*Citrus limonia*), no entanto, há variada literatura relatando composição centesimal da polpa e casca de outras espécies de *Citrus*. Um estudo, realizado por Okwu & Emenike (2006), avaliou a composição nutricional de cinco espécies de *Citrus* (*C. sinensis*, *C. reticulate*, *C. limonum*, *C. aurantifolia* e *C. grandis*) e reportou teor de proteína (10,94–17,06%), fibra bruta (5,84–7,10%), carboidratos (70,86–77,10%), umidade (4,28–6,24%), lipídios (0,64–1,24%) e cinzas (4,40–7,80%).

Frutas cítricas são fontes de micronutrientes tais como os minerais. O conteúdo de cinzas encontrado na semente de limão-cravo (7,24%) foi superior ao encontrado por Luzia (2008) e similar ao encontrado por Okwu & Emenike (2006). O principal mineral presente no limão é o potássio, embora outros minerais como cálcio, magnésio e fósforo também estejam presentes em níveis menores. O potássio tem um papel importante para a saúde

humana, pois é essencial para manter o equilíbrio água-ácido e participa da transmissão do impulso nervoso para os músculos (Okwu & Emenike, 2007).

Na Tabela 2 apresenta-se a análise de variância (ANAVA) do teor de compostos bioativos. Na Tabela 3 os resultados do Teste de Dunnett, i.e.: comparação dos tratamentos com o controle referência em relação ao teor de compostos bioativos.

Tabela 2 - Análise de variância e médias do teor de compostos bioativos quanto a compostos fenólicos CF ($\mu\text{g EAG}\cdot\text{g}^{-1}$) e compostos antioxidantes, de acordo com metodologias de DPPH• ($\mu\text{g ET}\cdot\text{g}^{-1}$), ABTS•⁺ ($\mu\text{g ET}\cdot\text{g}^{-1}$) e FRAP ($\mu\text{g EFe}^{+2}\cdot\text{g}^{-1}$), para avaliar o modelo fixo balanceado do delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial triplo — tempo (t, min), concentração de solvente (S, %) e temperatura (T, °C) — com tratamento adicional (controle).

	t	S	T	CF	DPPH•	ABTS• ⁺	FRAP
Controle	37,5	75	55	1737,91 ^A	11,03 ^A	1,31 ^A	5,32 ^{ns}
Fatorial				2413,37 ^B	18,53 ^B	1,06 ^B	5,33 ^{ns}
Efeito/ Interação				TXSxt ^t	TXSxt ^{ns}	TXSxt ^t	TXSxt ^t
				TXS ^t	TXS ^{ns}	TXS ^t	TXS ^t
				TXt ^t	TXt ^t	TXt ^{ns}	TXt ^t
				Sxt ^t	Sxt ^t	Sxt ^t	Sxt ^t
				T ^t	T ^t	T ^t	T ^t
				S ^t	S ^t	S ^t	S ^t
				t ^t	t ^t	t ^t	t ^t
Níveis do Fatorial							
Tratamentos							
T1	15 (-1)	60 (-1)	40 (-1)	1625,65 ^a		0,67 ^{ns}	2,38 ^a
T2	60 (+1)	60 (-1)	40 (-1)	1421,20 ^b		0,66 ^{ns}	1,98 ^b
T3	15 (-1)	90 (+1)	40 (-1)	2641,60 ^{ns}		1,07 ^a	5,18 ^{ns}
T4	60 (+1)	90 (+1)	40 (-1)	2627,87 ^{ns}		0,84 ^b	5,24 ^{ns}
T5	15 (-1)	60 (-1)	70 (+1)	2124,44 ^b		1,21 ^{ns}	5,53 ^b
T6	60 (+1)	60 (-1)	70 (+1)	2901,46 ^a		1,24 ^{ns}	7,57 ^a
T7	15 (-1)	90 (+1)	70 (+1)	2985,20 ^{ns}		1,61 ^a	7,22 ^b
T8	60 (+1)	90 (+1)	70 (+1)	2979,56 ^{ns}		1,16 ^b	7,58 ^a
T1 T3	15 (-1)		40 (-1)		22,13 ^a		
T2 T4	60 (+1)		40 (-1)		19,31 ^b		

	t	S	T	CF	DPPH•	ABTS• ⁺	FRAP
T5 T7	15 (-1)		70 (-1)		17,08 ^a		
T6 T8	60 (+1)		70 (-1)		15,61 ^b		
T1 T5	15 (-1)	60 (-1)			19,22 ^{ns}		
T2 T6	60 (+1)	60 (-1)			18,66 ^{ns}		
T3 T7	15 (-1)	90 (+1)			20,00 ^a		
T4 T8	60 (+1)	90 (+1)			16,25 ^b		
Coefficiente de Variação (CV, %)				1,62	3,71	5,12	3,78

(-1) ou (+1) são os contrastes em relação ao valor de referência. Pelo teste F da ANAVA ($p \leq 0,05$), tem-se que: ^asignificativo; ^{ns}não significativo; letras maiúsculas diferentes nas colunas determinam o contraste do tratamento adicional (controle) com o fatorial; e letras minúsculas nas colunas determinam a diferença significativa entre os níveis do fatorial na interação tripla ou dupla.

Tabela 3 - Comparação dos vários níveis do fatorial (tratamentos) com o controle (referência) em relação ao teor de compostos bioativos quanto a compostos fenólicos CF ($\mu\text{g EAG}\cdot\text{g}^{-1}$) e compostos antioxidantes de acordo com metodologias de DPPH• ($\mu\text{g ET}\cdot\text{g}^{-1}$), ABTS•⁺ ($\mu\text{g ET}\cdot\text{g}^{-1}$) e FRAP ($\mu\text{g EFe}^{+2}\cdot\text{g}^{-1}$), pelo Teste de Dunnett.

	t	S	T		CF	DPPH•	ABTS• ⁺	FRAP
Controle	37,5	75	55	Média	1737,91	11,03	1,31	5,32
Níveis do Fatorial Tratamentos								
T1	15	60	40	Média	1625,65 ^a	21,83 ^{***}	0,67 ^{***}	2,38 ^{***}
				Diff IC	-112,26 [-202,95;-21,58]	10,80 [9,23;-12,38]	-0,64 [-0,77;-0,51]	-2,94 [-3,42;-2,46]
T2	60	60	40	Média	1421,20 ^{***}	20,42 ^{***}	0,66 ^{***}	1,98 ^{***}
				Diff IC	-316,72 [-407,40;-226,03]	9,39 [-203,0;-21,6]	-0,64 [-0,78;-0,51]	-3,34 [-3,82;-2,86]
T3	15	90	40	Média	2641,60 ^{***}	22,42 ^{***}	1,07 ^{***}	5,18 ^{ns}
				Diff IC	903,69 [813,00;994,37]	11,39 [9,82;12,96]	-0,24 [-0,37;-0,10]	-0,15 [-0,63;0,34]
T4	60	90	40	Média	2627,87 ^{***}	18,20 ^{***}	0,84 ^{***}	5,24 ^{ns}
				Diff IC	889,95 [799,27;980,64]	7,17 [5,57;8,99]	-0,47 [-0,59;-0,33]	-0,08 [0,56;0,40]
T5	15	60	70	Média	2124,44 ^{***}	16,60 ^{***}	1,21 ^{ns}	5,53 ^{ns}
				Diff IC	386,52 [295,84;477,21]	5,57 [3,99;7,14]	-0,10 [0,20;0,07]	0,21 [0,28;0,69]
T6	60	60	70	Média	2901,46 ^{***}	16,91 ^{***}	1,24 ^{ns}	7,57 ^{***}
				Diff IC	1163,55 [1072,87;1254,23]	5,88 [4,34;7,46]	-0,06 [0,17;-0,44]	2,24 [1,76;-2,73]
T7	15	90	70	Média	2985,20 ^{***}	17,57 ^{***}	1,61 ^{***}	7,22 ^{***}
				Diff IC	1247,29 [1156,60;1337,97]	6,54 [4,96;8,11]	0,30 [0,17;-0,44]	1,89 [1,41;-2,38]
T8	60	90	70	Média	2979,56 ^{***}	14,30 ^{***}	1,16 [*]	7,58 ^{***}
				Diff IC	1241,64 [1151,96;1332,33]	3,27 [1,69;4,84]	-0,14 [0,27;0,01]	2,25 [1,77;2,74]

Diferença significativa entre o tratamento controle e o nível do tratamento fatorial pelo teste de Dunnett : ^{*} $p \leq 0,05$, ^{**} $p \leq 0,01$ e, ^{***} $p \leq 0,001$, ao nível de significância de 5% para o conjunto de comparações. Diff é a diferença entre as médias observadas e IC é o Intervalo de 95% de Confiança para a média estimada.

A análise dos resultados obtidos para o teor de fenólicos das sementes de limão mostram concentrações significativas de compostos fenólicos, e que, podem estar relacionados a capacidade antioxidante e a atividade antimicrobiana (Tabelas 2 e 3).

Em termos do teor de compostos fenólicos, foi observado efeito significativo entre todos os tratamentos, bem como para a interação entre o fatorial $\times$ controle. O maior teor de compostos fenólicos foi obtido no T7 (2985,20 $\mu\text{g EAG}\cdot\text{g}^{-1}$) utilizando 90% de solvente a uma temperatura de 70°C durante 15 minutos, ao passo que, no T2, utilizando a concentração de 60% de solvente a 40°C por 60 min resultou no menor teor de compostos fenólicos (1421,20 $\mu\text{g EAG}\cdot\text{g}^{-1}$). Esses dados mostram a influência da maior temperatura (70°C) no processo de extração quando comparado ao T1 (40°C) e ao tratamento controle (55°C). Casagrande *et al.* (2018) utilizaram um planejamento fatorial para determinar parâmetros de extração de amostras de *Baccharis dracunculifolia* e obtiveram a maior quantificação de compostos fenólicos a 80°C, próximo aos valores do presente estudo. De acordo com Markon *et al.* (2007), uma maior temperatura no processo de extração permite que o solvente alcance com maior facilidade os espaços da matriz com solutos, permitindo a solubilização de uma maior quantidade e diversidade de solutos, como por exemplo, os compostos fenólicos. Nesse trabalho, o tempo de

15 min. pode ter contribuído para a extração de tais compostos sem que houvesse degradação.

Um estudo realizado por Robards & Antolovich (1997) mostrou que o grupo mais importante de compostos bioativos tanto na fruta de *Citrus limon* quanto em seu suco, são os flavonoides como: flavononas, flavonas, flavonóis e seus derivados. Sabendo que tais substâncias podem apresentar atividade antioxidante, foram realizadas as análises de determinação das atividades antioxidantes desses extratos por DPPH•, ABTS•+ e FRAP. Nenhum método *in vitro* é capaz de quantificar todos os antioxidantes, realizando apenas uma análise, pois cada método apresenta mecanismos de reação diferentes. Portanto, recomenda-se a utilização de, pelo menos, dois métodos complementares de avaliação, sendo o ensaio DPPH o mais comumente utilizado (Meng et al., 2012).

A análise DPPH é baseada no potencial de eliminação de radicais DPPH pelo extrato analisado. Nessa análise foi encontrada diferença significativa entre os tratamentos, bem como para a interação fatorial $\times$ controle. Na análise de DPPH•, T3 (90%, 15 min., 40°C) apresentou a maior atividade antioxidante (22,42 $\mu\text{g ET}\cdot\text{g}^{-1}$), ao passo que o controle (75%, 37,5 min., 55°C) apresentou a menor concentração (12,91 $\mu\text{g ET}\cdot\text{g}^{-1}$), corroborando que o aumento do tempo não favoreceu a extração de tais compostos. Maior tempo de extração pode acarretar em degradação

térmica interferindo na ação antioxidante dos compostos extraídos.

A diminuição da concentração de compostos antioxidantes com a aplicação de temperaturas mais elevadas também foi descrita por Barbosa *et al.* (2016) ao quantificarem tais compostos em extratos etanólico e hidroalcólico (etanol 80%) de grãos de milho. Rizi (2016) demonstrou a maior atividade antioxidante dos compostos fenólicos ao utilizar o menor tempo de extração e maior concentração de álcool etílico para obtenção do extrato de folhas de moringa.

O ensaio ABTS reage de forma semelhante ao DPPH, pela captura de radicais livres, enquanto o teste FRAP mede a capacidade da amostra (extrato) de reduzir Fe^{+3} a Fe^{+2} (Gullón et al., 2017). Para a análise de antioxidantes por ABTS, foi encontrada diferença significativa entre a média do controle e a do fatorial. Entretanto, o teste de Dunnett indicou que, para ABTS, T5 (15 min, 60%, 70°C) e T6 (60 min, 60%, 70°C) não diferiram significativamente ($p < 0,05$) do controle (37,5 min, 75%, 55°C), com 0,10 e 0,07 $\mu\text{g ET}\cdot\text{g}^{-1}$ de diferença nas médias observadas, respectivamente. Isso mostra que a influência do tempo não foi estatisticamente significativa a partir de 15 minutos, e com isso não se justifica o emprego de metodologias extrativas muito demoradas, no intuito de evitar a degradação térmica dos compostos presentes na amostra.

A mais alta atividade antioxidante obtida por ABTS foi encontrada em T7 ($1,61 \mu\text{g ET}\cdot\text{g}^{-1}$) utilizando 15 min. de extração e 90% de solvente a 70°C , correspondendo ao maior teor de compostos fenólicos extraídos nessa condição ($2985,20 \mu\text{g EAG}\cdot\text{g}^{-1}$). Já na análise de antioxidantes por FRAP, não foram encontradas diferenças estatísticas significativas entre as médias do controle e do fatorial. e essas médias também não diferiram estatisticamente dos tratamentos T3, T4 e T5.

Para ABTS e FRAP, a temperatura foi a variável mais influente ($p < 0,05$) correspondendo ao nível positivo (70°C). Um incremento de 30°C , quando a temperatura de extração subiu de 40°C para 70°C , foi capaz de aumentar, em aproximadamente 61 e 88%, a extração de compostos bioativos com atividade antioxidante determinados por ABTS e FRAP, respectivamente. O aumento da temperatura de extração pode favorecer a solubilidade dos analitos, a transferência de massa e reduzir a viscosidade e a tensão superficial dos solventes, permitindo desenvolver protocolos de extração mais rápidos (Ramos *et al.*, 2002). Um estudo realizado por Gullón *et al.* (2017) determinou, por meio da atividade antioxidante, como condição ótima de extração de compostos bioativos de amostras de *Eucalyptus globulus* a temperatura de 50°C e a concentração de etanol (56%). Esses autores também testaram a influência de temperaturas mais elevadas (60 e 70°C), porém,

obtiveram valores reduzidos de atividade antioxidante. Dessa forma, o aumento da temperatura pode ser positivo para um maior rendimento do analito, porém depende da característica da amostra que será extraída. Portanto, estudar variáveis de extração como temperatura e tempo é essencial, pois sua adequação pode interferir diretamente na economia e eficiência de um processo de extração em escala industrial.

A Tabela 4 apresenta-se o teste antimicrobiano dos extratos a base de sementes de limão selecionados (Tabelas 2 e 3).

Tabela 4 - Análise de variância e médias do halo de inibição (mm) de *Staphylococcus aureus* aos extratos T6 (1), T7 (2) e T9 (3) para avaliar o modelo fixo balanceado do delineamento inteiramente casualizado.

Extrato	Halo de inibição médio (mm)
1	0,25 ^{ns}
2	2,33 ^{ns}
3	1,42 ^{ns}
Coefficiente de Variação (CV, %)	78,56

^{ns}Não significativo pelo teste F da ANAVA ($p \leq 0,05$).

A atividade dos extratos T6 ($2901,46 \mu\text{g EAG}\cdot\text{g}^{-1}$), T8 ($2979,56 \mu\text{g EAG}\cdot\text{g}^{-1}$) e do controle ($1739,46 \mu\text{g EAG}\cdot\text{g}^{-1}$) foi determinada contra o microrganismo patogênico *S. aureus* e expressa em zona de inibição, em milímetros. Os extratos T6 e T8 apresentaram o maior teor de compostos fenólicos quando extraídos, por 60 min. com 60 e 90% de solvente, respectivamente. No entanto, a medida dos halos de inibição mostrou que não

houve diferença estatística ($p < 0,05$) entre os tratamentos testados, porém, a maior inibição de *S. aureus* foi obtida na aplicação do T8, que apresentou halo de 2,33 mm. Neste estudo, o crescimento de *S. aureus*, que já é conhecido por ser multirresistente a diferentes antibióticos, foi inibido pelos extratos.

Neste estudo, ainda que a comparação estatística entre os três extratos selecionados a priori frente a *S. aureus* tenha resultado em diferença não significativa (ns), foram observados halos discretos de inibição. Considerando que não foram incluídos controles positivo (antibiótico de referência) e negativo (solvente/veículo), bem como que a seleção se restringiu aos três melhores extratos de uma etapa preliminar, a evidência disponível deve ser interpretada como indício de potencial inibitório, e não como demonstração conclusiva de eficácia.

Na literatura não foram encontrados trabalhos que aplicaram extratos hidroalcoólicos da semente de limão-cravo contra *S. aureus*, sendo mais estudada a ação do óleo essencial, ou até mesmo o suco concentrado dos frutos do gênero *Citrus*. De acordo com o trabalho de Pires & Piccoli (2012), o óleo essencial da folha e da casca do limão-cravo apresentaram atividade antibacteriana frente a *S. aureus*, sendo o efeito do óleo essencial da folha superior ao da casca, formando halos de inibição de até 9,0 mm.

Silva *et al.* (2019) compararam o extrato etanólico e o óleo essencial das folhas de *C. limonia* contra *S. aureus*, e encontraram valores de 6,94 mm e 8,42 mm de halo de inibição para o extrato e óleo essencial, respectivamente. Os autores ressaltam maior potencial dos óleos essenciais contra diferentes bactérias devido à hidrofobicidade de sua composição química. Compostos como terpenóides citral, linalila e linalol são altamente hidrofóbicos e competem com os lipídios presentes na membrana celular, causando assim alteração da permeabilidade e extravasamento de moléculas essenciais à sobrevivência levando-as à morte.

Em outro trabalho, Oikeh *et al.* (2016) avaliaram a ação antimicrobiana de diferentes concentrados de sucos cítricos e encontraram que o suco de Lemon na concentração de $200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ apresentou halos de inibição de 20 mm para *S. aureus*. Em testes de atividade antimicrobiana, óleos essenciais ou até mesmo o suco concentrado, geralmente apresentam halos de inibição maiores do que extratos, devido à sua composição química e volatilidade. Além disso, o método de extração influencia o produto final e, por consequência, a ação antimicrobiana, podendo ou não inibir. Por outro lado, a prevalência de resistência a antibióticos é um problema constante devido à evolução de um potente mecanismo de defesa contra antibióticos. Portanto, é necessário explorar e desenvolver

novos agentes inibidores contra patógenos microbianos resistentes.

CONCLUSÃO

A economia circular é chave para o tratamento de resíduos, permitindo transformar resíduos da indústria de citrus em produtos de valor agregado. Além disso, o estudo da atividade antibacteriana do limão-cravo (*C. limonia*) inclui na literatura uma espécie ainda pouco explorada pela comunidade científica.

O maior teor de compostos fenólicos foi obtido ao aplicar a temperatura de 70 °C, na concentração 90:10 (solvente:semente) durante 15 minutos de extração, sendo que estes fatores também permitiram o maior teor de compostos antioxidantes pelo método de ABTS•+. A semente de limão-cravo, analisada a partir de extrato hidroalcoólico, demonstrou fraca ação antibacteriana frente a *S. aureus*. Este estudo, no entanto, fornece dados *in vitro* que podem não ser exatamente replicados *in vivo*. Recomendam-se estudos adicionais direcionados ao isolamento de novos compostos antimicrobianos e estudos *in vivo* que possam validar os resultados *in vitro*.

A semente de limão-cravo tem potencial para uso em formulação de rações para animais, dada a sua composição química rica em fibras, assim como pode ser usada para a extração de fibras e outros compostos de interesse.

Agradecimentos

O presente estudo foi desenvolvido com apoio financeiro da Fundação Araucária Paraná/Brasil, da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). Os autores também gostariam de agradecer ao Laboratório de Biotecnologia Ambiental e Alimentos (LABIA) da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), Campus Dois Vizinhos, pelo apoio.

REFERÊNCIAS

- ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. Resolução de Diretoria Colegiada - RDC nº 161, de 01 de julho de 2022.
- BARBOSA NA, PAES MCD, PEREIRA J. Influência da temperatura e do solvente na obtenção de extrato de milho de grãos pretos. XXXI Congresso Nacional de milho e sorgo, Bento Gonçalves, 2016.
- BARTLETT MS. 1937. Properties of Sufficiency and Statistical Tests. P R Soc London 160: 268–282.

- BASTIANEL M. 2022. Limão: curiosidades, variedades e usos. Revista Técnica do Limão Tahiti: Limão em Foco, n. 2.
- BERNAUD FSR, RODRIGUES TC. 2013. Dietary fiber – Adequate intake and effects on metabolism health. Arq Bras Endocrinol Metab. 57: 6.
- BRAND-WILLIAMS W, CUVELIER ME, BERSET CLWT. 1995. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. LWT - Food Science and Technology 28: 25–30.
- CASAGRANDE M. *et al.* 2018. Influence of time, temperature and solvent on the extraction of bioactive compounds of *Baccharis dracunculifolia*: In vitro antioxidant activity, antimicrobial potential, and phenolic compound quantification. Industrial Crops and Products 125: 207-219.
- CLSI. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically. Clinical and Laboratory Standards Intitute. Documento M07-A10, 1987-1988, 2015.
- DIMITRIOS B. 2006. Sources of natural phenolics antioxidants. Trends Food Sci Technol 17: 505-512.
- ECONOMOS C, CLAY WD. 1999. Nutritional and health benefits of citrus fruits. Food Nutrit and Agricult 24: 8-11.
- FERRARI CKB, TORRES EAFS. 2002. Novos compostos dietéticos com propriedades anticarcinogênicas. Revista Brasileira de Cancerologia 48: 375-382.
- FERREIRA EB, CAVALCANTI PP, NOGUEIRA DA. Pacote Experimental Designs (Portuguese). R package version 1.2.0. 2018.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATIONS OF THE UNITED NATIONS – FAO DATABASE. Disponível em:< <https://www.fao.org/faostat/en/#data>>. Accessed 14 June 2024
- GULLÓN B, GULLÓN P, LÚ-CHAU TA, MOREIRA MT, LEMA JM, EIBES G. 2017. Optimization of solvent extraction of antioxidants from *Eucalyptus globulus* leaves by response surface methodology: characterization and assessment of their bioactive properties. Ind. Crops Prod. 108: 649-659.
- INSTITUTO ADOLFO LUTZ. 1a Edição Digital. Métodos físicos-químicos para análise de Alimentos, 2008.

- KANG HJ, CHAWLA SP, JO C, KWON JH, BYUN MW. 2006. Studies on the development of functional powder from citrus peel. *Bioresource Tech.* doi: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2005.03.037>
- LUZIA DMM, JORGE N. 2010. Potencial antioxidante de extratos de sementes de limão (*Citrus limon*). *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 30: 489–493.
- LUZIA, D. M. M. Estabilidade oxidativa do óleo de soja adicionado de extrato de sementes de limão (*Citrus limon*). 2008. 121 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciências de Alimentos) - Universidade Estadual Paulista, 2008.
- MARKON M, HASAN M, DAUD WR, SING H, JAHIM JM. 2007. Extraction of hydrolysable tannins from *Phyllanthus niruri* Linn.: Effects of solvents and extraction methods. *Separation and Purification Technology*, 52: 487-496.
- MENG JF, FANG YL, QUIN MY, ZHUANG XF, ZHANG ZW. 2012. Varietal differences among the phenolic profiles and antioxidant properties of four cultivars of spine grape (*Vitis davidii* Foex) in Chongyi County (China), *Food Chem.*, 134: 2049-2056.
- NCCLS. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard. 6. ed. NCCLS document, 23, 2003.
- OIKEH EI, OMOREGIE ES, OVIASOGIE FE, ORIAKHI K. 2016. Phytochemical, antimicrobial, and antioxidant activities of different citrus juice concentrates. *Food science & nutrition*, 4: 103-9.
- OKWU D, EMENIKE I. 2006. Evaluation of the phytonutrients and vitamin contents of citrus fruits. *Int. J. Mol. Med. Adv. Sci* 2: 1–6.
- OKWU D, EMENIKE I. 2007. Nutritive value and mineral content of different varieties of citrus fruits. *J. Food Technol.* 5: 105–108.
- OZTURK B, WINTERBURN J, GONZALEZ-MIQUEL M. 2019. Orange peel waste valorisation through limonene extraction using bio-based solvents. *Biochemical Engineering Journal* 151: 107298.
- PEREIRA RB. Avaliação da atividade antioxidante de sementes de frutas cítricas. 1996. 90 f. Dissertação (Mestrado em Ciências

Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1996.

PIRES TC, PICCOLI RH. 2012. Efeito inibitório de óleos essenciais do gênero *Citrus* 52 sobre o crescimento de micro-organismos. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, 71: 378-385.

R CORE TEAM. A language and Environment for Statistical Computing. Foundation for Statistical Computing. Viena, 2020.

RAMOS L, KRISTENSON EM, BRINKMAN UAT. 2002. Current use of pressurised liquid extraction and subcritical water extraction in environmental analysis. *J. Chromatogr.*, 975: 3-29

RE R, PELLEGRINI N, PROTEGGENTE A, PANNALA A, YANG M, RICE-EVANS C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical & Medicine*, 26: 1231–1237.

REBEQUI AM, CAVALCANTE LF, NUNES JC, DINIZ AA, BREHM MAS, BECKMANN CAVALCANTE MZ. 2009. Produção de mudas de limão-cravo em substrato com biofertilizante

bovino irrigado com águas salinas. *Revista de Ciências Agrárias* 32: 219-228.

REDA SY, LEAL ES, BATISTA EAC, BARANA AC, SCHNITZEL E, CARNEIRO PIB. 2005. Characterization of rangpur lime (*Citrus limonia* Osbeck) and "sicilian" lemon (*Citrus limon*) seed oils, an agroindustrial waste. *Food Sci Technol*. doi: <https://doi.org/10.1590/S0101-20612005000400008>

RIZI FR. Otimização do processo de extração de compostos bioativos a partir de folhas de *Moringa oleífera*. 2016. 80 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Química) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, 2016.

ROBARDS K, ANTOLOVICH M. 1997. Analytical chemistry of fruit bioflavonoids. A review. *Analyst*, 122: 11–34.

RUFINO MSM, ALVES RE, BRITO ES, MORAIS SM, SAMPAIO CG, PÉREZ-JIMÉNEZ J, SAURA-CALIXTO FD. 2006. Metodologia Científica: Determinação de atividade antioxidante total em frutas pelo

método de redução do ferro (FRAP). Embrapa, Fortaleza, p. 1–4.

SHAPIRO SS, WILK MB. 1965. An analysis of variance test for normality (complete samples). *Biometrika*, 52: 591-611.

SIGNORELL, A. DescTools: Tools for Descriptive Statistics. R package version 0.99.28. 2019.

SILVA GA, LANDAU EC. 2020. Evolução da Produção de Limão (*Citrus* spp., Rutaceae). In book: Dinâmica da produção agropecuária e da paisagem natural no Brasil nas últimas décadas: produtos de origem vegetal, p.897-921.

SILVA MG, NUNAN EA, ROCHA, MP. 2019. Estudo químico e de atividade antibacteriana de extratos e óleo essencial de *Citrus x limonia*. *Brazilian Journal of Health and Pharmacy*, 1: 11–18.

SINGLETON VL, ORTHOFER R, LAMUELA-RAVENTÓS RM. 1999. Analysis of total

phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Method Enzymology*, 299: 152–178.

SOARES FILHO WS, VILARINHOS AD, ALVES AAC, CUNHA SOBRINHO AP, OLIVEIRA AAR, SOUZA AS, LEDO CAS, CRUZ JL, SOUZA LD, CASTRO NETO MT, GUERRA FILHO MS, MEISSNER FILHO PE. Citrus breeding program at Embrapa Cassava & 15 Fruits: development of hybrids. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2003. 39 p.

TEIGISEROVA DA, TIRUTA-BARNA L, AHMADI A, HAMELIN L, THOMSEN M. 2021. A step closer to circular bioeconomy for citrus peel waste: A review of yields and technologies for sustainable management of essential oils. *Journal of Environmental Management* 280:111832.

