

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ  
CURSO DE ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS E BIOTECNOLOGIA

JOÃO PAULO MARTINS MIRANDA

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE E ANTIMICROBIANO  
DA SEMENTE DE LIMÃO-CRAVO (*Citrus limonia* Osbeck)**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

DOIS VIZINHOS  
2020

JOÃO PAULO MARTINS MIRANDA

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE E ANTIMICROBIANO  
DA SEMENTE DE LIMÃO-CRAVO (*Citrus limonia* Osbeck)**

Trabalho de Conclusão de Curso, apresentado ao curso de bacharelado em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Dois Vizinhos – UTFPR, como requisito parcial para obtenção do título de engenheiro de bioprocessos e biotecnologia.

Orientadora: Dr.<sup>a</sup> Milene Oliveira Pereira.  
Coorientadora: Dr.<sup>a</sup> Paula Fernandes Montanher.

Dois Vizinhos

2020

**JOÃO PAULO MARTINS MIRANDA**

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE E ANTIMICROBIANO DA  
SEMENTE DE LIMÃO-CRAVO (Citrus limonia Osbeck)**

Trabalho de Conclusão de Curso, apresentado ao curso de bacharelado em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Dois Vizinhos – UTFPR, como requisito parcial para obtenção do título de engenheiro de bioprocessos e biotecnologia.

Orientadora: Dr.a Milene Oliveira Pereira.  
Coorientadora: Dr.a Paula Fernandes Montanher.

20 de outubro de 2020

---

Milene Oliveira Pereira  
Doutorado  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

---

Gilmar Antônio Nava  
Doutorado  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

---

Lilian De Souza Vismara  
Doutorado  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

**DOIS VIZINHOS**

**2020**

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus, que me abençoou e me auxiliou em todos os momentos durante essa jornada, me preenchendo de força e coragem para enfrentar todos os desafios que surgiram, cumprindo fielmente a sua Palavra em minha vida e me proporcionando a realização desse sonho.

À minha família, especialmente aos meus amados pais Eliane M. Martins e Décio D. de Miranda e meu irmão Luis Henrique M. Miranda, que me apoiaram e me incentivaram nas minhas conquistas. Sou grato pelo amor que sempre me deram e pela base sólida em que me educaram.

À minha querida tia Teresinha de J. Martins que esteve comigo em vários momentos dessa graduação sempre me aconselhando e me incentivando a lutar pelos meus sonhos.

Agradeço à minha orientadora, Professora Dr.<sup>a</sup> Milene Oliveira Pereira, pela confiança, por todo apoio e incentivo ao meu crescimento pessoal e profissional. Obrigado pela sua dedicação, amizade e pelo convívio nestes anos de graduação.

À Professora Dr.<sup>a</sup> Paula Fernandes Montanher pela coorientação, apoio e ajuda na execução deste trabalho.

À Professora Dr.<sup>a</sup> Lilian de Souza Vismara pela ajuda com as análises estatísticas.

Aos meus amigos. Àqueles que estiveram comigo durante a execução desta pesquisa, e também àqueles que sempre estiveram ao meu lado com palavras confortantes quando precisei.

A Universidade Tecnológica Federal do Paraná por toda a aprendizagem.

Enfim, sou grato a todos que de alguma maneira contribuíram para a realização deste trabalho e para a minha formação.

## RESUMO

MIRANDA, João Paulo Martins. **Avaliação do potencial antioxidante e antimicrobiano da semente de limão-cravo (*Citrus limonia* Osbeck)**. 2020. 54 f. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, 2020.

Na indústria de alimentos faz-se necessário a utilização de antioxidantes sintéticos para a manutenção da qualidade dos produtos comercializados, todavia, as pesquisas relacionadas à inocuidade destes compostos vem demonstrando uma possível ação toxicológica destes sobre a saúde humana, impulsionando a pesquisa por fontes naturais de compostos com ação antioxidante que possibilitem a aplicação industrial para o controle da deterioração dos alimentos, de onde se destacam os extratos obtidos de diferentes partes de frutas, como por exemplo, as sementes. O objetivo deste trabalho foi avaliar a semente de limão-cravo (*Citrus limonia* Osbeck) como agente antioxidante e antimicrobiano. O processo de extração hidroalcoólica dos compostos bioativos foi estudado aplicando um fatorial triplo com um tratamento controle em um delineamento inteiramente casualizado (DIC) balanceado, onde foram avaliados 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), e sendo os extratos quantificados quanto ao teor de compostos fenólicos pelo método de Folin-Ciocalteu e atividade antioxidante pelos métodos de DPPH•, ABTS•<sup>+</sup> e FRAP. A análise do potencial antimicrobiano foi realizada frente ao microrganismo *Staphylococcus aureus* utilizando o método de difusão em ágar e o método para determinar a concentração inibitória mínima (CIM) dos extratos analisados. O maior teor de compostos fenólicos (2.985,20 ± 29,76 µg.EAG.g<sup>-1</sup>) foi obtido aplicando o solvente a 90% a 70°C durante 15 minutos, permitindo estes parâmetros também a melhor extração de compostos antioxidantes detectados pelo método de ABTS•<sup>+</sup> (1,61 ± 0,03 µg.ET.g<sup>-1</sup>), ao passo que no método de FRAP o maior teor (7,58 ± 0,12 µg.EFe<sup>+2</sup>.g<sup>-1</sup>) foi obtido ao aplicar o tempo de 60 minutos com o solvente a 90% e temperatura de 70°C, e na metodologia de DPPH• o melhor resultado (22,42 ± 0,99 µg.ET.g<sup>-1</sup>) foi obtido com o uso do solvente a 90% a 40°C por 15 minutos. Na análise antimicrobiana foram testados os extratos 6, 7 e 9, não apresentando diferença estatística entre os dados referentes à metodologia de difusão em ágar (halos formados), porém pela metodologia de CIM pode-se observar a inibição de *S. aureus* na diluição do extrato 7 em 10<sup>-4</sup>. A semente de limão-cravo demonstrou um pequeno potencial como agente antioxidante, mas demonstrou ação antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus*.

**Palavras-chave:** Antioxidantes naturais; antimicrobianos; semente de limão; compostos bioativos.

## ABSTRACT

MIRANDA, João Paulo Martins. **Evaluation of the antioxidant and antimicrobial potential of rangpur lime seed (*Citrus limonia* Osbeck)**. 2020. 54 f. Final Term Paper (Bachelor of Bioprocess Engineering and Biotechnology) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, 2020.

In the food industry, it is necessary to use synthetic antioxidants to maintain the quality of marketed products, however, research related to the safety of these compounds has demonstrated a possible toxicological action of these on human health, boosting the search for natural sources of compounds with antioxidant action that enable industrial application for the control of food spoilage, from which extracts obtained from different parts of fruits, such as seeds, stand out. The objective of this work was to evaluate the rangpur lime seed (*Citrus limonia* Osbeck) as an antioxidant and antimicrobial agent. The process of hydroalcoholic extraction of bioactive compounds will be studied by applying a triple factorial with a control treatment in a completely randomized design (DIC) balanced, where the effect of temperature (40; 55; 70 °C), time (15; 37.5; 60 minutes) and concentration of ethyl alcohol as solvent (60; 75; 90%) will be evaluated, keeping the seed:solvent proportion constant in 1:25 (m:v), and the extracts being quantified for the content of phenolic compounds by the Folin-Ciocalteu method and antioxidant activity by the methods of DPPH•, ABTS•<sup>+</sup> and FRAP. The analysis of the antimicrobial potential was performed against the microorganism *Staphylococcus aureus* using the qualitative method of agar diffusion and the quantitative method to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) of the analyzed extracts. The highest content of phenolic compounds ( $2985.20 \pm 29.76 \mu\text{g.EAG.g}^{-1}$ ) was obtained by applying the solvent 90% at 70°C for 15 minutes, allowing these parameters also the best extraction of antioxidant compounds detected by the method ABTS•<sup>+</sup> ( $1.61 \pm 0.03 \mu\text{g.ET.g}^{-1}$ ), whereas in the FRAP method the highest content ( $7.58 \pm 0.12 \mu\text{g.EFe}^{+2}.\text{g}^{-1}$ ) was obtained when applying the time of 60 minutes with the solvent 90% and temperature of 70°C, and in the DPPH• methodology the best result ( $22.42 \pm 0.99 \mu\text{g.ET.g}^{-1}$ ) was obtained with the use of solvent 90% at 40°C for 15 minutes. In the antimicrobial analysis, extracts 6, 7 and 9 were tested, with no statistical difference between the data referring to the agar diffusion methodology (halos formed), however, through the MIC methodology, the inhibition of *S. aureus* in the dilution of the extract 7 in  $10^{-4}$ . The rangpur lime seed showed a small potential as an antioxidant agent, but showed antibacterial action against *Staphylococcus aureus*.

**Keywords:** Natural antioxidants; antimicrobials; lemon seed; bioactive compounds.

## SUMÁRIO

1	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	7
2	<b>OBJETIVOS</b> .....	9
2.1	OBJETIVO GERAL.....	9
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	9
3	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	10
3.1	FRUTAS CÍTRICAS.....	10
3.2	COMPOSTOS BIOATIVOS VEGETAIS .....	11
3.3	ANTIOXIDANTES .....	13
3.4	COMPOSTOS FENÓLICOS.....	17
4	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	20
4.1	MATERIAL VEGETAL .....	20
4.2	ANÁLISE CENTESIMAL DA SEMENTE DE LIMÃO.....	20
4.3	EXTRAÇÃO DOS COMPOSTOS BIOATIVOS .....	20
4.4	DETERMINAÇÃO ANALÍTICA DOS COMPOSTOS BIOATIVOS .....	22
4.4.1	Compostos fenólicos totais.....	22
4.4.2	Atividade antioxidante pelo método DPPH•.....	23
4.4.3	Atividade antioxidante pelo método ABTS• <sup>+</sup> .....	23
4.4.4	Atividade antioxidante pelo método redutor de ferro – FRAP.....	24
4.5	DETERMINAÇÃO DA AÇÃO ANTIMICROBIANA DO EXTRATO .....	24
4.5.1	Teste de difusão em ágar.....	25
4.5.2	Concentração inibitória mínima (CIM).....	25
4.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	26
5	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	28
5.1	ANÁLISE CENTESIMAL.....	28
5.2	DETERMINAÇÃO ANALÍTICA DOS COMPOSTOS BIOATIVOS .....	28
5.3	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA .....	42
6	<b>CONCLUSÃO</b> .....	45
7	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	46
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	47

## 1 INTRODUÇÃO

Antioxidantes naturais vem sendo amplamente estudados em função dos possíveis malefícios à saúde humana que podem ser causados pelo uso de antioxidantes sintéticos aplicados industrialmente, em paralelo à demanda de consumidores por produtos com valor agregado e com benefícios à saúde (SELANI, 2010). Dentre as fontes para a obtenção de diversas substâncias bioativas com potencial para ação antioxidante estão as plantas, se enquadrando, os vegetais, frutos, ervas e especiarias, sendo a atividade antioxidante derivada, principalmente, da presença de compostos fenólicos, flavonoides e diterpenos fenólicos (ZHANG et al., 2010).

Em função da presença destas substâncias bioativas no óleo, na polpa, na semente e na casca, as frutas cítricas se apresentam como boas fontes para a obtenção de compostos naturais com ação antioxidante, dentre as quais, se destacam a laranja, a tangerina e o limão (LUZIA, 2008). Estas frutas são atualmente utilizadas na indústria de alimentos para a produção de sucos naturais e concentrado, apresentando como rejeito do processo de fabricação o bagaço, a casca e a semente, sendo inutilizado o potencial do extrato destes frutos como fontes de compostos que agem como redutores, interruptores de radicais livres e inativadores de metais pró-oxidantes (LUZIA; JORGE, 2010).

O potencial antioxidante de extrato de plantas despertou um relativo interesse na indústria de alimentos, sendo disponibilizados no mercado alguns extratos comerciais naturais derivados destas fontes para aplicação em alimentos (DEL RÉ; JORGE, 2012). Bem como a ação dos produtos sintéticos, esses extratos naturais apresentam potencial para a inibição da oxidação e deterioração dos produtos, permitindo também uma melhor qualidade sensorial e nutricional dos mesmos, além de um acréscimo na vida útil destes produtos (PAGLARINI, 2015).

Além da ação antioxidante, estes compostos bioativos vêm indicando uma relevante atividade antimicrobiana contra diversas bactérias, visto que muitas destas substâncias participam como metabólitos que auxiliam a planta a reagirem e se adaptarem às adversidades externas, bem como o ataque de patógenos, cujo controle pode se dar pela associação destes compostos com

outras proteínas da membrana e gerar uma deformação estrutural ou funcional no microrganismo, combatendo-o (BARBOSA, 2008; STANGARLIN et al., 2011).

Assim, no atual cenário industrial ainda se tem a necessidade de pesquisas que possibilitem a descoberta de novas fontes de substâncias bioativas com potencial em atividade antioxidante que atuem em substituição aos antioxidantes sintéticos ou permitam a prática de associações entre estes, visando a diminuição destes compostos de origem sintética e um menor risco à saúde do consumidor, ao passo que o potencial antimicrobiano, também desenvolvido por estes compostos bioativos, permitem uma maior vida útil e segurança microbiológica dos produtos alimentícios, auxiliando na comercialização dos mesmos.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a semente de limão-cravo (*Citrus limonia* Osbeck) como agente antioxidante e antimicrobiano.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito da temperatura, tempo e concentração de solvente para a extração dos compostos bioativos da semente de limão-cravo;
- Determinar o teor de compostos fenólicos totais dos extratos;
- Determinar a atividade antioxidante dos extratos pelos métodos de DPPH•, ABTS•<sup>+</sup> e FRAP;
- Analisar o potencial antibacteriano do extrato contra *Staphylococcus aureus*.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 FRUTAS CÍTRICAS

O contínuo aumento pelo consumo de produtos que utilizam como matéria-prima as frutas cítricas tem auxiliado para estimular o aumento da produção de citros no Brasil e impulsionar sua inserção no mercado externo, tendo no ano de 2016 a exportação de frutas cítricas brasileira atingido um patamar de 126,8 mil toneladas e a 16 milhões de toneladas na produção (FAO, 2017).

Dentre as variedades de citros produzidas em território nacional encontra-se o limão, o qual se caracteriza por conter altos teores de vitaminas, principalmente a vitamina C, fibras e potássio (FERRARIA; TORRES, 2002). A produção nacional de limão apresentou no ano de 2017 um total de 1 milhão de toneladas, sendo a região sudeste do país responsável por cerca de 80% desta produção, vindo do estado de São Paulo a maior contribuição para este mercado (EMBRAPA, 2017).

Na produção brasileira de citros grande parte é direcionada para a indústria de alimentos, onde os frutos são utilizados na fabricação de sucos naturais e concentrado, além de serem tecnologicamente aplicados como flavorizantes em alimentos, em consequência da boa quantidade de óleo essencial presente no mesmo (REDA et al., 2005).

Na etapa de industrialização, tem-se uma alta quantidade de resíduos gerados, tais como cascas e sementes, que em partes, são utilizadas em ração animal ou fertilizantes, porém sendo estas aplicações limitadas pelo custo de secagem e transporte, realiza-se então o descarte destes materiais (KOBORI; JORGE, 2005).

De acordo com Filho e Franco (2015), o processamento de frutas na produção de sucos e polpa no Brasil compreende cerca de 30 a 40% dos resíduos agroindustriais, caracterizando-se como fontes potenciais para a geração de subprodutos ainda com grandes quantidades de compostos bioativos. No caso das frutas cítricas, estas são conhecidas por apresentarem

elevados teores de antioxidantes naturais em diferentes partes de sua constituição, como por exemplo, na polpa, óleo, semente e casca (LUZIA, 2008).

Segundo Dimitrios (2006), os extratos obtidos de frutas cítricas, como o limão, apresentam significativas quantidades de carotenóides e compostos fenólicos, tais como, ácidos fenólicos (ácido hidroxicinâmico) e flavonoides (flavonas e flavonóis), demonstrando-se como boas fontes para obtenção de compostos antioxidantes. Segundo Luzia e Jorge (2010), estes compostos podem atuar como redutores, interruptores de radicais livres, e inativadores de metais pró-oxidantes, fato que possibilita a aplicação para retardar a oxidação simultaneamente à melhora da qualidade nutricional dos alimentos.

### 3.2 COMPOSTOS BIOATIVOS VEGETAIS

A produção de compostos orgânicos vegetais contempla substâncias envolvidas na função estrutural e de armazenamento de energia, visando assim, o crescimento e a reprodução vegetal, bem como, substâncias que apresentam como função a defesa dos vegetais contra o ataque de herbívoros e patógenos, e a atuação como atrativos para animais polinizadores e dispersores de sementes, sendo este segundo grupo de compostos denominados metabólitos secundários (PEIXOTO, 2017).

Estes metabólitos apresentam grande notoriedade devido a atuação em sistemas biológicos, contribuindo para suas atividades e também apresentando potencial terapêutico (SINGH et al., 2016). Desta maneira, pode-se classificar estas substâncias como compostos bioativos, os quais são caracterizados como substâncias extra nutricionais que, mesmo ocorrendo em pequenas quantidades, oferecem benefícios à saúde animal e apresentam um significativo valor nutricional (NIRMALA; BISHT; LAISHRAM, 2014).

Três grupos quimicamente distintos compõem os metabólitos secundários, sendo estes, os terpenos, compostos fenólicos e compostos nitrogenados (SOUSA; SOUSA, 2017). Todavia, os compostos bioativos mais comumente encontrados nestas fontes e, conseqüentemente, os mais estudados, compreendem os compostos fenólicos, os quais também apresentam vários benefícios ao organismo animal e muitas aplicações tanto na ciência

quanto na indústria, em particular a alimentícia (GUINÉ; BARROCA; LIMA, 2011).

Dentre os materiais vegetais que apresentam tais compostos bioativos estão as frutas, as quais passam a não fornecer somente alguns nutrientes essenciais para a dieta animal, mas também disponibilizam seus metabólitos secundários em condições viáveis para utilização pelo organismo animal consumidor (GONÇALVES, 2008), fazendo-se úteis estas fontes para a produção de alimentos à nível industrial ou a obtenção de coprodutos a partir dos resíduos gerados no processamento.

Segundo Retore (2009), o beneficiamento dos materiais vegetais como matéria-prima para a produção de um produto alimentício, geralmente, está condicionada a geração de materiais secundários do processo, também denominados resíduos, os quais mesmo que, muitas vezes, transmitam a ideia de inferioridade, apresentam grande potencial para serem utilizados como matéria-prima na extração e interconversão de produtos contendo um maior valor agregado, gerando assim um coproduto.

Indústrias alimentícias que processam frutas geram como resíduos um volume significativo de cascas e sementes, que se apresentam como estruturas vegetais com grande potencial de armazenamento de substâncias de interesse econômico devido à presença de compostos bioativos, sendo muitos destes caracterizados pela ação antioxidante (ZERAİK; YARIWAKI, 2008).

Com base na literatura, tem-se observado que estudos recentes com extratos de sementes relatam um potencial antioxidante que permite a comparação de ação com os antioxidantes sintéticos, podendo ser utilizadas como uma fonte alternativa de antioxidantes naturais, sendo exemplos destas fontes, os extratos das sementes de romã (JING et al., 2012), vinha de Sodoma (BENARIBA et al., 2013), cagaita (ROESLER et al., 2007) e maracujá (SANTOS et al., 2014).

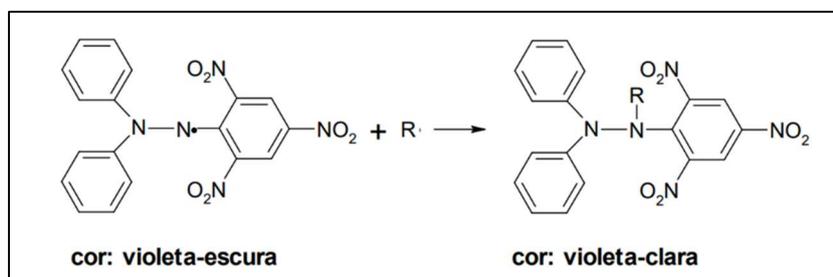
Desta maneira, as pesquisas realizadas vêm demonstrando resultados com grandes perspectivas relacionadas ao valor econômico das sementes quanto à presença de bioativos, em especial quanto ao potencial antioxidante e sua utilização à nível industrial (ALMEIDA, 2011; OLIVEIRA et al., 2012).

### 3.3 ANTIOXIDANTES

De acordo com Kaipers (2017), os antioxidantes são definidos como compostos que agem na proteção do sistema biológico contra os efeitos de reações que possam causar uma oxidação excessiva, apresentando como objetivo na indústria de alimentos, a inibição do desenvolvimento do ranço oxidativo para se ter um retardo no surgimento de alterações no alimento (KUNRATH; SAVOLDI, 2014).

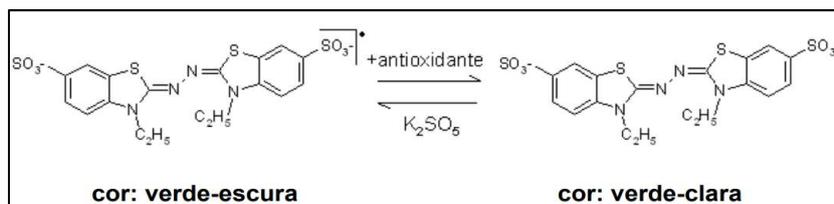
A atividade antioxidante dos compostos pode ser avaliada por diferentes métodos, a qual é baseada pela medição do consumo de oxigênio ou pela produção de produtos da degradação (BRAND-WILLIAMS; CUVÉLIER; BERSET, 1995). As determinações espectrofotométricas *in vitro* podem ser analisadas pela captura de radicais livres, sendo exemplos, as metodologias de DPPH• (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) e ABTS•<sup>+</sup> [2,2-azino-di-(3-etilbenzotiazolin)-6-sulfônico], Figura 1 e 2, respectivamente. A ação antioxidante também pode ser analisada pela transferência de elétrons, aplicando o método FRAP (*ferric reducing antioxidant power*), Figura 3; sendo que, por meio de mecanismos diferentes, tem-se uma alteração na estrutura das moléculas utilizadas e, conseqüentemente, uma diferença na coloração e absorbância, a qual apresenta uma relação proporcional com o potencial antioxidante do composto (PAIXÃO et al., 2007).

**Figura 1 – Reação do radical livre DPPH•**



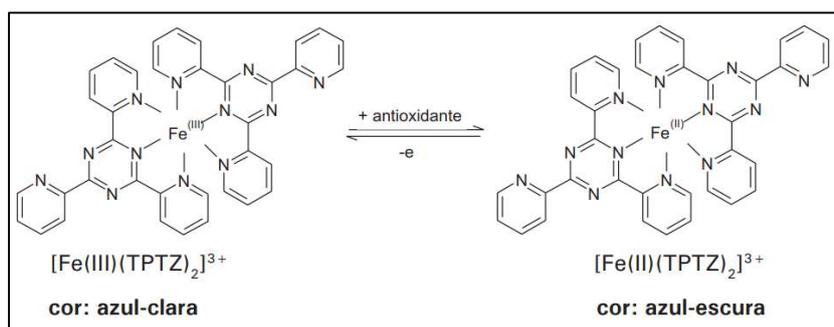
Fonte: Rufino et al., 2007a.

**Figura 2 – Reação do radical livre ABTS•+**



Fonte: Rufino et al., 2007b.

**Figura 3 – Redução do complexo TPTZ**



Fonte: Rufino et al., 2006.

Mediante o seu mecanismo de ação, os antioxidantes são classificados em primários ou secundários. Os compostos primários se caracterizam pela capacidade de doar elétrons ou hidrogênio aos radicais livres formados durante a oxidação e convertê-los em produtos termodinamicamente estáveis e/ou formando o complexo biomolécula-antioxidante, que por sua vez, reage com outro radical livre (ANGELO; JORGE, 2007). Os compostos secundários atuam no retardo da etapa de iniciação da auto-oxidação por diferentes mecanismos, como por exemplo, a complexação de metais, o sequestro de oxigênio e a absorção da radiação ultravioleta (TEIXEIRA, 2011).

Na indústria de alimentos estes compostos também são classificados em sintéticos ou naturais, cuja aplicação é uma das alternativas adotadas pelas indústrias para a manutenção da qualidade e tempo de prateleira dos seus produtos, isto porque a eficácia dos antioxidantes endógenos das matérias-primas utilizadas não apresentam a mesma eficiência que quando *in vivo*, sendo necessário o uso de aditivos para este fim (JAYASENA et al., 2015).

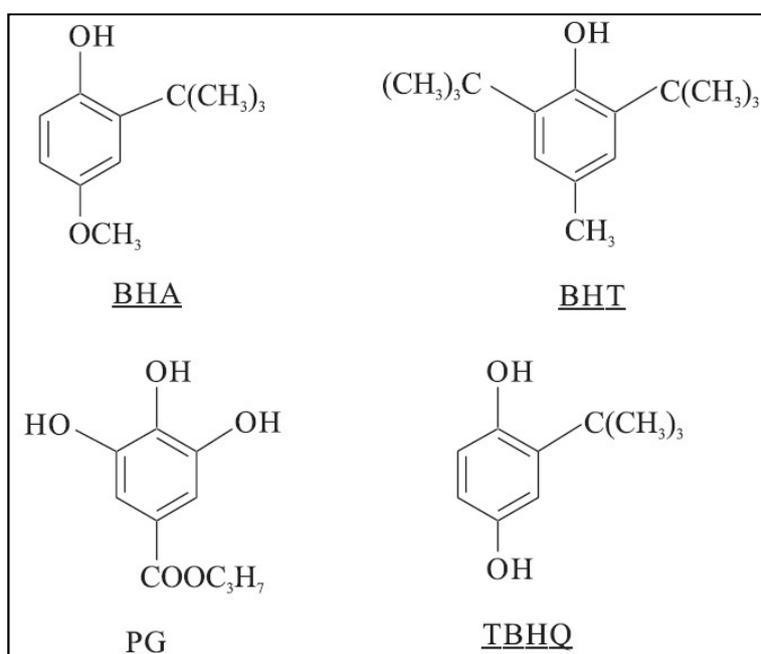
A utilização de compostos sintéticos, na indústria alimentícia, deve atender à algumas recomendações, tais como: não apresentar toxicidade, ser resistente às condições submetidas ao alimento durante o processamento e ter

um bom desempenho em baixas concentrações (OETTERER; D'ARCE; SPOTO, 2006).

A legislação vigente também deve ser considerada para a aplicação dos antioxidantes, tanto sintéticos quanto naturais, sendo esta utilização em alimentos controlada pela legislação do país. Em particular no Brasil, esta aplicação é regulamentada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA, ou por padrões internacionais, como por exemplo, a *Food and Agriculture Organization (FAO)*, *Joint Expert Committee on Food Additives (JECFA)* e a *World Health Organization (WHO)*, as quais reconhecem como seguros alguns compostos e permitem a sua utilização (SOARES, 2002).

O butil-hidroxi-anisol (BHA), butil-hidroxi-tolueno (BHT), butil-hidroxi-quinona (TBHQ) e propilgalato (PG) são, dentre os antioxidantes sintéticos, os mais utilizados industrialmente (TAHERI et al., 2014), os quais as moléculas são demonstradas na Figura 4.

**Figura 4 – Estrutura química dos antioxidantes sintéticos**



Fonte: Ramalho e Jorge (2006).

Embora sejam eficazes, estes compostos são questionados quanto à sua toxicidade e malefícios causados à saúde humana, visto que as pesquisas quanto ao seu uso têm demonstrado um provável potencial tóxico, em especial,

a relação como agentes carcinogênicos (OLSEN et al., 1986; HOCMAN, 1988; CRUZ, 2014), gerando restrições para sua utilização e crescente oposição dos consumidores quanto ao uso destas substâncias (SELANI, 2010).

Jeong et al. (2005) realizaram estudos para a análise do efeito da ingestão do BHA em funções no sistema reprodutivo de camundongos, sendo demonstrado que, em altas doses de BHA ( $500 \text{ mg.kg}^{-1}$ ), este composto provocou disfunções no sistema reprodutivo destes animais e alterações nos níveis de hormônios.

Desta maneira, a utilização destes antioxidantes em alimentos é regulamentada e limitada de acordo com as regulamentações seguidas por cada nação. No Brasil, o uso de TBHQ e BHA é permitido pela ANVISA, por exemplo, em produtos proteicos (ANVISA, 2005) e em molhos e condimentos (ANVISA, 2007). A concentração máxima permitida para estes aditivos é de  $200 \text{ mg.kg}^{-1}$ , tendo como base o teor lipídico do alimento sobre o qual vai ser aplicado. Porém, no caso do TBHQ, existem países que não permitem a sua utilização em alimentos, por exemplo, o Canadá, que já não cita este produto na lista de aditivos alimentares permitidos para atuação como agentes sequestrantes (REISCHE; LILLARD; EITENMILLER, 2008; GOVERNMENT OF CANADA, 2019).

Neste cenário, pesquisas vêm sendo realizadas com o intuito de encontrar produtos naturais com potencial antioxidante, que possam ser aplicados industrialmente, para prevenir a oxidação em alimentos e diminuir o uso dos antioxidantes sintéticos, com o intuito de minimizar a quantidade destes compostos nos alimentos e aumentar a segurança alimentar (DEGÁSPARI; WASZCZYNSKYJ, 2004). Estes produtos naturais podem ser obtidos de uma grande variedade de alimentos, como por exemplo, algas marinhas (RAYMUNDO; HORTA; FETT, 2004), cereais (PÉREZ-JIMÉNEZ; SAURACALIXTO, 2005), cogumelos (ELMASTAS et al., 2007), grãos e sementes de oleaginosas (TSUDA et al., 1993).

As principais vantagens relacionadas ao uso de antioxidantes naturais são a possibilidade de se obter um efeito equivalente ou superior na inibição da oxidação, sua potencialidade nutricional e a segurança alimentar (EMBUSCADO, 2015). Dentre as substâncias presentes nestas fontes naturais

e que apresentam capacidade de atuarem como agentes de combate à oxidação estão os compostos fenólicos e as vitaminas, sendo que do ponto de vista tecnológico, apresentam-se com grande importância os tocoferóis, os carotenóides, alguns ácidos orgânicos e os flavonoides (LUZIA, 2008).

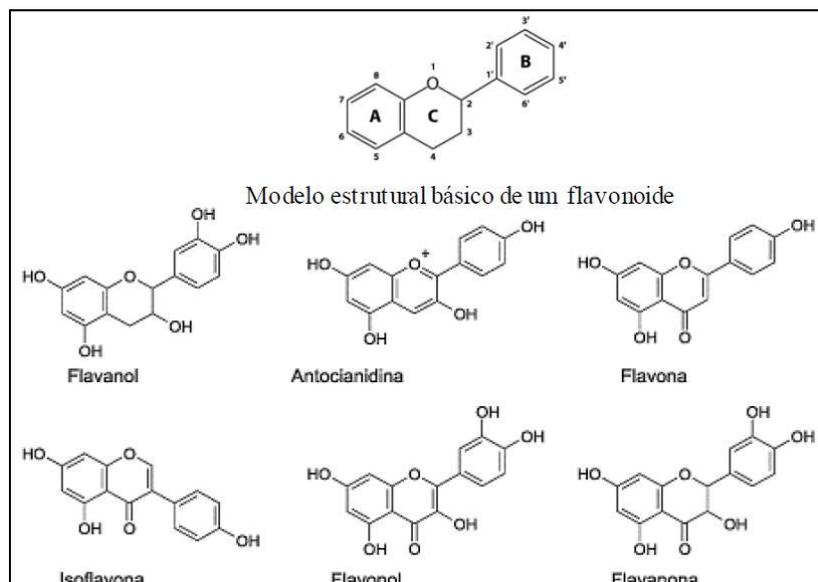
### 3.4 COMPOSTOS FENÓLICOS

De acordo com Degáspari e Waszczyński (2004), os compostos fenólicos compreendem a maioria das classes de metabólitos secundários de plantas (fitoquímicos), apresentando como caracterização química a presença de um ou mais anéis aromáticos associado a grupos hidroxila, e sendo geralmente demonstrado por esses compostos uma boa propriedade antioxidante.

Os polifenóis apresentam uma grande variedade estrutural, porém, podem ser destacados, baseado na ocorrência na natureza, os ácidos fenólicos, flavonoides e taninos (KING; YOUNG, 1999). Os ácidos fenólicos se apresentam nos vegetais como ésteres ou glicosídeos conjugados com outros compostos químicos (GUINÉ; BARROCA; LIMA, 2011), e são divididos em dois grupos: os ácidos hidroxibenzoicos, os quais apresentam a estrutura C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub>, e os ácidos hidroxicinâmicos, caracterizados por serem compostos aromáticos de cadeia lateral com três carbono na forma C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub> (BRAVO, 1998).

Os flavonoides contêm em sua estrutura três anéis aromáticos no esquema de C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, compreendendo uma diversidade de compostos, que se dividem em seis classes (Figura 5), sendo estas: antocianidina, flavona, isoflavona, flavonol, flavanona e flavanol (SILVA et al., 2015).

**Figura 5 – Estrutura química das classes de flavonoides**



Fonte: Nascimento (2016).

Os taninos são compostos fenólicos que apresentam solubilidade em água, mas que possuem algumas propriedades específicas, tal como, a capacidade de formar complexos insolúveis em água quando em conjunto com determinadas proteínas (SANTOS-BUELGA; SCALBERT, 2000). Com base em suas propriedades e estruturas, estes são classificados em: taninos hidrossolúveis, encontrados em menor concentração nos vegetais, e os taninos condensados, sendo estes oligômeros e polímeros (HASSANPOUR et al., 2011). Tem-se também, segundo Peixoto (2017), que os taninos apresentam a capacidade de decomposição em antocianidinas quando presentes em soluções etanólicas aquecidas.

Nos vegetais estes conjuntos de polifenóis atuam na defesa contra a radiação ultravioleta, microrganismos e insetos, além de estarem relacionados com a pigmentação e alguns aspectos organolépticos dos alimentos (NAKAJIMA; MACEDO; MACEDO, 2014). Segundo Havsteen (2002), é atribuída aos flavonoides a capacidade de inibição de algumas enzimas virais, como por exemplo, a transcriptase reversa e protease, bem como atuar na destruição de protozoários patogênicos, contendo tais funções baixa toxicidade para as células animais. Também na atuação antimicrobiana, destacam-se os taninos, principalmente os condensados, visto que apresentam maior toxicidade em relação aos microrganismos através dos mecanismos de inibição de enzimas

extracelulares e ação sobre a membrana celular, comprometendo o metabolismo (SCALBERT, 1991).

Os efeitos desempenhados por estes polifenóis apresentam benefícios que permitem sua aplicação a favor do homem, usufruindo, por exemplo, além da ação antimicrobiana, os efeitos anti-inflamatórios e antialérgicos (BALASUNDRAM; SUNDRAM; SAMMAN, 2006). Entretanto, dentre as propriedades já comprovadas dos compostos fenólicos, o poder antioxidante destaca-se, devido a propriedade redutora e a estrutura química destes compostos, as quais os permitem atuar no sequestro de radicais livres e na quelatação de metais de transição, interferindo nas etapas de iniciação e propagação da cadeia oxidativa, além de formar compostos intermediários estáveis devido a ressonância do anel aromático presentes nestas estruturas químicas (SOARES, 2002).

O teor e a composição dos compostos fenólicos totais presentes nas matrizes vegetais se relacionam diretamente com a capacidade antioxidante, sendo geralmente estes compostos quantificados pelo método Folin-Ciocalteu, que apresenta como mecanismo básico uma reação de oxirredução entre os compostos fenólicos e íons metálicos (SOUSA et al., 2007).

De acordo com Bocco et al. (1998), estes grupos químicos com bioatividade são encontrados amplamente em várias partes das plantas, bem como, em cascas e sementes, e se destacam como compostos antioxidantes fenólicos de fonte natural, sendo que dentre as matrizes que apresentam relevância em conteúdo de flavonoides e ácidos fenólicos estão os extratos de frutas cítricas, como o limão (LUZIA; JORGE, 2010).

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 MATERIAL VEGETAL

As sementes analisadas foram oriundas de limões da variedade cravo (*Citrus limonia* Osbeck), os quais foram doados no mês de junho de 2019 por agricultores do município de Dois Vizinhos – Paraná. Esta região do estado apresentou no ano de 2019 uma temperatura média do ar entre 19 e 21°C, precipitação em torno de 1800 a 2200 mm, umidade relativa do ar variando entre 70 e 80%, radiação solar entre 13 e 14 MJ.m<sup>-2</sup>.dia<sup>-1</sup> e insolação anual de 2300 a 2500 h (IAPAR, 2019).

Após a obtenção das sementes, estas foram lavadas com água destilada para a remoção de resíduos da polpa, e secas em estufa com circulação de ar a 45°C por 24 horas para a redução do teor de umidade, sendo posteriormente congeladas em recipientes plásticos e em ausência de luz até o momento das extrações, quando então foram trituradas em moinho analítico (A11, IKA).

### 4.2 ANÁLISE CENTESIMAL

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.

### 4.3 EXTRAÇÃO DOS COMPOSTOS BIOATIVOS

O experimento aplicado consistiu em um fatorial triplo com um tratamento adicional (controle) em um delineamento inteiramente casualizado (DIC) balanceado, sendo avaliado simultaneamente o efeito da temperatura, tempo e concentração de solvente (fatores independentes) sobre o teor de compostos bioativos presentes na semente de limão (fatores dependentes), como demonstrado na Tabela 1.

**Tabela 1 – Fatores e níveis para o planejamento fatorial**

Fator	Níveis codificado		
	Nível Inferior (-1)	Nível Intermediário (0)	Nível Superior (1)
Tempo (min)	15	37,5	60
Temperatura (°C)	40	55	70
Etanol:água (%)	60:40	75:25	90:10

Fonte: Autoria própria.

O experimento consistiu em oito ensaios nas condições superior e inferior e um tratamento adicional, tomado como controle, como demonstrado na matriz codificada na Tabela 2, sendo realizado em triplicata cada experimento e uma duplicata do experimento para quantificação analítica dos compostos.

**Tabela 2 – Matriz codificada do planejamento fatorial**

Experimento	Tempo	Solvente	Temperatura
1	-1	-1	-1
2	1	-1	-1
3	-1	1	-1
4	1	1	-1
5	-1	-1	1
6	1	-1	1
7	-1	1	1
8	1	1	1
9	0	0	0

Fonte: Autoria própria.

Os extratos hidroalcoólicos de semente de limão foram obtidos segundo a metodologia descrita por Luzia e Jorge (2010), com modificações. A extração foi realizada utilizando o aparato experimental demonstrado na Figura 6, o qual consta em um banho ultrassônico com recirculação forçada de água aquecida por um banho-maria. A temperatura do banho ultrassônico foi acompanhada por um termômetro imerso neste e a mesma controlada pelo sistema de aquecimento do banho-maria, e sendo o transporte da água realizado por bombas.

Figura 6 – Aparato experimental utilizado na extração.



Fonte: Autoria própria.

Em todas as extrações foi mantida constante a proporção de semente em relação ao volume de solvente em 1:12 (m:v), sendo que a temperatura, o tempo de extração e a concentração de solvente foram determinados de acordo com as proporções relativas a cada ensaio, e que cada ensaio foi submetido a uma etapa de reextração dentro do limite de tempo analisado. Em seguida, a mistura foi filtrada em filtro comum e o extrato final teve seu volume completado em 25 mL em um balão volumétrico. Sobre os extratos obtidos foram realizadas as quantificações analíticas, sendo que a melhor condição de extração foi determinada pela quantificação de compostos fenólicos.

#### 4.4 DETERMINAÇÃO ANALÍTICA DOS COMPOSTOS BIOATIVOS

##### 4.4.1 Compostos fenólicos totais

Os compostos fenólicos totais foram quantificados pelo método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu descrito por Singleton, Orthofer e Lamuela-Raventós (1999) utilizando o ácido gálico entre 0 e 200  $\mu\text{g.L}^{-1}$  como padrão.

Em tubo de ensaio um volume de 0,5 mL da solução de extrato foi misturado com 2,5 mL do reagente de Folin-Ciocalteu 100  $\text{g.L}^{-1}$  e 2 mL de solução de carbonato de sódio 40  $\text{g.L}^{-1}$ . Essa mistura permaneceu em repouso

por 90 minutos a temperatura ambiente no escuro e depois foi realizada a leitura de fenólicos totais por espectrofotometria com a absorvância em 740 nm. Os resultados foram expressos em teor de compostos fenólicos como  $\mu\text{g}$  de equivalentes de ácido gálico (EAG) por grama de amostra ( $\mu\text{g.EAG.g}^{-1}$ ).

#### 4.4.2 Atividade antioxidante pelo método 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, Cuvelier e Berset (1995), com modificações, sendo utilizado como padrão o Trolox com uma curva padrão variando entre 200 e 2000  $\mu\text{mol}$  de Trolox. $\text{L}^{-1}$ . 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 durante 30 minutos. Em seguida, os valores de absorvância foram medidos em espectrofotômetro a 517 nm, sendo os resultados expressos em micrograma de equivalentes de Trolox por grama de amostra ( $\mu\text{g.ET.g}^{-1}$ ), a partir da curva padrão.

#### 4.4.3 Atividade antioxidante pelo método ABTS•<sup>+</sup>

Para a determinação da atividade antioxidante pelo método do radical ABTS•<sup>+</sup> [2,2-azino-di-(3-etilbenzotiazolin)-6-sulfônico] foi aplicada a metodologia descrita por Re et al. (1999), sendo utilizado como padrão o Trolox com uma curva padrão variando entre 0 e 100  $\mu\text{mol}$  de Trolox. $\text{g}^{-1}$ . Primeiramente, o radical ABTS•<sup>+</sup> foi formado por meio da reação de 5 mL da solução de ABTS 7 mM com 88  $\mu\text{L}$  da solução de persulfato de potássio 140 mM, os quais foram incubados durante 16 h em temperatura ambiente e na ausência de luz. Em seguida, esta solução preparada foi diluída em etanol até se obter uma solução com absorvância de  $0,70 \text{ nm} \pm 0,05 \text{ nm}$  em um comprimento de onda de 734 nm. Para as análises, foram transferidos para um tubo de ensaio, em ambiente escuro, 30  $\mu\text{L}$  do extrato diluído e 3,0 mL da solução contendo o radical ABTS•<sup>+</sup>, sendo então determinada a absorvância a 734 nm após seis minutos de reação

e utilizando como branco o etanol. Os resultados da atividade antioxidante foram expressos em micrograma de equivalentes de Trolox por grama de amostra ( $\mu\text{g.ET.g}^{-1}$ ).

#### 4.4.4 Atividade antioxidante pelo método redutor de ferro – FRAP

O poder redutor das amostras foi determinado pelo método FRAP 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  $\mu\text{mol}$  de sulfato ferroso. Primeiramente, foi preparada a solução de reagente FRAP, no momento da análise, pela mistura de 25 mL de tampão acetato 300 mM (pH 3,6), 2,5 mL de solução de  $\text{FeCl}_3$  20 mM e 2,5 mL da solução de 2,4,6-tri(2-piridil)-s-triazina (TPTZ) em HCl 40 mM. A reação foi realizada com a mistura de 90  $\mu\text{L}$  do extrato em 3 mL da solução do reagente FRAP, sendo a mistura mantida em banho-maria a  $37^\circ\text{C}$  durante trinta minutos. Após dez minutos a absorbância foi medida em espectrofotômetro em um comprimento de onda de 595 nm e utilizando a solução de FRAP como branco na calibração do espectrofotômetro. O resultando do valor do poder redutor foi expresso em micrograma de equivalente de  $\text{Fe}^{+2}$  por grama de amostra ( $\mu\text{g.EFe}^{+2}.\text{g}^{-1}$ ).

#### 4.5 DETERMINAÇÃO DA AÇÃO ANTIMICROBIANA DO EXTRATO

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 n° 12/2001, estabelecida pela ANVISA, a qual estabelece os parâmetros microbiológicos para alimentos (ANVISA, 2001). Para os extratos que apresentaram o maior teor de compostos fenólicos para cada solvente utilizado foi aplicada a metodologia de difusão em ágar e a metodologia de Concentração Inibitória Mínima (CIM).

#### 4.5.1 Teste de difusão em ágar

A cepa de bactéria analisada foi semeada em ágar Mueller-Hinton e incubada a 37°C durante 24 h. Para o preparo do inóculo utilizado foi preparada uma suspensão de 1 mL em solução salina estéril 0,9%, pH 7,2, atingindo uma turbidez equivalente à solução padrão 0,5 da escala de MacFarland (CARVALHO et al., 2014).

Na determinação da atividade antimicrobiana foi aplicada a técnica de difusão em ágar descrita pela NCCLS (2003), com modificações, pela qual um volume de 50 µL da suspensão bacteriana foi semeado em placa de Petri contendo o meio ágar Mueller-Hilton, sendo o experimento realizado em triplicata. Em cada placa foram dispostos sobre a superfície do meio inoculado três quadrados de papel filtro estéreis, no qual, em papéis separados, foram embebidos os extratos obtidos com a utilização do solvente hidroalcoólico a 90, 75 e 60%, de acordo com as melhores concentrações de compostos fenólicos obtidos nas extrações.

Como controle positivo foi realizado o plaqueamento da cepa contendo o papel filtro embebido em álcool 90, 75 e 60%, ou seja, os solventes utilizados em cada extrato testado. A leitura dos resultados foi realizada pela medição dos halos formados ao redor de cada papel filtro contendo os extratos, após a incubação dos experimentos em estufa de aerobiose a 37°C por 24 horas.

O experimento foi delineado inteiramente casualizado (DIC) balanceado, considerando o modelo fixo, com três repetições (triplicata), sendo também calculado o desvio padrão para as medições de halos.

#### 4.5.2 Concentração inibitória mínima (CIM)

A concentração inibitória mínima foi realizada de acordo com a padronização estabelecida pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2015), com alterações. Inicialmente, as células viáveis de *S. aureus* foram semeadas em meio Ágar Mueller Hinton por um período de 24 horas, em seguida, foi preparado um novo inóculo em caldo Mueller Hinton e este incubado em estufa a 35°C durante 24 horas. Depois do preparo do inóculo as células

foram ajustadas seguindo a escala 0,5 Mc Farland, sendo a leitura realizada em espectrofotômetro a 625 nm.

Para o experimento, realizado em duplicata, foi utilizada a microplaca de 96 micropoços, onde todos estes receberam 100  $\mu$ L do caldo Mueller Hinton. No primeiro poço de cada linha onde foi testado o extrato, foram adicionados 100  $\mu$ L de extrato, sendo que, a partir do segundo poço foi realizada uma diluição seriada de 1:1 dos extratos. Com o mesmo procedimento experimental foi analisada a ação do álcool etílico 60, 75 e 90%, visto que estes foram os solventes presentes nos extratos aplicados, devendo ser avaliada a não interferência deste na ação antibacteriana. E por último, 5  $\mu$ L de suspensão bacteriana foram adicionadas nos poços com os extratos e solventes diluídos, e também em poços contendo somente o caldo Mueller Hinton (controle negativo).

As microplacas foram incubadas a 35°C durante 24 horas, sendo posteriormente adicionados 20  $\mu$ L do reagente 0,5% de cloreto de trifeniltetrazolio em cada poço e as microplacas incubadas novamente a 35°C por 3 horas.

A leitura para a determinação da CIM dos extratos testados foi determinada pela leitura visual da menor concentração testada, pelo não surgimento de uma coloração vermelha no fundo da placa, um indicativo de células viáveis não inibidas.

#### 4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todas as análises referidas foram realizadas em triplicata, e estes dados foram avaliados utilizando a ferramenta computacional R (R CORE TEAM, 2020) e os pacotes ExpDes.pt versão 1.2.0. (FERREIRA; CAVALCANTI; NOGUEIRA, 2018) e DescTools (SIGNORELL, 2019).

Para verificar o pressuposto de normalidade dos resíduos, utilizou-se ao nível 5% de significância o teste de Shapiro-Wilk (1965), e sendo atendido o pressuposto de normalidade não foi necessário implementar uma transformação nos dados experimentais obtidos.

Em seguida, foi realizada a análise de variância (ANAVA) e o teste de comparação de médias de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade de erro e o

teste de Dunnett, sendo a estatística para tomada de decisão foi o valor-p, sendo,  $p \leq 5\%$ . O teste de Dunnett foi aplicado para comparar o tratamento adicional a cada tratamento fatorial, sendo o tratamento adicional o experimento 9 (37,5 minutos, solvente 75% e 55°C).

Em específico para a análise antimicrobiana foi aplicado o teste de Bartlett (1937) para verificar a homogeneidade de variâncias.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 ANÁLISE CENTESIMAL

A composição centesimal obtida para as sementes de limão-cravo é descrita na Tabela 3, na qual é observada um valor de 23,99% de umidade, uma vez que as sementes não foram previamente secas para esta análise.

**Tabela 3: Composição centesimal da semente de limão-cravo.**

<b>Componente</b>	<b>Base úmida (%)</b>	<b>Base seca (g.g<sup>-1</sup>)</b>
Fibra Bruta	30,04 ± 4,90	0,40 ± 0,03
Umidade	23,99 ± 0,11	-
Lipídio	18,67 ± 0,37	0,25 ± 0,01
Proteína	15,21 ± 1,73	0,20 ± 0,00
Cinzas	7,24 ± 0,39	0,10 ± 0,00
Carboidratos	4,85	0,05

Fonte: Autoria própria.

De acordo com os dados, as sementes apresentaram um elevado teor de fibra bruta (30,04%), estando superior ao valor obtido por Luzia (2008), que em seu trabalho com a mesma matriz relatou quantidades de 25,72% e 19,80% de fibra bruta para sementes de limão cravo e galego, respectivamente.

Quanto aos dados de lipídios e proteínas estes se mostraram superiores aos valores demonstrados por Pereira (1996) em estudos utilizando semente de limão-cravo, no qual foram observados uma composição de lipídios igual a 13,0% e 10,4% para proteína. Em paralelo, os valores obtidos no presente trabalho se apresentaram inferiores aos dados obtidos por Luzia (2008), que obteve para lipídios uma composição igual 34,61% e para proteína 17,83%.

Estas diferenças na composição centesimal podem ser explicadas por fatores geográficos e ambientais de onde se obtiveram as sementes analisadas, visto que, de acordo com Palioto et al. (2015), estes são fatores de interferência direta.

### 5.2 DETERMINAÇÃO ANALÍTICA DOS COMPOSTOS BIOATIVOS

As variáveis respostas, concentração de compostos fenólicos ( $\mu\text{g.EAG.g}^{-1}$ ) e antioxidantes utilizando as metodologias de DPPH• ( $\mu\text{g.ET.g}^{-1}$ ), ABTS•+ ( $\mu\text{g.ET.g}^{-1}$ ) e FRAP ( $\mu\text{g.EFe}^{+2}.\text{g}^{-1}$ ), bem como, os halos médios de inibição (mm), atenderam o pressuposto de normalidade dos resíduos. Desta maneira, para compostos fenólicos e antioxidantes, o resultado da ANAVA é apresentado na Tabela 5 e a comparação das médias, via teste de Tukey, nas Tabelas 6 e 7; de onde, os contrastes entre o tratamento adicional (controle) e cada um dos tratamentos do fatorial (tempo x temperatura x solvente) via teste de Dunnett é apresentado na Tabela 4.

A aplicação dos fatores tempo, concentração de solvente e temperatura permitiram extrair diferentes concentrações de compostos bioativos, como demonstrado na Tabela 4. A interferência de cada fator, tanto individual quanto simultânea da interação entre os fatores, foi comprovada pela análise de variância dos dados (ANAVA), como demonstrada na Tabela 5. Desta maneira, confirmou-se que para as análises de compostos fenólicos, ABTS•+ e FRAP os fatores apresentaram uma interferência tripla e dupla entre si sobre a extração, com exceção da interferência simultânea dos fatores temperatura x tempo para a análise de ABTS•+, na qual não houve diferença significativa a 5% de significância.

Para a análise de DPPH• não foi identificada uma interferência tripla entre os fatores e nem a interferência dupla dos fatores temperatura x solvente sobre a extração a 5% de significância, como descrita na Tabela 5. Pelo teste de Dunnett, pode-se observar que todos os experimentos das análises de DPPH• apresentaram diferença estatística com o experimento 9, o tratamento adicional. E havendo a interferência isolada do tempo, temperatura e solvente, bem com a interferência da interação temperatura x tempo e solvente x tempo, as médias desses desdobramentos são demonstradas na Tabela 7.

O teste de Dunnett permitiu detectar também uma diferença do tratamento adicional com todos os demais experimentos na metodologia de compostos fenólicos. Essa diferença não foi obtida para as análises de ABTS•+, visto que os experimentos 5 e 6 não apresentaram diferença do experimento 9, bem como, os experimentos 3, 4 e 5 nas análises de FRAP (Tabela 4). As médias dos desdobramentos para essas metodologias são descritas na Tabela 6.

**Tabela 4: Concentração de compostos bioativos quanto a compostos fenólicos ( $\mu\text{g.EAG.g}^{-1}$ ) e quanto a compostos antioxidantes de acordo com metodologias de DPPH• ( $\mu\text{g.ET.g}^{-1}$ ), ABTS•+ ( $\mu\text{g.ET.g}^{-1}$ ) e FRAP ( $\mu\text{g.EFe}^{+2}.\text{g}^{-1}$ ).**

Extrato	Tempo	Solvente	Temperatura	Compostos Fenólicos	DPPH•	ABTS•+	FRAP
1	-	-	-	1.625,65 $\pm$ 7,57*	21,83 $\pm$ 0,90*	0,67 $\pm$ 0,01*	2,38 $\pm$ 0,08*
2	+	-	-	1.421,20 $\pm$ 5,14*	20,42 $\pm$ 0,06*	0,66 $\pm$ 0,01*	1,98 $\pm$ 0,07*
3	-	+	-	2.641,60 $\pm$ 50,81*	22,42 $\pm$ 0,99*	1,07 $\pm$ 0,08*	5,18 $\pm$ 0,18
4	+	+	-	2.627,87 $\pm$ 82,31*	18,20 $\pm$ 0,18*	0,84 $\pm$ 0,02*	5,24 $\pm$ 0,21
5	-	-	+	2.124,44 $\pm$ 29,58*	16,60 $\pm$ 0,33*	1,21 $\pm$ 0,09	5,53 $\pm$ 0,28
6	+	-	+	2.901,46 $\pm$ 11,13*	16,91 $\pm$ 0,16*	1,24 $\pm$ 0,10	7,57 $\pm$ 0,29*
7	-	+	+	2.985,20 $\pm$ 29,76*	17,57 $\pm$ 0,28*	1,61 $\pm$ 0,03*	7,22 $\pm$ 0,11*
8	+	+	+	2.979,56 $\pm$ 24,49*	14,30 $\pm$ 0,26*	1,16 $\pm$ 0,01*	7,58 $\pm$ 0,12*
9	0	0	0	1.739,46 $\pm$ 37,41	12,91 $\pm$ 0,30	1,31 $\pm$ 0,06	5,33 $\pm$ 0,23

Fonte: Autoria própria.

\* Indica a diferença estatística com o tratamento adicional (experimento 9), de acordo com o teste de Dunnett a 5% de significância ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 5: Análise de variância (ANOVA) para as variáveis respostas: temperatura (°C), tempo (min) e solvente (%), do experimento inteiramente casualizado em fatorial triplo (temperatura × solvente × tempo) com um tratamento adicional em delineamento inteiramente casualizado (DIC) balanceado.**

Análise	Fator	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Compostos Fenólicos	Temperatura	1	2.682.039,425	2.682.039,425	1.874,869	< 0,0001
	Solvente	1	3.748.105,260	3.748.105,260	2.620,098	< 0,0001
	Tempo	1	114.760,787	114.760,787	80,223	< 0,0001
	Temperatura*Solvente	1	618.016,185	618.016,185	432,022	< 0,0001
	Temperatura*Tempo	1	367.213,841	367.213,841	256,699	< 0,0001
	Solvente*Tempo	1	131.399,433	131.399,433	91,854	< 0,0001
	Temperatura*Solvente*Tempo	1	355.304,141	355.304,141	248,374	< 0,0001
	Adicional vs fatorial	1	1.216.648,459	1.216.648,459	850,493	< 0,0001
	Resíduo	18	25.749,379	1.430,521	-	-
	Total	26	9.259.236,910	-	-	-
DPPH•	Temperatura	1	114,699	114,699	266,028	< 0,0001
	Solvente	1	4,025	4,025	9,336	0,007
	Tempo	1	27,677	27,677	64,193	< 0,0001
	Temperatura*Solvente	1	0,000	0,000	0,000	0,989
	Temperatura*Tempo	1	2,701	2,701	6,264	0,022
	Solvente*Tempo	1	15,320	15,320	35,533	< 0,0001
	Temperatura*Solvente*Tempo	1	0,228	0,228	0,529	0,477
	Adicional vs fatorial	1	150,028	150,028	347,969	< 0,0001
	Resíduo	18	7,761	0,431	-	-
	Total	26	322,440	-	-	-

Análise	Fator	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
ABTS <sup>+</sup>	Temperatura	1	1,475	1,475	477,409	<b>&lt; 0,0001</b>
	Solvente	1	0,308	0,308	99,622	<b>&lt; 0,0001</b>
	Tempo	1	0,156	0,156	50,544	<b>&lt; 0,0001</b>
	Temperatura*Solvente	1	0,025	0,025	7,995	<b>0,011</b>
	Temperatura*Tempo	1	0,012	0,012	3,817	0,067
	Solvente*Tempo	1	0,186	0,186	60,151	<b>&lt; 0,0001</b>
	Temperatura*Solvente*Tempo	1	0,024	0,024	7,626	<b>0,013</b>
	Adicional vs fatorial	1	0,164	0,164	53,045	<b>&lt; 0,0001</b>
	Resíduo	18	0,056	0,003	-	-
Total	26	2,405	-	-	-	
FRAP	Temperatura	1	64,436	64,436	1.589,379	<b>&lt; 0,0001</b>
	Solvente	1	22,533	22,533	555,805	<b>&lt; 0,0001</b>
	Tempo	1	1,600	1,600	39,469	<b>&lt; 0,0001</b>
	Temperatura*Solvente	1	7,123	7,123	175,701	<b>&lt; 0,0001</b>
	Temperatura*Tempo	1	2,798	2,798	69,022	<b>&lt; 0,0001</b>
	Solvente*Tempo	1	0,548	0,548	13,520	<b>0,002</b>
	Temperatura*Solvente*Tempo	1	1,722	1,722	42,479	<b>&lt; 0,0001</b>
	Adicional vs fatorial	1	0,000	0,000	0,008	0,928
	Resíduo	18	0,730	0,041	-	-
Total	26	101,491	-	-	-	

Fonte: Autoria própria.

GL: Graus de liberdade; SQ: Soma dos quadrados; QM: Quadrado médio; Fc: F calculado; Resultados em negrito referem-se aos significativos em nível de 5% de significância de probabilidade de erro ( $p < 0.05$ ).

**Tabela 6: Médias dos desdobramentos da análise de variância para a concentração de compostos bioativos quanto a compostos fenólicos ( $\mu\text{g.EAG.g}^{-1}$ ) e compostos antioxidantes de acordo com metodologias de ABTS<sup>•+</sup> ( $\mu\text{g.ET.g}^{-1}$ ) e FRAP ( $\mu\text{g.EFe}^{+2}.\text{g}^{-1}$ ).**

<b>DESDOBRANDO A TEMPERATURA DENTRO DE CADA NÍVEL DE TEMPO E SOLVENTE</b>						
<b>Experimento</b>	<b>Tempo (minutos)</b>	<b>Solvente (%)</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Compostos Fenólicos</b>	<b>ABTS<sup>•+</sup></b>	<b>FRAP</b>
1	15	60	40	1.625,65 <sup>b</sup>	0,67 <sup>b</sup>	2,38 <sup>b</sup>
5	15	60	70	2.124,44 <sup>a</sup>	1,21 <sup>a</sup>	5,53 <sup>a</sup>
2	60	60	40	1.421,20 <sup>b</sup>	0,66 <sup>b</sup>	1,98 <sup>b</sup>
6	60	60	70	2.901,46 <sup>a</sup>	1,24 <sup>a</sup>	7,57 <sup>a</sup>
3	15	90	40	2.641,60 <sup>b</sup>	1,07 <sup>b</sup>	5,18 <sup>b</sup>
7	15	90	70	2.985,20 <sup>a</sup>	1,61 <sup>a</sup>	7,22 <sup>a</sup>
4	60	90	40	2.627,87 <sup>b</sup>	0,84 <sup>b</sup>	5,24 <sup>b</sup>
8	60	90	70	2.979,56 <sup>a</sup>	1,16 <sup>a</sup>	7,58 <sup>a</sup>
<b>DESDOBRANDO O SOLVENTE DENTRO DE CADA NÍVEL DE TEMPERATURA E TEMPO</b>						
<b>Experimento</b>	<b>Tempo (minutos)</b>	<b>Solvente (%)</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Compostos Fenólicos</b>	<b>ABTS<sup>•+</sup></b>	<b>FRAP</b>
1	15	60	40	1.625,65 <sup>b</sup>	0,67 <sup>b</sup>	2,38 <sup>b</sup>
3	15	90	40	2.641,60 <sup>a</sup>	1,07 <sup>a</sup>	5,18 <sup>a</sup>
2	60	60	40	1.421,20 <sup>b</sup>	0,66 <sup>b</sup>	1,98 <sup>b</sup>
4	60	90	40	2.627,87 <sup>a</sup>	0,84 <sup>a</sup>	5,24 <sup>a</sup>
5	15	60	70	2.124,44 <sup>b</sup>	1,21 <sup>b</sup>	5,53 <sup>b</sup>
7	15	90	70	2.985,20 <sup>a</sup>	1,61 <sup>a</sup>	7,22 <sup>a</sup>
6	60	60	70	2.901,46 <sup>b</sup>	1,24 <sup>a</sup>	7,57 <sup>a</sup>
8	60	90	70	2.979,56 <sup>a</sup>	1,16 <sup>a</sup>	7,58 <sup>a</sup>

DESDOBRANDO O TEMPO DENTRO DE CADA NÍVEL DE TEMPERATURA E SOLVENTE						
Experimento	Tempo (minutos)	Solvente (%)	Temperatura (°C)	Compostos Fenólicos	ABTS• <sup>+</sup>	FRAP
1	15	60	40	1.625,65 <sup>a</sup>	0,67 <sup>a</sup>	2,38 <sup>a</sup>
2	60	60	40	1.421,20 <sup>b</sup>	0,66 <sup>a</sup>	1,98 <sup>b</sup>
3	15	90	40	2.641,60 <sup>a</sup>	1,07 <sup>a</sup>	5,18 <sup>a</sup>
4	60	90	40	2.627,87 <sup>a</sup>	0,84 <sup>b</sup>	5,24 <sup>a</sup>
5	15	60	70	2.124,44 <sup>b</sup>	1,21 <sup>a</sup>	5,53 <sup>b</sup>
6	60	60	70	2.901,46 <sup>a</sup>	1,24 <sup>a</sup>	7,57 <sup>a</sup>
7	15	90	70	2.985,20 <sup>a</sup>	1,61 <sup>a</sup>	7,22 <sup>b</sup>
8	60	90	70	2.979,56 <sup>a</sup>	1,16 <sup>b</sup>	7,58 <sup>a</sup>

Fonte: Autoria própria.

Letras minúsculas na coluna diferem entre si, entre cada faixa de linha, contendo dois experimentos, pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 7: Médias dos desdobramentos da análise de variância para a concentração de compostos antioxidantes pela metodologia de DPPH• ( $\mu\text{g.ET.g}^{-1}$ ).**

<b>DESDOBRANDO A TEMPERATURA DENTRO DE CADA NÍVEL DE TEMPO</b>					
<b>Experimento</b>	<b>Tempo (minutos)</b>	<b>Solvente (%)</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>DPPH•</b>	<b>DPPH• - Média</b>
1	15	60	40	21,83	22,13 <sup>a</sup>
3	15	90	40	22,42	
5	15	60	70	16,60	17,08 <sup>b</sup>
7	15	90	70	17,57	
2	60	60	40	20,42	19,31 <sup>a</sup>
4	60	90	40	18,20	
6	60	60	70	16,91	15,61 <sup>b</sup>
8	60	90	70	14,30	
<b>DESDOBRANDO O TEMPO DENTRO DE CADA NÍVEL DE TEMPERATURA</b>					
<b>Experimento</b>	<b>Tempo (minutos)</b>	<b>Solvente (%)</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>DPPH•</b>	<b>DPPH• - Média</b>
1	15	60	40	21,83	22,13 <sup>a</sup>
3	15	90	40	22,42	
2	60	60	40	20,42	19,31 <sup>b</sup>
4	60	90	40	18,20	
5	15	60	70	16,60	17,08 <sup>a</sup>
7	15	90	70	17,57	
6	60	60	70	16,91	15,61 <sup>b</sup>
8	60	90	70	14,30	

DESDOBRANDO O SOLVENTE DENTRO DE CADA NÍVEL DE TEMPO					
Experimento	Tempo (minutos)	Solvente (%)	Temperatura (°C)	DPPH•	DPPH• - Média
2	60	60	40	20,42	18,67 <sup>a</sup>
6	60	60	70	16,91	
4	60	90	40	18,20	16,25 <sup>b</sup>
8	60	90	70	14,30	
1	15	60	40	21,83	19,22 <sup>a</sup>
5	15	60	70	16,60	
3	15	90	40	22,42	19,99 <sup>a</sup>
7	15	90	70	17,57	
DESDOBRANDO O TEMPO DENTRO DE CADA NÍVEL DE SOLVENTE					
Experimento	Tempo (minutos)	Solvente (%)	Temperatura (°C)	DPPH•	DPPH• - Média
3	15	90	40	22,42	19,99 <sup>a</sup>
7	15	90	70	17,57	
4	60	90	40	18,20	16,25 <sup>b</sup>
8	60	90	70	14,30	
1	15	60	40	21,83	19,22 <sup>a</sup>
5	15	60	70	16,60	
2	60	60	40	20,42	18,67 <sup>a</sup>
6	60	60	70	16,91	

Fonte: Autoria própria.

Letras minúsculas na coluna diferem entre si, entre cada faixa de linha, contendo quatro experimentos, pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Na análise da extração de compostos fenólicos, apresentando a interferência tripla e dupla entre todos os fatores, os resultados demonstraram um maior teor de compostos fenólicos obtido com o conjunto de fatores aplicados no experimento 7 (2.985,20  $\mu\text{g.EAG.g}^{-1}$ ), ou seja, utilizando o solvente 90% a uma temperatura de 70°C durante um período de 15 minutos, ao passo que, no experimento 2, aplicando o solvente 60% a 40°C por 60 minutos gerou o menor teor de compostos fenólicos (1.421,20  $\mu\text{g.EAG.g}^{-1}$ ).

Estes pontos de mínimo e máximo teor obtido confirmou, pela análise estatística, uma interação dos demais extratos quanto a temperatura, demonstrando que aplicando uma maior temperatura (70°C) foi possível obter concentrações maiores destes compostos bioativos comparado a um valor mínimo de 40°C. No mesmo sentido, pelo teste de Dunnett, foi possível avaliar a utilização de uma temperatura intermediária (55°C) na extração dos compostos fenólicos, verificando que esta também não permite uma melhor extração quando comparado à temperatura máxima. 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.

Todavia, quando comparadas a concentração do extrato 9 (1.739,46  $\mu\text{g.EAG.g}^{-1}$ ) com as concentrações dos extratos 1 e 2 (1.625,65 e 1.421,20  $\mu\text{g.EAG.g}^{-1}$ , respectivamente) pode-se perceber uma maior extração ao utilizar a temperatura de 55°C, em contrapartida, ao comparar o extrato 9 com os extratos 3 e 4 (2.641,60 e 2.627,87  $\mu\text{g.EAG.g}^{-1}$ , respectivamente) o cenário contrário ocorreu, demonstrando uma interferência dos demais fatores analisados sobre a extração, como por exemplo, o solvente.

Analisando o efeito do solvente, foi observado que a utilização do álcool etílico 90% possibilitou uma maior extração dos compostos fenólicos comparado ao uso do álcool etílico 75%, e com a aplicação do solvente 60% também se obteve uma menor concentração extraída frente ao solvente 90%, como demonstrado na Tabela 6. Tem-se uma exceção quando analisado o experimento 6 (70°C e 60%), pela Tabela 4, o qual demonstrou uma concentração maior (2.901,46  $\mu\text{g.EAG.g}^{-1}$ ) frente aos experimentos 3 e 4 (40°C e solvente 90%), confirmando a interação dos fatores temperatura e solvente aplicados na extração, em paralelo ao tempo.

Incluindo a interferência do tempo, pode-se observar que no caso do experimento 6 (70°C, solvente 60% e 60 min) este demonstrou uma melhor extração também comparado ao experimento 5 (70°C, solvente 60% e 15 min), que obteve 2.124,44  $\mu\text{g.EAG.g}^{-1}$ , ou seja, utilizando o maior intervalo de tempo na extração, porém, fato que implica em uma maior demanda energética para o processo e também um aumento na possibilidade de degradação dos compostos (SHAIDI; NACZK, 1995). Verificando os experimentos 1 (40°C, solvente 60% e 15 min) e 2 (40°C, solvente 60% e 60 min) pode-se notar uma diferença estatística, onde a aplicação de um menor tempo de extração gerou uma melhor concentração extraída (1625,65  $\mu\text{g.EAG.g}^{-1}$ ), mas que ainda resultou em concentrações inferiores frente aos demais experimentos.

Ao analisar os experimentos 7 (70°C, solvente 90% e 15 minutos) e 8 (70°C, solvente 90% e 60 minutos), com teores de compostos fenólicos de 2.985,20 e 2.979,56  $\mu\text{g.EAG.g}^{-1}$ , respectivamente, não houve diferença estatística entre estes, permitindo a aplicação de um menor tempo para a extração dos compostos, e também aplicando o melhor parâmetro de temperatura (70°C) e solvente (90%) na extração, caracterizando o experimento 7.

Outros dois experimentos que não obtiveram diferenças estatísticas entre si foram o 3 (40°C, solvente 90% e 15 minutos) e 4 (40°C, solvente 90% e 60 minutos), fato que permitiu a conclusão de que ao utilizar o melhor parâmetro de solvente, álcool etílico 90%, o tempo é um fator de baixa interferência na extração, pois não houve diferença estatística entre os experimentos ao aplicar a temperatura de 40°C (experimento 3 e 4) e 70°C (experimentos 7 e 8).

Sabendo que algumas substâncias detectadas na análise de compostos fenólicos podem apresentar atividades antioxidantes, foram realizadas as análises de determinação das atividades antioxidantes desses extratos quanto a DPPH•, ABTS•+ e FRAP.

Na análise de DPPH•, o extrato 3 (40°C, solvente 90% e 15 minutos) apresentou a maior concentração de compostos com atividade antioxidantes (22,42  $\mu\text{g.ET.g}^{-1}$ ), ao passo que o extrato 9 (55°C, solvente 75% e 37,5 minutos) apresentou a menor concentração (12,91  $\mu\text{g.ET.g}^{-1}$ ), e ressaltando que este extrato apresentou diferença estatística em relação ao controle pelo teste de Dunnett, Tabela 4.

Na avaliação da interferência do tempo (Tabela 7), foi observado que o tempo mínimo de 15 minutos permitiu as melhores concentrações de compostos antioxidantes, tanto para a temperatura de 40°C quanto de 70°C. Todavia, ao observar a interferência da temperatura, ficou notável que os maiores teores de compostos antioxidantes foram obtidos ao aplicar a temperatura de 40°C.

Esta diminuição da concentração de compostos antioxidantes com a aplicação de temperaturas mais elevadas também foi descrita por Barbosa, Paes e Pereira (2016) ao quantificarem tais compostos em extratos etanólico e hidroalcoólico (etanol 80%) de grãos de milho, além de que, segundo Moure et al. (2001), a degradação térmica também pode interferir nessas condições de extração, principalmente, se tratando de atividade antioxidante em compostos fenólicos.

Também pode-se observar, pela Tabela 4 e 7, que ao realizar a extração utilizando um período maior de tempo, os valores das concentrações apresentaram uma queda, por exemplo, os experimentos 3 (15 minutos) e 4 (60 minutos), com concentrações de compostos antioxidantes de 22,42 e 18,20  $\mu\text{g}.\text{ET}.\text{g}^{-1}$ , respectivamente, indicando uma possível degradação das substâncias antioxidantes detectadas pelo método de DPPH•.

Analisando a aplicação do solvente frente ao tempo, foi observado que ao utilizar o álcool etílico 90% o tempo de 15 minutos proporcionou uma maior concentração de compostos antioxidantes extraídos, resultado também apontado por Rizi (2016), ao obter os maiores teores de compostos antioxidantes aplicando o menor tempo de extração e maior concentração de álcool etílico ao utilizar como matriz as folhas de moringa. Porém, ao aplicar o álcool etílico 60% não se tem uma diferença estatística quanto ao tempo mínimo e máximo, possibilitando a utilização do período de 15 minutos para obtenção de bons resultados para ambos os solventes.

Na metodologia de ABTS•<sup>+</sup> foi possível detectar o experimento 7 com o maior teor de compostos antioxidantes lidos por esse método (1,61  $\mu\text{g}.\text{ET}.\text{g}^{-1}$ ), ou seja, realizando a extração com solvente 90% durante 15 minutos a 70°C, enquanto os experimentos 1 e 2 (solvente 60% e 40°C) demonstraram os menores teores de antioxidantes (0,67 e 0,66  $\mu\text{g}.\text{ET}.\text{g}^{-1}$ , nessa ordem) resultados também obtidos na análise de compostos fenólicos.

Em uma análise do tempo (Tabela 6), foi observado que este fator não apresentou diferença estatística quando foi realizada a extração com álcool etílico

60%, ao passo que, quando utilizado o álcool etílico 90% o tempo de 15 minutos gerou resultados superiores comparado a 60 minutos. Quanto ao tempo intermediário, aplicado no experimento 9, este apresentou um resultado superior ( $1,31 \mu\text{g.ET.g}^{-1}$ ) comparado a todas as extrações com as combinações dos tempo de 15 e 60 minutos e a temperatura de  $40^{\circ}\text{C}$  e  $70^{\circ}\text{C}$ , como demonstrado na Tabela 4, com exceção do extrato 7 ( $1,61 \mu\text{g.ET.g}^{-1}$ ), evidenciando a interferência do solvente na extração, como descrito na ANAVA (Tabela 5) que indicou uma interferência da relação temperatura x solvente para o método de ABTS•<sup>+</sup>. Porém, ressalta-se que o tratamento adicional, pelo teste de Dunnett (Tabela 4), não apresentou diferença estatística com os experimentos 5 e 6 (solvente 60% e  $70^{\circ}\text{C}$ ), os quais tiveram os teores de antioxidantes iguais a 1,21 e 1,24  $\mu\text{g.ET.g}^{-1}$ , respectivamente.

Analisando a concentração do álcool etílico aplicado na extração, não obteve-se para os extratos 6 e 8 (60 minutos e  $70^{\circ}\text{C}$ ) uma diferença estatística quanto a concentração de compostos extraídos, o que se mostrou como uma exceção na análise, visto que, para os demais experimentos a utilização do álcool etílico 90% apresentou concentrações superiores de compostos antioxidantes extraídos. Todavia, ao verificar a aplicação do solvente 75% pode-se observar que os resultados foram superiores comparados ao uso do solvente 90%, com exceção do experimento 7, e que não houve diferença estatística quando comparado ao uso do solvente 60% para os experimentos 5 e 6.

Contrastando as temperaturas utilizadas nas extrações foi possível observar pela Tabela 6 uma diferença estatística ao aplicar o valor de  $70^{\circ}\text{C}$  nos experimentos, permitindo a extração de um maior teor de compostos antioxidantes detectáveis pela metodologia de ABTS•<sup>+</sup>. E pela análise da Tabela 4 pode-se também observar uma maior concentração extraídas ao aplicar  $70^{\circ}\text{C}$  e  $55^{\circ}\text{C}$  frente a  $40^{\circ}\text{C}$ , porém, bem como ocorreu na análise do solvente, o valor intermediário ( $55^{\circ}\text{C}$ ) não apresentou diferença estatística com os experimentos 5 e 6, que utilizavam  $70^{\circ}\text{C}$ , o que permite ressaltar o baixo rendimento na extração ao seu aplicar  $40^{\circ}\text{C}$ . Segundo, Benelli (2010), a aplicação de temperatura mais elevadas permite uma redução na tensão superficial e na viscosidade do solvente (álcool etílico), interferindo tanto no teor de compostos fenólicos quanto no potencial antioxidante do extrato, como demonstrado em ambas as análises realizadas.

Na metodologia de FRAP o extrato com o maior teor de antioxidantes ( $7,58 \mu\text{g.EFe}^{+2}.\text{g}^{-1}$ ) foi obtido no experimento 8 ( $70^\circ\text{C}$ , solvente 90% e 60 minutos), enquanto os experimentos 1 e 2 ( $40^\circ\text{C}$  e solvente 60%) apresentaram as menores concentrações, 2,38 e  $1,98 \mu\text{g.EFe}^{+2}.\text{g}^{-1}$ , respectivamente, sendo este resultado também apontado pela análise dos dados obtidos pelo método de ABTS<sup>•+</sup> e na quantificação dos compostos fenólicos (Tabela 4).

O tempo máximo (60 minutos) permitiu as maiores concentrações, quando estabelecido junto a temperatura de  $70^\circ\text{C}$  para todos os experimentos que aplicaram este valor. Quando verificada a temperatura de  $40^\circ\text{C}$  o tempo mínimo de 15 minutos apresentou uma melhor extração quando aplicado com o solvente 60% (experimentos 1 e 2), mas o tempo não obteve uma diferença estatística ao ser analisado com o solvente 90%, sendo que este caso remete aos experimentos 3 (15 minutos) e 4 (60 minutos), com teores de antioxidantes iguais a 5,18 e  $5,24 \mu\text{g.EFe}^{+2}.\text{g}^{-1}$ , respectivamente, como demonstrado na Tabela 4 e 6.

Os experimentos 3 e 4 também não apresentaram diferença estatística pelo teste de Dunnett, fato que permitiu observar que a utilização da temperatura intermediária ( $55^\circ\text{C}$ ) não apresentou diferença com a temperatura mínima de  $40^\circ\text{C}$  para essas condições de extração. E quanto aos fatores aplicados nos experimentos 1 e 2, estes apresentaram diferença comparados com o experimento adicional, ressaltando a melhor eficiência da temperatura intermediária em comparação à temperatura mínima na extração desses compostos.

Também foi percebido, pela Tabela 6, uma melhor extração de compostos antioxidantes ao ser utilizada a temperatura de  $70^\circ\text{C}$  comparada a  $40^\circ\text{C}$  para todos os experimentos, fato que ressalta a ineficiência da utilização de uma menor temperatura na extração de compostos detectáveis também pela metodologia de FRAP, como também descrito nos experimentos realizados por Rizi (2016), nos quais a temperatura de  $70^\circ\text{C}$  utilizando etanol permitiu elevados teores de compostos antioxidantes mensurados pela técnica de FRAP.

Quanto ao solvente não foi observado uma distinção estatística entre o álcool etílico 60% e 90% quando aplicados a uma temperatura de  $70^\circ\text{C}$  e tempo de 60 minutos, ou seja, para os experimentos 8 (solvente 90%) e 6 (solvente 60%), e sendo estes as maiores concentrações obtidas na análise de FRAP, respectivamente, 7,58

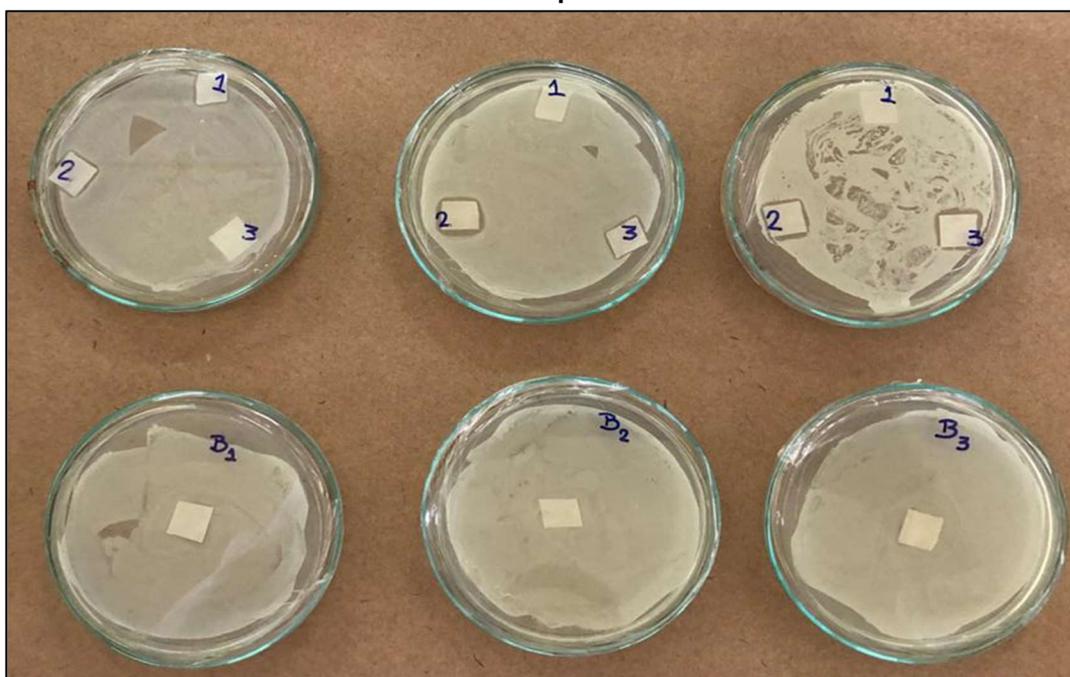
e  $7,57 \mu\text{g.EFe}^{+2}.\text{g}^{-1}$ . Para os demais experimentos as maiores concentrações ocorreram ao ser utilizado o álcool etílico 90%.

### 5.3 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Na determinação da atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* foram testados os três extratos com o maior teor de compostos fenólicos para cada concentração de solvente utilizado, sendo testados os extratos 6 (álcool etílico 60%), 7 (álcool etílico 90%) e 9 (álcool etílico 75%).

Na análise do teste de difusão em ágar pode-se observar que não houve interferência do álcool etílico, independente da concentração, sobre o crescimento bacteriano, pois nos experimentos controle do teste o microrganismo se desenvolveu, como demonstrado na figura 7.

**Figura 7: Teste de difusão em ágar para determinação da atividade antibacteriana frente a *S. aureus* dos extratos 6, 7 e 9, sendo na figura demarcados por 1, 2 e 3, respectivamente. O controle do teste, utilizando o solvente puro de cada extrato, está indicado pela letra B.**



Fonte: Autoria própria.

Embora a aplicação dos extratos tenha possibilitado resultados numericamente distintos, a partir da análise destes não foi apontada uma diferença

estatística entre os mesmos. Todavia, a maior inibição de *S. aureus* foi obtida na aplicação do extrato 7, demonstrado na Tabela 8, o qual também demonstrou o maior teor de compostos fenólicos obtido no experimento anterior (2985,20  $\mu\text{g.EAG.g}^{-1}$ ), relatando a ação antimicrobiana presente nos compostos extraídos nas condições testadas no experimento 7.

**Tabela 8: Halos de inibição médio (mm) dos extratos 6, 7 e 9 frente a *S. aureus*.**

Microrganismo	Halos de inibição médio (mm)		
	Extrato 6	Extrato 7	Extrato 9
<i>S. aureus</i>	0,25 $\pm$ 0,00 <sup>a</sup>	2,33 $\pm$ 0,47 <sup>a</sup>	1,42 $\pm$ 1,27 <sup>a</sup>

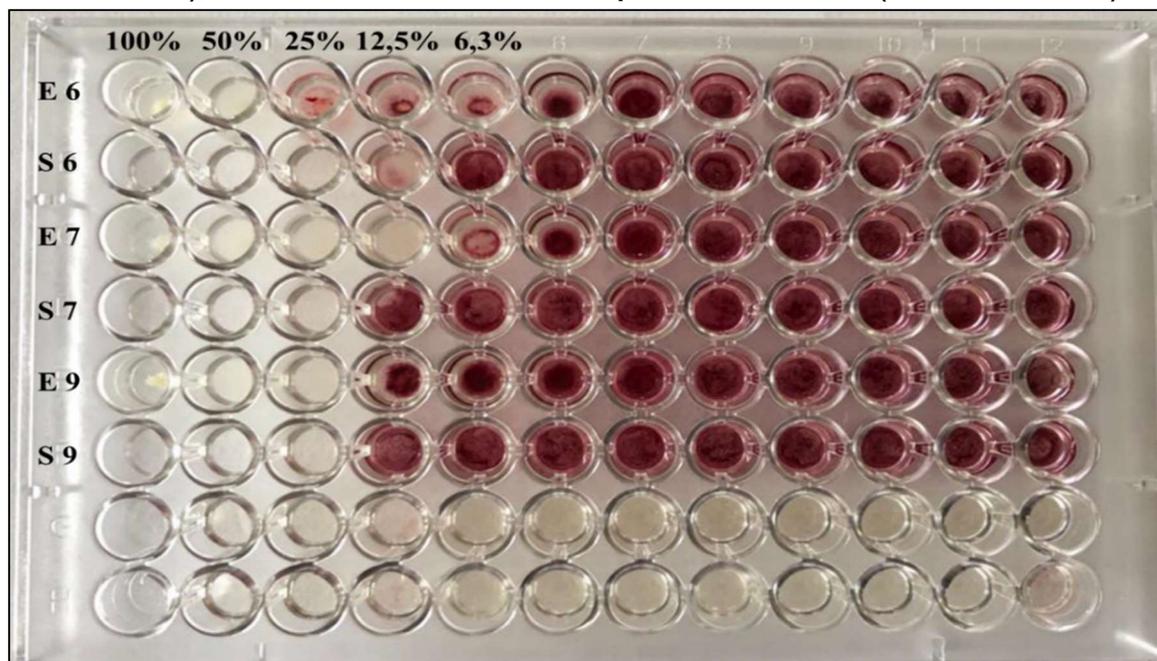
Fonte: Autoria própria.

No caso do extrato 6 foi possível obter um elevado teor de compostos fenólicos (2901,46  $\mu\text{g.EAG.g}^{-1}$ ) nas condições aplicadas na extração, porém a ação antibacteriana não se fez tão acentuada nas substâncias extraídas, ao passo que, ao analisar o extrato 9, foi percebido um teor relativamente menor de compostos fenólicos (1739,46  $\mu\text{g.EAG.g}^{-1}$ ), mas com uma ação antimicrobiana melhor comparada ao extrato 6.

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 dos frutos do gênero *Citrus*. De acordo com o trabalho de Pires e Piccoli (2012), o óleo essencial da folha e da casca do limão-cravo também 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.

Na determinação da concentração inibitória mínima, os resultados permitiram uma confirmação do experimento qualitativo, principalmente, quanto a ação antibacteriana do extrato 7, visto que em uma diluição de  $10^{-4}$  do extrato puro (12,5%) o extrato inibiu o crescimento de *S. aureus*, enquanto que o álcool etílico 90% não possibilitou o mesmo efeito, como demonstrado na figura 8.

**Figura 8: Teste de concentração inibitória mínima para determinação da atividade antibacteriana frente a *S. aureus* dos extratos 6, 7 e 9. E6 – Extrato 6, S6 – Solvente aplicado no extrato 6 (álcool etílico 60%), E7 – Extrato 7, S7 – Solvente aplicado no extrato 7 (álcool etílico 90%), E9 – Extrato 9 e S9 – Solvente aplicado no extrato 9 (álcool etílico 75%).**



Fonte: Autoria própria.

Da mesma maneira, a ineficiência da ação antimicrobiana do extrato 6 foi observada pelo fato de que ao ser testado este apresentou uma inibição na diluição de  $10^{-2}$  (50%), ao passo que o álcool etílico gerou uma inibição na diluição de  $10^{-3}$  (25%), demonstrando uma inibição bacteriana superior ao extrato. E para o extrato 9, uma pequena inibição foi observada na diluição de  $10^{-4}$  (12,5%), porém, apresentou pouca diferença quando comparada a ação do álcool etílico 75%.

## 6 CONCLUSÃO

A semente de limão-cravo (*Citrus limonia* Osbeck) demonstrou um pequeno potencial como agente antioxidante, visto suas baixas concentrações comparada à outras fontes já descritas na literatura, porém, apresentou ação antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus*.

O maior teor de compostos fenólicos foi obtido ao aplicar a temperatura de 70°C, álcool etílico 90% durante 15 minutos de extração, sendo que estes fatores também permitiram o maior teor de compostos antioxidantes lidos pelo método de ABTS•<sup>+</sup>. Pela metodologia de FRAP a maior concentração de antioxidantes foi obtida utilizando 70°C, álcool etílico 90% por um período de 60 minutos, ao passo que, pela metodologia de DPPH•, o melhor resultado se deu ao aplicar 40°C, álcool etílico 90% e um tempo de 15 minutos.

Os extratos analisados na metodologia de difusão em ágar não apresentaram diferença estatística entre si na formação de halos de inibição, porém, pela metodologia de determinação de concentração inibitória mínima o extrato 7 se mostrou eficiente como agente antibacteriano, inibindo *S. aureus* na diluição de 10<sup>-4</sup>.

## **7 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

O estudo da semente de limão-cravo, um resíduo industrial, foi de grande relevância na demonstração de seu potencial antioxidante e antimicrobiano, além da contribuição para o conhecimento desta matriz, pouco estudada até o momento.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, M. M. B.; SOUSA, P. H. M.; ARRIAGA, A. M. C.; PRADO, G. M.; MAGALHÃES, C. E. C.; MAIA, G. A.; LEMOS, T. L. G. Bioactive compounds and antioxidant activity of fresh exotic fruits from northeastern Brazil. **Food Research International**, v. 44, p. 2155–2159, 2011.

ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos - Uma breve revisão. **Instituto Adolfo Lutz**, v. 66, n. 66, p. 232–240, 2007.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos**. Resolução de Diretoria Colegiada - RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001.

\_\_\_\_\_. **Regulamento técnico que aprova o uso dos aditivos alimentares, estabelecendo suas funções e limites máximos para a categoria de alimentos: Produtos protéicos – Subcategoria: Bebidas não alcoólicas a base de soja**. Resolução de Diretoria Colegiada - RDC nº 25 de 15 de fevereiro de 2005.

\_\_\_\_\_. **Atribuição de aditivos e seus Limites Máximos para a Categoria de Alimentos 13: Molhos e Condimentos**. Resolução de Diretoria Colegiada - RDC nº 4 de 15 de janeiro de 2007.

BALASUNDRAM, N.; SUNDRAM, K.; SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants and agroindustrial by products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. **Food Chemistry**, v. 99, p. 191–203, 2006.

BARBOSA, D. B. **Avaliação das atividades antimicrobiana, antioxidante e análise preliminar da mutagenicidade do extrato aquoso das folhas de *Anacardium humile* St. Hill. (*Anacardiaceae*)**. 2008. 82 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Bioquímica) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2008.

BARBOSA, N. A.; PAES, M. C. D.; 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, M. S. Properties of sufficiency and statistical tests. **Proceedings of the Royal Statistical Society**, Series A 160, p. 268-282, 1937.

BENARIBA, N.; DJAZIRA, R.; BELLAKHDAR, W.; BELKACEM, N.; KADIATA, M.; MALAISSE, W. J.; SENER, A. Phytochemical screening and free radical scavenging activity of *Citrullus colocynthis* seeds extracts. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 3, p. 35–40, 2013.

BENELLI, P. **Agregação de valor ao bagaço de laranja (*Citrus Sinensis* L. Osbeck) mediante obtenção de extratos bioativos através de diferentes**

**técnicas de extração**. 2010, 233 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2010.

BOCCO, A.; CUVELIER, M. E.; RICHARD, H.; BERSET, C. Antioxidant Activity and Phenolic Composition of Citrus Peel and Seed Extracts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, n. 6, p. 2123–2129, 1998.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. L. W. T. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT - Food Science and Technology**, v. 28, p. 25–30, 1995.

BRAVO, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. **Nutrition Reviews**, v. 56, n. 11, p. 317–33, 1998.

CARVALHO, A. F.; SILVA, D. M.; SILVA, T. R. C.; SCARCELLI, E.; MANHANI, M. R. Avaliação da atividade antibacteriana de extratos etanólico e de ciclohexano a partir das flores de camomila (*Matricaria chamomilla* L.). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 16, n. 3, p. 521–526, 2014.

CLSI. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically. **Clinical and Laboratory Standards Intitute**. Documento M07-A10, p. 1987-1988, 2015.

CRUZ, R. G. **Atividade antioxidante de extratos vegetais : estudo das condições de extração e aplicação em sistema lipídico**. 2014. 98 f. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia de Alimentos) - Universidade de São Paulo, 2014.

DEGÁSPARI, C. H.; WASZCZYNSKYJ, N. Propriedades antioxidantes de compostos fenólicos. **Visão Acadêmica**, v. 5, n. 1, p. 33–40, 2004.

DEL RÉ; P. V.; JORGE, N. Especiarias como antioxidantes naturais: aplicações em alimentos e implicações na saúde. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, n. 2, p. 389–399, 2012.

DIMITRIOS, B. Sources of natural phenolic antioxidants. **Food Science e Techbhnology**, v. 17, p. 505–512, 2006.

ELMASTAS, M.; ISILDAK, O.; TURKEKUL, I.; TEMUR, N. Determination of antioxidant activity and antioxidant compounds in wild edible mushrooms. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 20, n. 3–4, p. 337–345, 2007.

EMBRAPA. **Produção brasileira de limão em 2017**. 2017. Disponível em <[http://www.cnpmf.embrapa.br/Base\\_de\\_Dados/index\\_pdf/dados/brasil/limao/b1\\_limao.pdf](http://www.cnpmf.embrapa.br/Base_de_Dados/index_pdf/dados/brasil/limao/b1_limao.pdf)>. Acesso em: 26 abr. 2019.

EMBUSCADO, M. E. Spices and herbs : Natural sources of antioxidants – a mini review. **Jounal of functional foods**, v. 18, p. 811–819, 2015.

FAO. **Citrus fruit: fresh and processed**. 2017. Disponível em <<http://www.fao.org/economic/est/est-commodities/citrus-fruit/en/>>. Acesso em: 26 abr. 2019.

FERRARI, C. K. B.; TORRES, A. F. S. Novos compostos dietéticos com propriedades anticarcinogênicas. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 48, n. 3, p. 375–382, 2002.

FERREIRA, E. B.; CAVALCANTI, P. P.; NOGUEIRA, D. A. Pacote Experimental Designs (Portuguese). **R package version 1.2.0**. 2018.

FILHO, W. B. N.; FRANCO, C. R. Avaliação do Potencial dos Resíduos Produzidos Através do Processamento Agroindustrial no Brasil. **Revista Virtual de Química**, v. 7, n. 6, p. 1968–1987, 2015.

GONÇALVES, A. E. S. S. **Avaliação da capacidade antioxidante de frutas e polpas de frutas nativas e determinação dos teores de flavonoides e vitamina C**. 2008. 88 f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

GOVERNMENT OF CANADA. **List of permitted sequestering agentes (Lists of Permitted Food Additives)**. 2019. Disponível em: <<https://www.canada.ca/en/health-canada/services/food-nutrition/food-safety/food-additives/lists-permitted/12-sequestering-agents.html>>. Acesso em: 11 jun. 2019.

GUINÉ, R. P. F.; BARROCA, M. G.; LIMA, M. J. R. Role and health benefits of different functional food components. **International Journal of Medical and Biological Frontiers**, v. 17, n. 9, p. 1081–3829, 2011.

HASSANPOUR, S.; MAHERI-SIS, N.; ESHRATKHAH, B.; MEHMANDAR, F. B. Plants and secondary metabolites (Tannins): A Review. **International Journal of Forest, Soil and Erosion**, v. 1, n. 11, p. 47–53, 2011.

HAVSTEEN, B. H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 96, p. 67–202, 2002.

HOCMAN, G. Chemoprevention of Cancer : Phenolic Antioxidants (BHAT, BHA). **Intitucional Journal Biochemistry**, v. 20, n. 7, p. 639–651, 1988.

IAPAR – Instituto Agronômico do Paraná. **Atlas climático do estado do Paraná**. Londrina, 210 p., 2019.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. 1ª Edição Digital. **Métodos físicos-químicos para análise de Alimentos**, 2008.

JAYASENA, D. D.; JUNG, S.; KIM, S. H.; KIM, H. J.; ALAHAKOON, A. U.; LEE, J. H.; JO, C. Endogenous functional compounds in Korean native chicken meat are dependent on sex, thermal processing and meat cut. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 95, n. 4, p. 771–775, 2015.

JEONG, S. H.; KIM, B. Y.; KANG, H. G.; KU, H. O.; CHO, J. H. Effects of butylated hydroxyanisole on the development and functions of reproductive system in rats. **Toxicology**, v. 208, n. 1, p. 49–62, 2005.

JING, P.; YE, T.; SHI, H.; SHENG, Y.; SLAVIN, M.; GAO, B.; LIU, L.; YU, L. L. Antioxidant properties and phytochemical composition of China-grown pomegranate seed. **Food Chemistry**, v. 132, p. 1467–1464, 2012.

KAIPERS, K. F. C. **Efeito do extrato de alecrim (*Rosmarinus officinalis*) como antioxidante em linguiça colonial**. 2017. 87 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de alimentos) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Londrina, 2017.

KING, A.; YOUNG, G. Characteristics and occurrence of phenolic phytochemicals. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 99, n. 2, p. 213–218, 1999.

KOBORI, C. N.; JORGE, N. Caracterização dos óleos de algumas sementes de frutas como aproveitamento de resíduos industriais. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 29, n. 5, p. 1008–1014, 2005.

KUNRATH, C. A.; SAVOLDI, D. C. **Própolis como antioxidante em produtos cárneos: Aplicação e avaliação em salame tipo italiano**. 2014. 69 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Tecnólogo em Alimentos) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Francisco Beltrão, 2014.

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.

LUZIA, D. M. M.; JORGE, N. Potencial antioxidante de extratos de sementes de limão (*Citrus limon*). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, n. 2, p. 489–493, 2010.

MARKON, M.; HASAN, M.; DAUD, W. R.; SING, H.; JAHIM, J. M. Extraction of hydrolysable tannins from *Phyllanthus niruri* Linn.: Effects of solvents and extraction methods. **Separation and Purification Technology**, v. 52, p. 487-496, 2007.

MOURE, A.; CRUZ, J. M.; FRANCO, D.; DOMINGUEZ, J. M.; SINEIRO, J.; DOMINGUEZ, H.; NÚÑEZ, M. J.; PARAJÓ, J. C. Natural antioxidants from residual sources. **Food Chemistry**, v. 72, n. 2, p. 145-171, 2001.

NAKAJIMA, V. M.; MACEDO, G. A.; MACEDO, J. A. Citrus bioactive phenolics: Role on the obesity treatment. **Food Science and Technology**, v. 59, p. 1205–1212, 2014.

NASCIMENTO, K. S. **Compostos fenólicos, capacidade antioxidante e propriedades físico-químicas de méis de *Apis mellifera* do estado do Rio Grande do Sul**. 2016. 83 f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

NCCLS. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard**. 6. ed. NCCLS document, v. 23, n. 2, 2003.

NIRMALA, C.; BISHT, M. S.; LAISHRAM, M. Bioactive compounds in bamboo shoots: health benefits and prospects for developing functional foods. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 49, n. 6, p. 1425–1431, 2014.

OETTERER, M.; D'ARCE, M. A. B. R.; SPOTO, M. H. **Fundamentos de Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Barueri: Manoele, 2006.

OLIVEIRA, V. B.; YAMADA, L. T.; FAGG, C. W.; BRANDÃO, M. G. L. Native foods from Brazilian biodiversity as a source of bioactive compounds. **Food Research International**, v. 48, p. 170–179, 2012.

OLSEN, P.; METER, O.; BILLE, N.; WURTZEN, G. Carcinogenicity study on butylated hydroxytoluene (BHT) in wistar rats exposed in utero. **Food and Chemical Toxicology**, v. 24, n. 1, p. 1–12, 1986.

PAGLARINI, C. S. **Utilização de extratos comerciais derivados de plantas em produtos cárneos: Avaliação da atividade antioxidante**. 2015. 151 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2015.

PAIXÃO, N.; PERESTRELO, R.; MARQUES, J. C.; CÂMARA, J. S. Relationship between antioxidant capacity and total phenolic content of red, rosé and white wines. **Food Chemistry**, v. 105, n. 1, p. 204–214, 2007.

PALITO, G. F.; SILVA, C. F. G.; MENDES, M. P.; ALMEIDA, V. V.; ROCHA, C. L. M. S. C.; TONIN, L. T. D. Composição centesimal, compostos bioativos e atividade antioxidante de frutos de *Morinda citrifolia* Linn (noni) cultivados no Paraná. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, n. 1, p. 59-66, 2015.

PEIXOTO, N. M. **Obtenção de compostos bioativos a partir das sementes de *Adenantha pavoninva* L. utilizando extração assistida por enzimas**. 2017. 83 f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2017.

PEREIRA, R. B. **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.

PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. Literature data may underestimate the actual antioxidant capacity of cereals. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 12, p. 5036–5040, 2005.

PIRES, T. C.; PICCOLI, R. H. Efeito inibitório de óleos essenciais do gênero Citrus

sobe o crescimento de micro-organismos. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 71, n. 2, p. 378-385, 2012.

RAMALHO, V. C. R.; JORGE, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. **Química Nova**, v. 29, n. 04, p. 755–760, 2006.

RAYMUNDO, S.; HORTA, P.; FETT, R. Atividade antioxidante *in vitro* de extratos de algumas algas verdes (*Chlorophyta*) do litoral catarinense (Brasil). **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 40, n. 4, p. 495–503, 2004.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical & Medicine**, v. 26, n. 98, p. 1231–1237, 1999.

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

REDA, S. Y.; LEAL, E. S.; BATISTA, E. A. C.; BARANA, A. C.; SCHNITZEL, E.; CARNEIRO, P. I. B. Caracterização dos óleos das sementes de limão rosa (*Citrus limonia* Osbeck) e limão siciliano (*Citrus limon*), um resíduo agroindustrial. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 4, p. 672–676, 2005.

REISCHE, D. W.; LILLARD, D. A.; EITENMILLER, R. R. Antioxidants. In: AKOH, C.; MIND, D. B. **Food lipids: Chemistry, nutrition and biotechnology**. New York: Marcel Dekker, 2008. 3 ed. Cap. 5, p. 409–433.

RETORE, M. **Caracterização da fibra de coprodutos agroindustriais e sua avaliação nutricional para coelhos em crescimento**. 2009. 70 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2009.

RIZI, F. R. **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.

ROESLER, R.; MALTA, L. G.; CARRASCO, L. C.; HOLANDA, R. B.; SOUSA, C. A. S.; PASTORE, G. M. Atividade antioxidante de frutas do cerrado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, p. 53–60, 2007.

RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; MORAIS, S. M.; SAMPAIO, C. G.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. D. **Metodologia Científica: Determinação de atividade antioxidante total em frutas pelo método de redução do ferro (FRAP)**. Embrapa, Fortaleza, p. 1–4, 2006.

RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; MORAIS, S. M.; SAMPAIO, C. G.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. D. **Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre DPPH•**. Embrapa, Fortaleza, p. 1-4, 2007.

RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; MORAIS, S. M.; SAMPAIO, C. G.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. D. **Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre ABTS<sup>•+</sup>**. Embrapa, Fortaleza, p. 1-4, 2007.

SANTOS-BUELGA, C.; SCALBERT, A. Proanthocyanidins and tannin - like compounds - nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 80, n. 7, p. 1094–1117, 2000.

SANTOS, V. J.; BIONDO, P. B. F.; ROTTA, E. M.; MORAIS, D. R. M.; VISENTAINER, J. V. Otimização da secagem por meio da avaliação da atividade antioxidante de partes não comestíveis (semente/casca) do maracujá. **Revista brasileira de pesquisa em alimentos**, v. 5, n. 2, p. 10–16, 2014.

SCALBERT, A. Antimicrobial properties of tannins. **Phytochemistry**, v. 30, n. 12, p. 3875–3883, 1991.

SELANI, M. M. **Extrato de bagaço de uva como antioxidante natural em carne de frango processada e armazenada sob congelamento**. 2010. 101 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade de São Paulo, 2010.

SHAIKI, F.; NACZK, M. Food phenolics: sources, chemistry, effects and applications. **Technomic Publishing**. p. 281-319, 1995.

SHAPIRO, S. S.; WILK, M. B. An analysis of variance test for normality (complete samples). **Biometrika**, v. 52, p. 591-611, 1965.

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

SILVA, P. M.; GAUCHE, C.; GONZAGA, L. V.; COSTA, A. C. O.; FETT, R. Honey: Chemical composition, stability and authenticity. **Food Chemistry**, v. 196, p. 309–323, 2015.

SINGH, B.; SINGH, J. P.; KAUR, A.; SINGH, N. Bioactive compounds in banana and their associated health benefits – A review. **Food Chemistry**, v. 206, p. 1–11, 2016.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTÓS, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. **Method Enzymology**, v. 299, p. 152–178, 1999.

SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes Phenolic. **Revista de Nutrição**, v. 15, n. 1, p. 71–81, 2002.

SOUSA, C. M. M.; SILVA, H. R.; VIEIRA, G. M.; AYRES, M. C. C.; COSTA, C. L. S.; ARAÚJO, D. S.; CAVALCANTE, L. C. D.; BARROS, E. D. S.; ARAÚJO, P. B. M.;

BRANDÃO, M. S.; CHAVES, M. H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 351–355, 2007.

SOUSA, R. F.; SOUSA, J. A. Metabólitos secundários associados a estresse hídrico e suas funções nos tecidos vegetais. **Revista Brasileira de Gestão Ambiental**, v. 11, n. 01, p. 01–08, 2017.

STANGARLIN, J. R.; KUHN, O. J.; TOLEDO, M. V.; PORTZ, R. L.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; PASCHOLATI, S. F. A defesa vegetal contra fitopatógenos. **Scientia Agraria Paranaensis**, v. 10, n.1, p. 18–46, 2011.

TAHERI, A.; FARVIN, K. H. S.; JACOBSEN, C.; BARON, C. P. Antioxidant activities and functional properties of protein and peptide fractions isolated from salted herring brine. **Food Chemistry**, v. 142, p. 318–326, 2014.

TEIXEIRA, N. C. **Desenvolvimento, caracterização físico-química e avaliação sensorial de suco de jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba* (Vell) Berg)**. 2011. 139 f. Dissertação (Mestrado em Ciências de Alimentos) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2011.

TSUDA, T.; OSAWA, T.; NAKAYAMA, T.; KAWAKISHI, S.; OHSHIMA, K. Antioxidant activity of pea bean (*Phaseolus vulgaris* L.) extract. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 70, n. 9, p. 909–913, 1993.

ZERAIK, M. L.; YARIWAKE, J. H. Extração de  $\beta$ -caroteno de cenouras: uma proposta para disciplinas experimentais de química. **Química Nova**, 31, 1259–1262, 2008.

ZHANG, W.; XIAO, S.; SAMARAWEERA, H.; LEE, E. J.; AHN, D. U. Improving functional value of meat products. **Meat Science**, v. 86, n. 1, p. 15–31, 2010.