

Obtenção e Caracterização do Óleo Essencial de Laranja Obtido a Partir de Resíduos de *Citrus sinensis* 'Valencia'

Attainment and Characterization of Orange Essential Oil Obtained from Residues of *Citrus sinensis* 'Valencia'

Obtención y Caracterización de Aceite Esencial de Naranja Obtenido a Partir de Resíduos de *Citrus sinensis* 'Valencia'

Recebido: 17/06/2022 | Revisado: 29/06/2022 | Aceito: 02/07/2022 | Publicado: 11/07/2022

Vinícius Tres Orso

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1637-1036>
Universidade Comunitária da Região de Chapecó, Brasil
E-mail: vinicius.orso@unochapeco.edu.br

Wellyngton Luiz Rodrigues

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8689-9050>
Universidade Comunitária da Região de Chapecó, Brasil
E-mail: wellyngtonluro@gmail.com

Jéssica Dalla Cort

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0967-6280>
Universidade Comunitária da Região de Chapecó, Brasil
E-mail: dc.jessica@unochapeco.edu.br

Micheli Zanetti

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5218-7522>
Universidade Comunitária da Região de Chapecó, Brasil
E-mail: eng.miche@unochapeco.edu.br

Gustavo Lopes Colpani

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6193-4611>
Universidade Comunitária da Região de Chapecó, Brasil
E-mail: g_colpani@unochapeco.edu.br

Rubieli Carla Frezza Zeferino

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3562-322X>
Universidade Comunitária da Região de Chapecó, Brasil
E-mail: rubifrezza@unochapeco.edu.br

Resumo

A implementação de alternativas menos agressivas ao meio ambiente, pautadas no reaproveitamento de resíduos, faz-se cada vez mais necessária e é tendência de mercado. Neste contexto, o presente trabalho teve por objetivo extrair e caracterizar o óleo essencial de laranja obtido a partir de resíduos de *Citrus sinensis* 'Valencia' com vistas na maximização do rendimento de limoneno, avaliando-o frente ao seu potencial antimicrobiano e antioxidante. A extração foi realizada pelos métodos de hidrodestilação e soxhlet. A caracterização do óleo essencial foi realizada por cromatografia gasosa com detector por ionização de chama (CG-DIC) e a estrutura química do limoneno foi confirmada por espectrometria de massas (CG-EM). O efeito das variáveis na extração líquido-líquido após a hidrodestilação foi avaliada a partir de planejamento experimental, obtendo-se maior rendimento global de limoneno no óleo essencial nas condições de 90 minutos e razão volumétrica 100:10 (soluto:solvente). O óleo essencial obtido na melhor condição de processo, demonstrou ação antimicrobiana frente à *Staphylococcus aureus* e *Proteus mirabilis*, com concentrações inibitórias mínimas de 0,151 g·mL⁻¹ e 0,302 g·mL⁻¹, respectivamente, avaliadas pelo método de microdiluição em caldo. Além disso, o óleo essencial apresentou atividade antioxidante de 84,64 ± 2,35% para concentração de 93,44 µg·mL⁻¹ e IC₅₀ de 24,72 µg·mL⁻¹, avaliadas pelo método de eliminação de radicais livres de 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH). Os resultados obtidos permitem concluir que a extração do óleo essencial de laranja a partir de resíduos de *Citrus sinensis* 'Valencia' pela rota proposta é viável e que este apresenta potencial como aditivo antimicrobiano e antioxidante para futuras aplicações.

Palavras-chave: Limoneno; Óleo essencial de laranja; Hidrodestilação; Ação antimicrobiana; Atividade antioxidante.

Abstract

The implementation of less aggressive alternatives to the environment, based on the reuse of residues, is increasingly necessary, and is a market trend. In this context, the present work aimed to extract and characterize the orange essential oil obtained from residues of *Citrus sinensis* 'Valencia' with a view to maximizing the yield of limonene,

evaluating it in terms of its antimicrobial and antioxidant potential. Extraction was performed by hydrodistillation and soxhlet methods. Essential oil characterization was performed by gas chromatography with flame ionization detector (GC-FID) and the chemical structure of limonene was confirmed by mass spectrometry (GC-MS). The effect of variables on liquid-liquid extraction after hydrodistillation was evaluated from an experimental design, obtaining a higher global yield of limonene in the essential oil under conditions of 90 minutes and volumetric ratio 100:10 (solute:solvent). The essential oil obtained in the best process condition showed antimicrobial action against *Staphylococcus aureus* and *Proteus mirabilis*, with minimum inhibitory concentrations of $0.151 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ and $0.302 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectively, evaluated by the broth microdilution method. Moreover, the essential oil showed an antioxidant activity of $84.64 \pm 2.35\%$ for a concentration of $93.44 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ and an IC_{50} of $24.72 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, evaluated by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) free radical scavenging method. The results obtained allows to conclude that the extraction of orange essential oil from residues of *Citrus sinensis* 'Valencia' by the proposed route is feasible and that it has potential as an antimicrobial and antioxidant additive for future applications.

Keywords: Limonene; Orange essential oil; Hydrodistillation; Antimicrobial action; Antioxidant activity.

Resumen

La implementación de alternativas menos agresivas con medio ambiente, basadas en reutilización de residuos, es cada vez más necesaria, y tendencia del mercado. Así, el presente trabajo tuvo como objetivo extraer y caracterizar el aceite esencial de naranja obtenido a partir de residuos de *Citrus sinensis* 'Valencia' con miras a maximizar el rendimiento de limoneno, evaluándolo en cuanto a su potencial antimicrobiano y antioxidante. La extracción se realizó por hidrodestilación y soxhlet. La caracterización del aceite esencial se realizó mediante cromatografía de gases con detector de ionización de llama y la estructura química del limoneno se confirmó mediante espectrometría de masas. A partir de un diseño experimental se evaluó el efecto de las variables sobre la extracción líquido-líquido posterior a la hidrodestilación, obteniendo un mayor rendimiento global de limoneno en el aceite esencial en condiciones de 90 minutos y relación volumétrica 100:10 (soluto:solvente). El aceite esencial obtenido en las mejores condiciones de proceso mostró acción antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* y *Proteus mirabilis*, con concentraciones inhibitorias mínimas de $0,151 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ y $0,302 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectivamente, evaluadas por método de microdilución en caldo. Además, el aceite esencial mostró una actividad antioxidante de $84,64 \pm 2,35\%$ para concentración de $93,44 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ y IC_{50} de $24,72 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, evaluada por método de captación de radicales libres de 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH). Los resultados obtenidos permiten concluir que la extracción del aceite esencial de naranja de residuos de *Citrus sinensis* 'Valencia' por la vía propuesta es factible y que tiene potencial como aditivo antimicrobiano y antioxidante para futuras aplicaciones.

Palabras clave: Limoneno; Aceite esencial de naranja; Hidrodestilación; Acción antimicrobiana; Actividad antioxidante.

1. Introdução

A ascensão de um processo de crise ambiental ao longo das últimas décadas, o qual muito se deve à ação antrópica, caracteriza um cenário carente de medidas sustentáveis efetivas (Pires, Ribeiro & Machado, 2017). A implementação de processos menos agressivos ao meio ambiente, a qual passa essencialmente pela engenharia química, corrobora ao desenvolvimento de bioindústrias, atuando fundamentalmente sobre o reaproveitamento de resíduos, como abordado no Programa de Química Verde da Pfizer (Colberg et al., 2021).

Dentre os produtos que podem ser extraídos da biomassa destacam-se os óleos essenciais, amplamente aplicados na atividade industrial no âmbito farmacêutico, na produção de alimentos e cosméticos em geral. Os óleos essenciais mais estudados são os óleos essenciais de lavanda, alecrim (Maia et al., 2014), melaleuca (De Moura & Pires, 2016), eucalipto (Vitti & Brito, 2003), limão e laranja (Pires et al., 2017).

O óleo essencial de laranja pode ser extraído a partir de resíduos do processamento das frutas, cujo principal componente é o limoneno (Ferronato & Rossi, 2018), um hidrocarboneto cíclico insaturado classificado como um terpeno e que possui nomenclatura IUPAC 1-metil-4-isopropenilciclohex-1-eno (PubChem, 2022). Este, apresenta fórmula molecular $\text{C}_{10}\text{H}_{16}$ e pode ser encontrado de duas formas na natureza, visto que se trata de um isômero, o *R*-limoneno e o *S*-limoneno (Azambuja, 2021).

Dentre as principais aplicações do limoneno, destaca-se o uso como solvente, como aromatizante, como precursor na síntese da carvona, e, nos últimos anos, estudam-se possibilidades de aplicações na área da saúde, sobretudo na área farmacêutica, como princípio ativo de medicamentos voltados ao controle do colesterol no organismo, visto que este apresenta

certa inibição sobre a enzima que produz o lipídio tratado (Azambuja, 2021). Estudos na literatura também reportam que o limoneno possui ação antioxidante (Ferronato & Rossi, 2018) e atividade quimiopreventiva bem estabelecida frente a alguns tipos de cânceres (Sun, 2007; Yang et al., 2017). Além disso, conforme verificado por Zhang, Liu e Tao (2009), evidencia-se o potencial antimicrobiano intrínseco do limoneno, ainda que diluído, como verificado em testes laboratoriais preliminares envolvendo bactérias dos gêneros *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Bacillus subtilis*, o que serve de base para realização de estudos mais aprofundados. De acordo com Flores et al., (2019), tal ação antibacteriana também é constatada frente à *Salmonella typhimurium*.

Desta forma, a fim de sustentar o nicho de mercado apresentado, verifica-se a importância de uma fonte consolidada de matéria-prima, a qual é encontrada em território nacional, visto que a produção brasileira anual de laranjas corresponde a cerca de 250 milhões de caixas e espera-se que a safra de 2021/22 atinja um montante próximo de 265 milhões de caixas, o equivalente a 10,8 milhões de toneladas, das quais, cerca de 40% correspondem à variedade de interesse do trabalho em questão (Fundo de Defesa da Citricultura [FUNDECITRUS], 2021). No que se refere à produção industrial de sucos, da qual se obtêm os resíduos da laranja, matéria de interesse para extração do óleo essencial, estima-se que o Brasil seja responsável por 79% da produção mundial, de modo a produzir cerca de 3,5 milhões de toneladas de resíduos a cada ano (Associação Nacional dos Exportadores de Sucos Cítricos [CITRUS BR], 2021).

Industrialmente, as principais técnicas utilizadas na extração de óleos essenciais são a separação mecânica, através de prensagem ou raspagem da casca (Silva, Ribeiro, Borges & Blois, 2009), a extração pelo uso de solventes (Zhang et al., 2009), como o hexano, por exemplo, e a destilação por arraste a vapor (Boutekedjiret et al., 2003). Estudos relacionados ao beneficiamento do óleo essencial de laranja são escassos, especialmente no que se refere à purificação e isolamento do limoneno para posterior aplicação (Siddiqui et al., 2022). Em se tratando das extrações com solventes orgânicos reportadas na literatura, destaca-se o hexano como melhor solvente para extração do limoneno no óleo essencial de laranja, todavia mediante um baixo rendimento. O solvente reportado com melhor rendimento para obtenção do óleo essencial foi o etanol, porém com o mesmo não foi verificada a presença de limoneno (Battista et al., 2020).

Assim, dadas as propriedades do hidrocarboneto apresentado, sobretudo no que tange à potencial ação antimicrobiana positiva, bem como o apelo ambiental vinculado à alta produção de resíduos de processo na indústria de citrinos, no âmbito nacional e global e a carência de processos produtivos de larga escala, o desenvolvimento de estudos que possibilitem a implantação do processo em nível industrial é um campo a ser explorado. Neste contexto, o presente trabalho tem como objetivo extrair e caracterizar o óleo essencial de resíduos de *Citrus sinensis* 'Valencia' com vistas na maximização do rendimento de limoneno, fornecendo condições operacionais para implantação do processo a nível industrial, bem como para aplicações futuras, avaliando também o composto de interesse frente ao potencial como agente antimicrobiano.

2. Metodologia

2.1 Obtenção e pré-tratamento da biomassa

As amostras de laranja do gênero *Citrus sinensis* 'Valencia' foram coletadas, selecionadas e processadas no interior de Chapecó/SC. As cascas obtidas após o processamento foram armazenadas em refrigerador operando a 0 ± 1 °C.

As cascas foram submetidas a um processo de secagem em estufa sob diferentes temperaturas, sendo estas 40 ± 1 °C e 50 ± 1 °C, por 24 horas, a fim de avaliar qual a opção mais viável para realização da secagem, em se tratando dos parâmetros de tempo de processo e conservação da amostra de matéria-prima para o processo e mensurar a influência da temperatura de secagem das cascas na extração de óleo essencial nas duas metodologias experimentais utilizadas.

2.2 Materiais

Como matéria prima para os processos de obtenção do limoneno, foram utilizadas as cascas processadas, conforme descrito na seção 2.1.

Na hidrodestilação, água destilada foi utilizada como solvente para a extração do óleo essencial das cascas. Utilizou-se éter de petróleo (>99%, Dinâmica®) como solvente para a extração líquido-líquido, dada a afinidade química entre o limoneno e o solvente implementado, como verificado por Battista et al. (2020), além da possibilidade de recuperação e reutilização do mesmo ao fim da extração. A escolha do mesmo frente a outros solventes justifica-se pela simplificação do processo de separação do óleo essencial, relacionada à menor temperatura de ebulição do éter de petróleo. Fez-se uso de sulfato de sódio anidro (EMSURE®) para remover resquícios de água na fase orgânica.

No processo de extração via mecanismos de soxhlet fez-se uso do hexano (>98,5%, Dinâmica®) como solvente no processo de extração sólido-líquido. A escolha do hexano como solvente deu-se visto que, conforme Ozturk et al., (2019), o mesmo possui 86% de afinidade com o limoneno.

Além disso, o hexano pode ser reutilizado, mediante recuperação deste ao final do processo, atuando desta forma, também, no desenvolvimento de um projeto sustentável nos âmbitos econômico e ambiental.

Estima-se que aproximadamente 68% do hexano de processos de extração podem ser recuperados, em média. Outro aspecto interessante no uso desse solvente é a vantagem econômica, como apresenta um custo benefício melhor que grande parte dos outros solventes passíveis de utilização para o processo de extração (Ozturk et al., 2019).

No estudo da caracterização química do óleo essencial extraído, realizada através de cromatografia gasosa com detector por ionização de chama (CG-DIC) e cromatografia gasosa vinculada à espectrometria de massas (CG-EM), foi utilizado metanol (>99%, J.T. Baker®) como solvente. Para avaliação e validação dos resultados obtidos nas leituras de CG-DIC e CG-EM, adotou-se como referência um padrão, óleo essencial de laranja comercial (Duas Rodas).

Para avaliação da concentração inibitória mínima (CIM), via microdiluição em caldo, os reagentes utilizados foram: óleo essencial de laranja (obtido conforme processo descrito nas seções 2.3.1 e 2.7), Brain Heart Infusion – BHI (Merck, P.A.), cloreto de sódio (Merck, P.A.), Mueller Hinton (Merck, P.A.), Dimetilsulfóxido – DMSO (Vetec, P.A.) e cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólico – TTC (Merck). O teste em questão foi realizado utilizando-se microplacas de 96 micropoços (INLAB), com fundo em forma de U, dispostos ao longo de 8 linhas, nomeadas de “A” a “H”, e 12 colunas, numeradas de 1 a 12.

Como microrganismos, utilizou-se cepas padronizadas pela American Type Culture Collection – ATCC (Bioscan) e Newprov – NEWP, sendo estas a gram-positiva *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e as gram-negativas *Escherichia coli* (ATCC 35218), *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028), *Pseudomonas aeruginosa* (NEWP 0053) e *Proteus mirabilis* (ATCC 25933).

Para avaliação frente à atividade antioxidante foram utilizados como reagentes: óleo essencial de laranja (obtido conforme processo descrito nas seções 2.3.1 e 2.7), etanol (>99%, Dinâmica®) e solução de 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) 0,004%.

2.3 Métodos

2.3.1 Método de extração via hidrodestilação

2.3.1.1 Mecanismo da hidrodestilação

Para mensurar a quantidade de óleo essencial extraído, foram realizados ensaios em triplicata para cada temperatura de secagem, utilizando-se inicialmente, uma proporção de 250 mL de água para 40 g de cascas de laranja. As cascas de laranja foram adicionadas ao balão de três bocas de 500 mL ^(V-1) e, em seguida, 250 mL de água destilada. Acoplou-se o balão em uma manta de aquecimento ^(E-1) (QUIMIS, modelo Q321A25-315W). Em um dos orifícios do balão acoplou-se um termômetro ^(V-14)

para medir a temperatura do processo, a qual foi mantida constante em 95 °C. Em seguida aguardou-se até a mistura atingir 80 °C, momento que se deu início à marcação do tempo. Fez-se reposições de água no interior do balão através de um funil de adição ^(V-4) de acordo com o nível do volume da mistura. O aquecimento da solução no equipamento propicia o desprendimento dos compostos que constituem o óleo essencial, os quais migram das cascas para o solvente, e são posteriormente arrastados com o vapor de água pelos adaptadores de Claisen ^(V-3) e de três vias ^(V-5). O vapor contendo o óleo essencial é transportado até a entrada do condensador ^(V-6) alimentado com água corrente, fazendo o vapor migrar para a fase líquida, sendo retirado pelo tubo adaptador de saída ^(V-7). O tempo de operação do processo foi de 3 h e 30 min, sendo então o volume de condensado no destilado ^(V-8) retirado (Pires et al., 2017).

O mecanismo do processo de Hidrodestilação é representado pela Figura 1. As vidrarias e equipamentos utilizados encontram-se destacados e devidamente identificados sobre a fotografia a fim de um melhor entendimento.

Figura 1. Processo de montagem do mecanismo de hidrodestilação.



Fonte: Autores (2021).

2.3.1.2 Extração líquido-líquido do destilado

Após o processo de extração sólido-líquido, foram desenvolvidos dois estágios de extração líquido-líquido, onde, no primeiro estágio, transferiu-se o volume de destilado a um balão de fundo chato de 500 mL, em contato com um banho de gelo, sobreposto a uma chapa de rotação (QUIMIS, modelo Q261-22). Posteriormente, adicionou-se 40 mL de éter de petróleo através de uma pipeta volumétrica e uma barra magnética para submeter a solução à uma agitação constante. O banho de gelo manteve-se à temperatura de 5 °C, impedindo assim a evaporação do éter de petróleo, cuja temperatura de ebulição apresentado na ficha técnica é de 30 °C (Êxodo Científica, 2022).

Após 90 min de agitação transferiu-se a solução para um funil de separação de 500 mL onde a mesma permaneceu em repouso por 10 min. Então, com a distinção de fases, em decorrência da diferença de densidades, fez-se possível a separação das fases aquosa e orgânica. Na parte inferior, fase aquosa da solução, tem-se o denominado de *Rafinado 1*, e a fase superior apresenta o denominado *Extrato 1*. Armazenou-se o *Extrato 1* em um frasco fechado para impedir a sua volatilização, e

submeteu-se o *Rafinado 1* a mais um estágio de extração empregando-se novamente 40 mL de éter de petróleo, deixando o sistema sob agitação por 60 minutos, em processo análogo ao primeiro estágio de extração líquido-líquido, originando assim o *Rafinado 2* e o *Extrato 2*. Descartou-se o *Rafinado 2* de composição majoritariamente aquosa e misturou-se os *Extratos 1 e 2* (compostos de solvente e óleo essencial) (Pires et al., 2017).

2.3.1.3 Obtenção do óleo essencial - hidrodestilação

Transferiu-se a mistura dos extratos para um béquer de 100 mL, no qual adicionou-se 10 g de sulfato anidro para retirar qualquer resíduo de água restante. Utilizando kitassato de 300 mL e bomba de vácuo (Fisaton Brasil, Modelo 824), filtrou-se a solução. Pesou-se a massa da solução de éter de petróleo com óleo essencial da laranja em um balão de 100 mL. Acoplou-se o balão a um rotaevaporador (Tecnal, Modelo TE-211), mantido sob temperatura constante de 30 ± 1 °C e vinculado à uma bomba de vácuo (Fisaton Brasil, Modelo 824). Dada a conhecida temperatura de ebulição do éter de petróleo, alimentou-se o condensador do rotaevaporador com água resfriada em banho termostático (QUIMS, Modelo: Novembro 05) a 5 °C. Após a evaporação, pesou-se a massa de óleo essencial no balão.

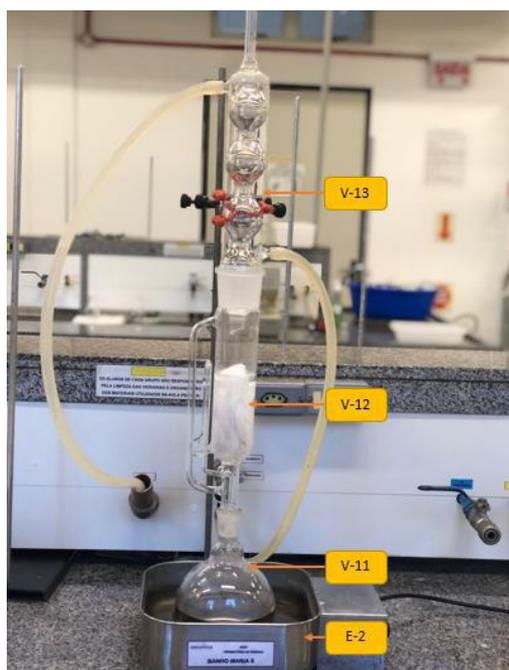
2.3.2 Extração com solvente por soxhlet

2.3.2.1 Mecanismo de soxhlet

Pesou-se 50 g de cascas de laranja e transferiu-se as mesmas a um papel filtro, produzindo uma espécie de sachê. O papel filtro foi devidamente acoplado no extrator de Soxhlet^(V-12). Alimentou-se o balão de fundo chato de 500 mL^(V-11) com volume de 300 mL de hexano e acoplou-se este ao extrator. O balão foi colocado no equipamento de banho maria^(E-2) (QUIMS, Modelo: 218-2) de forma que o nível do solvente dentro do balão fosse equivalente ao nível de água do banho e o tempo de operação iniciou-se quando o banho atingiu 70 °C. O tempo de operação do processo para o experimento foi de 3 h de extração (União Internacional de Química Pura e Aplicada [IUPAC], 1979).

O mecanismo de operação de extração com solvente é representado de acordo com a Figura 2.

Figura 2. Processo de montagem do mecanismo de soxhlet.



Fonte: Autores (2021).

2.3.2.2 Obtenção do extrato - soxhlet

Transferiu-se todo o solvente do processo para um balão de fundo redondo de 500 mL. Pesou-se a massa da solução e em seguida acoplou-se o balão ao rotaevaporador (Tecnal, modelo TE-211), programado com a temperatura de banho a 50 ± 1 °C e com o sistema de vácuo ligado. Alimentou-se o condensador do rotaevaporador com água resfriada em um banho termostático (QUIMS, Modelo: 218-2) a 5 °C. Após a evaporação, pesou-se a massa de óleo essencial no balão de 500 mL.

2.4 Caracterização química

A Cromatografia Gasosa com Detector por Ionização de Chama (CG-DIC) foi utilizada para caracterização química do extrato (óleo essencial). Para análise de CG-DIC, as amostras foram purificadas conforme procedimento descrito na seção *Obtenção do óleo essencial - hidrodestilação* (seção 2.3.1.3). As leituras foram realizadas no equipamento GC System 7890B (Agilent Technologies) utilizando-se metanol (>99%, J.T. Baker®) como solvente. A diluição do óleo essencial no solvente foi feita com 10 µL da amostra para 1 mL de metanol. No procedimento em questão adotou-se um programa de temperatura entre 80 °C e 240 °C, com taxas de aquecimento de 7 °C·min⁻¹ até 180 °C e 50 °C·min⁻¹ até 240 °C e vazão de hélio na coluna (Agilent CP7488 – 50m x 240 µm x 0,2 µm) equivalente a 0,5 mL·min⁻¹. O detector encontrava-se a 300 °C, sob fluxo de ar de 450 mL·min⁻¹ e H₂ (Hidrogênio – Combustível do Detector) de 50 mL·min⁻¹.

As áreas dos picos verificados nas leituras de CG-DIC para as amostras foram quantificadas, de forma a obter-se o percentual de limoneno em cada uma, permitindo assim, o cálculo do rendimento global de limoneno no processo. Os picos foram comparados com relação ao padrão, o óleo essencial de laranja comercial (Duas Rodas).

Posteriormente, para validação da análise descrita, realizou-se também Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM), no equipamento CG/MSD System 5977A (Agilent Technologies), em coluna Agilent 19091S-433 (30m x 250 µm x 0,25 µm), sob fluxo de Hélio de 1,2 mL·min⁻¹, adotando-se diluição de 10 µL de amostra para 5 mL de metanol, com o mesmo programa de temperatura aplicado na CG-DIC, a fim de confirmar os resultados obtidos quanto à caracterização da amostra. A confirmação da estrutura química do limoneno deu-se através de comparativo com a Biblioteca Nist.

2.5 Cálculo do rendimento do extrato

O rendimento pode ser calculado com base na massa de cascas de laranja utilizada e a massa de óleo essencial extraído, sendo representado pela Equação 1.

$$\text{Rendimento (\%)} = \frac{\text{Massa de óleo extraído}}{\text{Massa de cascas utilizada}} * 100 \quad (1)$$

2.6 Cálculo do rendimento do limoneno

Tal rendimento pode ser calculado a partir da massa de cascas de laranja utilizada, a massa de óleo essencial extraído e a fração de limoneno verificada na amostra de extrato, obtida via caracterização cromatográfica, conforme pela Equação 2.

$$\text{Rendimento (\%)} = \frac{\text{Massa de óleo extraído} + \text{Fração de Limoneno Medida}}{\text{Massa de cascas utilizada}} * 100 \quad (2)$$

2.7 Efeito das variáveis na extração líquido-líquido

A fim de otimizar a etapa de extração líquido-líquido desenvolvida em acordo ao método de hidrodestilação, visando redução no tempo de processo, bem como menor demanda de solvente pelo processo de recuperação do óleo essencial no extrato obtido na extração sólido-líquido em fase aquosa, justifica-se a implementação de um delineamento experimental.

A técnica de planejamento experimental foi utilizada a fim de avaliar os efeitos das variáveis operacionais do processo de hidrodestilação, no que se refere às condições da etapa *Extração Líquido-Líquido do Destilado* (Proporção Destilado/Solvente e Tempo de Extração Líquido-Líquido), de forma a determinar qual a condição ideal para extração do óleo essencial, com foco na maximização da obtenção de limoneno.

Desenvolveu-se um planejamento experimental 2^2 com triplicata no ponto central e quatro pontos axiais (11 ensaios). A proporção de solvente orgânico em relação ao destilado variou entre 5,9:100 e 34,1:100. O tempo de cada uma das duas etapas de Extração Líquido-Líquido (ELL) foi avaliado entre 17,7 min e 102,3 min. A obtenção do destilado utilizado na ELL deu-se de maneira análoga ao processo descrito na seção *Mecanismo de Hidrodestilação* e a separação do óleo essencial foi realizado conforme indicado na etapa *Obtenção do óleo essencial - hidrodestilação*.

Finalizado o processo de obtenção do óleo essencial, o mesmo foi diluído em metanol e avaliado via CG-DIC conforme procedimento apresentado em *Caracterização Química do Extrato*. Tal procedimento descrito foi aplicado às 11 amostras do planejamento experimental. A relação obtida entre as condições, cujas variações foram avaliadas quanto à influência sobre o rendimento do processo e os resultados alcançados para cada ensaio, encontra-se expressa na Tabela 3.

Os dados experimentais foram tratados estatisticamente utilizando-se o software Statística® (Statsoft Inc, EUA).

2.8 Avaliação da atividade antibacteriana

Para avaliar a atividade antibacteriana do extrato do óleo essencial de laranja, foi utilizado o ensaio de microdiluição em caldo, de acordo com o procedimento descrito pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), documento M07-A11: Métodos para testes de sensibilidade aos antimicrobianos por diluição para bactérias de crescimento aeróbico (Clinical and Laboratory Standards Institute [CLSI], 2018), com adaptações.

Como culturas de avaliação foram utilizadas as espécies *E. coli* (ATCC 35218), *S. aureus* (ATCC 25923), *S. typhimurium* (ATCC 14028), *P. aeruginosa* (NEWP 0053) e *P. mirabilis* (ATCC 25933).

2.8.1 Preparo do inóculo e da suspensão bacteriana

As cepas de bactérias liofilizadas, as quais encontravam-se inicialmente na forma de pellets, foram hidratadas em caldo BHI e incubadas em estufa bacteriológica (Quimis, Q316m5) por 24 h a 36 ± 1 °C. Posteriormente, realizou-se a homogeneização em agitador vortex (Quimis, q220) durante 15 segundos e o preparo do inóculo para cada um dos microrganismos foi realizado em tubos de ensaio estéreis, com uma alíquota da suspensão bacteriana, cultivada em 3 mL de caldo BHI. Tal inóculo foi incubado em estufa bacteriológica (Quimis, Q316m5) a 36 ± 1 °C por 24 h (CLSI, 2018).

Em seguida, o ágar Mueller Hinton, na temperatura de 45 °C, foi adicionado em placas de Petri (90 mm × 15 mm) e aguardou-se sua solidificação em temperatura ambiente. Com o auxílio de uma alça, foram retiradas alíquotas das suspensões bacterianas e estas foram espalhadas sobre a superfície do ágar, de forma a cultivar cada microrganismo em uma placa específica. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica (Quimis, Q316m5) a 36 ± 1 °C durante 24 h. Foram retiradas das placas algumas colônias bacterianas, as quais foram imersas em 4 mL de solução salina estéril (NaCl, 0,9%). O ajuste da turbidez do meio foi realizado utilizando-se um espectrofotômetro UV-Vis (Shimadzu, 1900), medindo-se a absorvância para o comprimento de onda de 619 nm, até a obtenção da concentração de 10^8 UFC·mL⁻¹ (absorvância entre 0,08 e 0,10) (CLSI, 2018).

2.8.2 Ensaio de microdiluição em caldo para determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

O ensaio de microdiluição em caldo foi utilizado para avaliar a ação antibacteriana do extrato do óleo essencial de laranja, bem como para determinar a concentração inibitória mínima (CIM). Utilizou-se microplacas estéreis, de 96 cavidades, nas quais foram adicionados 100 µL de caldo BHI (CLSI, 2018). Os testes foram realizados em triplicata para cada microrganismo, caracterizada pelo uso de três cavidades na mesma linha em três colunas diferentes, sendo estas as colunas 1, 2 e 3, identificadas como “O”.

Foram produzidas soluções aquosas contendo solução de dimetilsulfóxido (DMSO) a 10%, em tubos de ensaio, onde adicionou-se o óleo essencial extraído, a fim de obter a concentração inicial de óleo essencial desejada. Em seguida, realizou-se a homogeneização do conteúdo destes, com o auxílio de agitadores de tubos Vortex. Após a homogeneização, alíquotas de 100 µL da solução resultante foram transferidas sucessivamente para as microplacas, de modo a obter soluções para cultivo bacteriano com diferentes concentrações de óleo essencial em cada linha das microplacas, conforme apresentado na Tabela 1. Posteriormente, adicionou-se 5 µL de inóculos bacterianos preparados com a concentração de 10^8 UFC·mL⁻¹ (CLSI, 2018).

Tabela 1. Concentrações de óleo essencial de laranja testadas em cada linha das microplacas nas análises de microdiluição em caldo frente à *E. coli*, *S. aureus*, *S. typhimurium*, *P. aeruginosa* e *P. mirabilis*.

| Linha na Microplaca | Concentrações de Óleo Essencial Testadas (g·mL ⁻¹) |
|---------------------|--|
| A | 0,3019 |
| B | 0,1509 |
| C | 0,0755 |
| D | 0,0377 |
| E | 0,0189 |
| F | 0,0094 |
| G | 0,0047 |
| H | 0,0024 |

Fonte: Autores (2022).

As soluções de controle foram identificadas como Controle Positivo (+), Controle Negativo (-) e Branco (B) e dispostas nas microplacas de maneira padronizada, nas colunas 9, 10 e 12, respectivamente. Cavidades da coluna identificada pelo controle “+” contêm somente caldo *Brain Heart Infusion* (BHI) e microrganismo e servem para comprovar a atividade do microrganismo utilizado, de forma que o mesmo deve apresentar seu desenvolvimento nestas condições; soluções identificadas por “-” contêm BHI, a solução de dimetilsulfóxido 10% e o inóculo da suspensão bacteriana, atuando de forma a garantir que tal solução não inibe o crescimento da cepa testada, sendo tal ação vinculada apenas ao composto de interesse; nas cavidades da coluna definida por “B” há somente o caldo BHI, com o objetivo de verificar a esterilidade da placa (CLSI, 2018).

As microplacas foram incubadas em estufa microbiológica em temperatura controlada de 36 ± 1 °C durante 24 h. Após incubação, foi adicionado à cada cavidade um total de 20 µL de solução aquosa de 0,5% de Cloreto de Trifenil Tetrazólio (TTC); e, novamente, as microplacas foram incubadas, por mais 3 h, para posterior leitura e análise quanto ao desenvolvimento ou não de microrganismos, de forma a determinar a concentração inibitória mínima para o óleo essencial de laranja frente a

determinado microrganismo. A realização da leitura da CIM se dá através da ocorrência ou não de alteração na coloração da solução na cavidade após a incubação mediante a presença do TTC, de forma a constatar-se, caso tal alteração de cor ocorra e a amostra passe a apresentar tonalidade avermelhada, que a concentração do extrato foi insuficiente para inibir o crescimento do microrganismo testado. Caso não seja observada qualquer alteração na coloração para determinada concentração, infere-se que a mesma é suficiente para o controle do crescimento da bactéria, sendo a menor concentração inibitória verificada nos testes identificada como mínima concentração inibitória (CLSI, 2018).

2.9 Avaliação da atividade antioxidante

A determinação da atividade antioxidante deu-se por meio da avaliação da redução do radical DPPH, utilizando-se espectrofotômetro UV-Vis (Biochrom, Libra S22), em acordo à metodologia desenvolvida por Brand-Williams, Cuvelier e Berset (1995), com algumas adaptações.

Foram preparadas, a partir de uma amostra do óleo essencial obtido via hidrodestilação nas condições de processo vinculadas ao “Ponto Ótimo” determinado através do delineamento experimental, soluções nas concentrações de 111,11 $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$, 55,56 $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$, 27,78 $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$, 13,89 $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$, 6,94 $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ e 3,47 $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$.

Adicionou-se em cada uma das cubetas 1 mL de etanol (>99%, Dinâmica®), 2 mL de solução de DPPH 0,004% e 1 mL de amostra da solução de óleo essencial, elaborando-se 6 soluções ao todo, referentes à cada uma das concentrações testadas. Elaborou-se também uma solução de controle, a qual contém apenas 1 mL de etanol e 2 mL da solução de DPPH 0,004%. Destacou-se ainda uma solução definida como Branco, a qual não possui DPPH.

Transcorridos 30 minutos após a adição da amostra de óleo essencial na solução de etanol e DPPH, foi realizada a leitura da absorbância a 517 nm em espectrofotômetro UV-Vis. O desenvolvimento da análise deu-se em triplicata.

A partir das absorbâncias medidas foi possível calcular a atividade antioxidante (%AA) por meio das Equações 3 e 4.

$$\%AA = 100 - \left(\frac{\text{Absorbância Amostra} - \text{Absorbância Branco}}{\text{Absorbância Controle}} * 100 \right) \quad (3)$$

Por meio da utilização do software Origin® 2018 (OriginLab, USA) determinou-se a concentração necessária para inibir 50% dos radicais livres DPPH (IC_{50}), utilizando-se a Equação 4, a qual foi obtida a partir da curva padrão vinculada à ação antioxidante do composto e sua concentração, elaborada tomando-se por base as absorbâncias medidas.

$$\%AA = 0,4856 * \text{Concentração Óleo Essencial} + 35,729 \quad (4)$$

3. Resultados e Discussão

3.1 Obtenção do óleo essencial

A partir da realização dos métodos de hidrodestilação e extração via soxhlet, em laboratório, mediante a metodologia apresentada, foram obtidos os seguintes rendimentos para extração do óleo essencial da casca da laranja, conforme a Tabela 2.

As denominações dos ensaios realizados correspondem às diferentes temperaturas de secagem da matéria-prima, sendo os Ensaios 1 e 2 vinculados às cascas secas nas temperaturas de 40 °C e 50 °C, respectivamente.

Tabela 2. Rendimentos (%) do extrato para o processo utilizando cascas secas nas temperaturas de 40 °C (ensaio 1) e 50 °C (ensaio 2)

| Método Utilizado | Rendimento via Ensaio 1 (%) | Rendimento via Ensaio 2 (%) |
|------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| | Hidrodestilação | 1,349 ± 0,001 |
| Soxhlet | 1,563 ± 0,001 | 1,623 ± 0,001 |

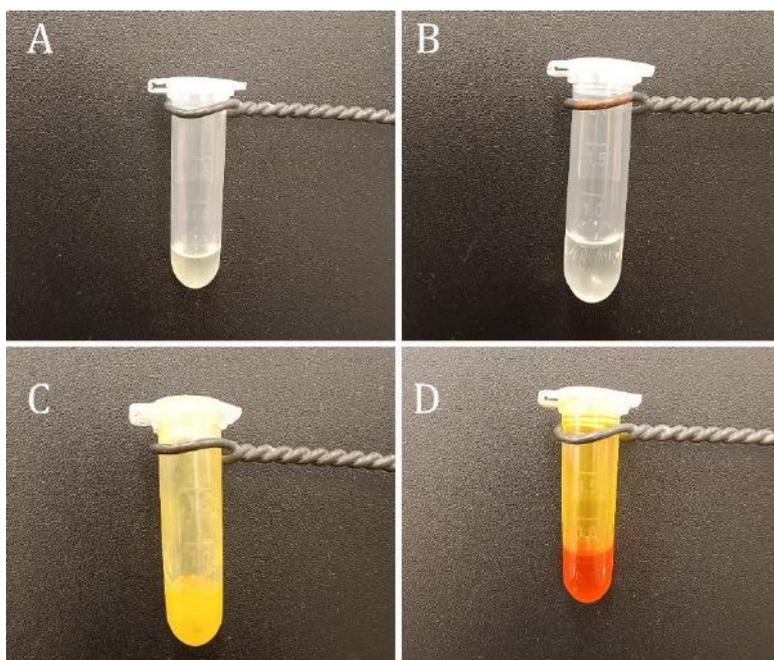
Fonte: Autores (2022).

Observa-se que, para o método de hidrodestilação, os rendimentos médios obtidos, em termos mássicos, variam entre 1,35% e 1,5%, apresentando maior eficiência de processo para as extrações do Ensaio 2. Tais resultados preliminares apontam uma diferença considerável entre os rendimentos obtidos para as extrações de cascas secas em 50 °C frente à outra condição de temperatura testada, de forma que esta torna-se, a princípio, a melhor condição de trabalho para se dar continuidade. No que tange à literatura, segundo Bizzo et al., (2009), o rendimento máximo esperado para tal processo de extração de óleo essencial de cítricos é de 0,4%, de forma que os resultados obtidos superam o esperado ao consultar-se a bibliografia.

No que tange às extrações via soxhlet verifica-se que o melhor rendimento para obtenção do extrato foi obtido a partir do uso das cascas secas a 50 °C. A presença de coloração forte nas amostras extraídas via soxhlet, conforme observa-se na Figura 3, indica a presença de outros compostos além daqueles também verificados no óleo essencial obtido via hidrodestilação, os quais estão sendo arrastados pelo solvente utilizado, dado que o hexano possui grande afinidade com substâncias orgânicas presentes em alimentos em geral, como o betacaroteno (Nellis et al., 2017).

As amostras de extrato obtidas através de cada um dos métodos encontram-se apresentadas conforme a Figura 3.

Figura 3. Ilustração comparativa entre os óleos essenciais obtidos por hidrodestilação (A e B) e os extratos obtidos por soxhlet (C e D) para os ensaios 1 e 2 – cascas secas a 40 °C e 50 °C, respectivamente.



Fonte: Autores (2022).

Conforme Battista et al., (2020), o rendimento médio para extrações com outros solventes, como o etanol e a acetona, por exemplo, pode ser cerca de 10 vezes maior que o rendimento quando se utiliza o hexano, todavia, mediante realização de análise de ressonância magnética nuclear (RMN), os autores verificaram a ausência ou carência de limoneno no óleo essencial extraído, o que não ocorre nas amostras extraídas com hexano, onde a presença do terpeno é comprovada. O rendimento para extrações com hexano está de acordo com a literatura, a qual corresponde a cerca de 1,31%, de forma que os rendimentos das extrações realizadas nos testes preliminares são levemente superiores ao esperado.

Comparando-se os diferentes métodos de extração, verifica-se rendimento superior de extrato no método soxhlet, utilizando o hexano como solvente orgânico, frente à hidrodestilação, o que se deve à maior afinidade entre o solvente orgânico e o composto alvo do processo. No que se refere às características organolépticas das amostras, o cenário é favorável àquelas obtidas via hidrodestilação (Ozturk et al., 2019).

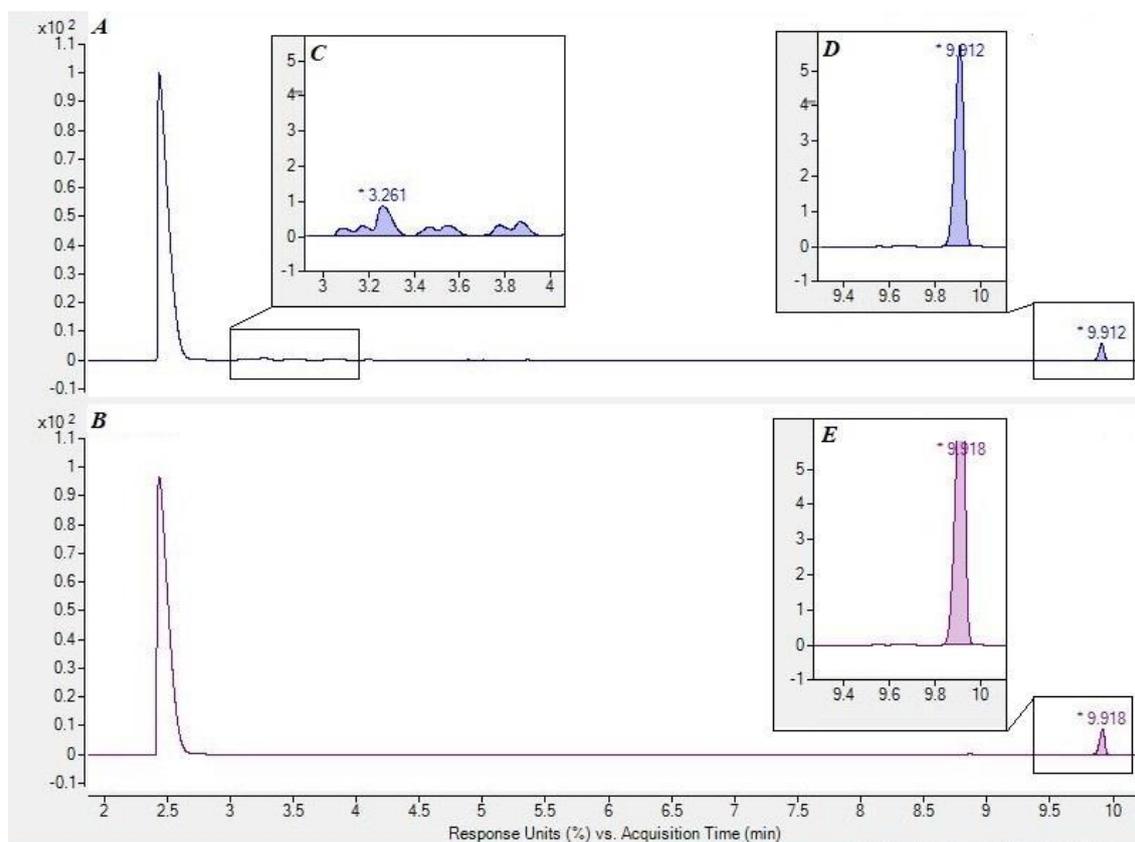
3.2 Caracterização química do extrato

Os resultados obtidos para análise de CG-DIC (Figura 4), indicam a presença de terpenos na amostra caracterizada, sendo o limoneno o composto majoritário, conforme confirmação via CG-EM.

A comparação entre os métodos avaliados deu-se não somente pela avaliação dos rendimentos de óleo essencial, mas também pelas características das amostras obtidas e a caracterização química verificada na cromatografia para cada uma destas, optando-se então por adotar o método de hidrodestilação como mais adequado, e tomando-o por base para o desenvolvimento do planejamento experimental.

Os resultados da caracterização em questão estão apresentados na Figura 4, nas quais comparam-se as leituras do extrato avaliado e do óleo essencial de laranja comercial padrão utilizado no equipamento.

Figura 4. Cromatograma de CG–DIC para amostra de óleo essencial obtido via hidrodestilação utilizando-se cascas secas a 50 °C (A) comparado ao óleo essencial de laranja comercial padrão (B), destacando-se os picos para o limoneno em ambos (D e E, respectivamente) e demais compostos verificados (C).



Fonte: Autores (2022).

Os picos relacionados ao tempo de retenção de 2,5 min, apresentados nas Figuras 4A e 4B, correspondem ao comportamento do solvente utilizado para análise, de forma que, para melhor visualização dos demais picos presentes no cromatograma, estes foram destacados nas Figuras 4C, 4D e 4E.

Verifica-se, na amostra de óleo essencial caracterizada, a qual corresponde ao Ensaio 2 de hidrodestilação, a presença de algumas substâncias além do composto de interesse, sendo estas, pineno e canfeno (Sigma Aldrich, 2022), evidenciadas pelos picos indicados no tempo de retenção entre 3 e 4 min (Figura 4C), reduzindo-se assim a pureza de limoneno no óleo essencial; destaca-se o pico observado no tempo de retenção de 9,912 min (Figura 4D), o qual está vinculado ao limoneno e assemelha-se ao obtido mediante análise do óleo essencial de laranja comercial (Figura 4E). Cabe ressaltar que a estrutura química do limoneno na amostra também foi confirmada via CG-EM através de comparativo com a Biblioteca Nist.

A porcentagem mássica de limoneno na amostra caracterizada encontram-se evidenciada na Tabela 3.

Tabela 3. Tempo de retenção e percentual mássico de limoneno no óleo essencial obtido via hidrodestilação utilizando amostras secas a 50 °C (ensaio 2) verificados pela CG-DIC,

| Composição | Tempo de Retenção (min) | Percentual Verificado na Amostra (%) |
|-------------------|------------------------------------|---|
| Limoneno | 9,91 | 57,55 |
| Outros Compostos | 3 a 4 | 42,55 |

Fonte: Autores (2022).

Na amostra analisada, a área referente ao terpeno (9,91 min) corresponde a 57,55%, o equivalente a 0,405 g, de forma à extração apresentar um rendimento global de 1,011% para o composto de interesse, valor relativamente alto em comparação ao indicado por Barros (1986), o qual corresponde a 0,4%, sobretudo levando-se em consideração a elevada volatilidade do composto e as possíveis contaminações presentes, oriundas de resíduos que podem ter se depositado no óleo essencial ao longo do processo de extração e separação do mesmo. O rendimento obtido é semelhante ao verificado por Battista et al. (2020), para extrações Soxhlet utilizando-se hexano, nas quais o rendimento global para o limoneno é de 1,18%.

3.3 Efeito das variáveis na extração líquido-líquido

Os rendimentos obtidos para cada ensaio do planejamento experimental, encontram-se expressos na Tabela 4, sendo possível, desta forma, correlacionar cada uma das condições cujas variações foram avaliadas à obtenção de óleo essencial e pureza do limoneno na amostra de extrato; faz-se possível, ainda, estabelecer relação das interações entre as condições de procedimento, de forma a identificar influências positivas ou negativas vinculadas à associação de determinados parâmetros de processo.

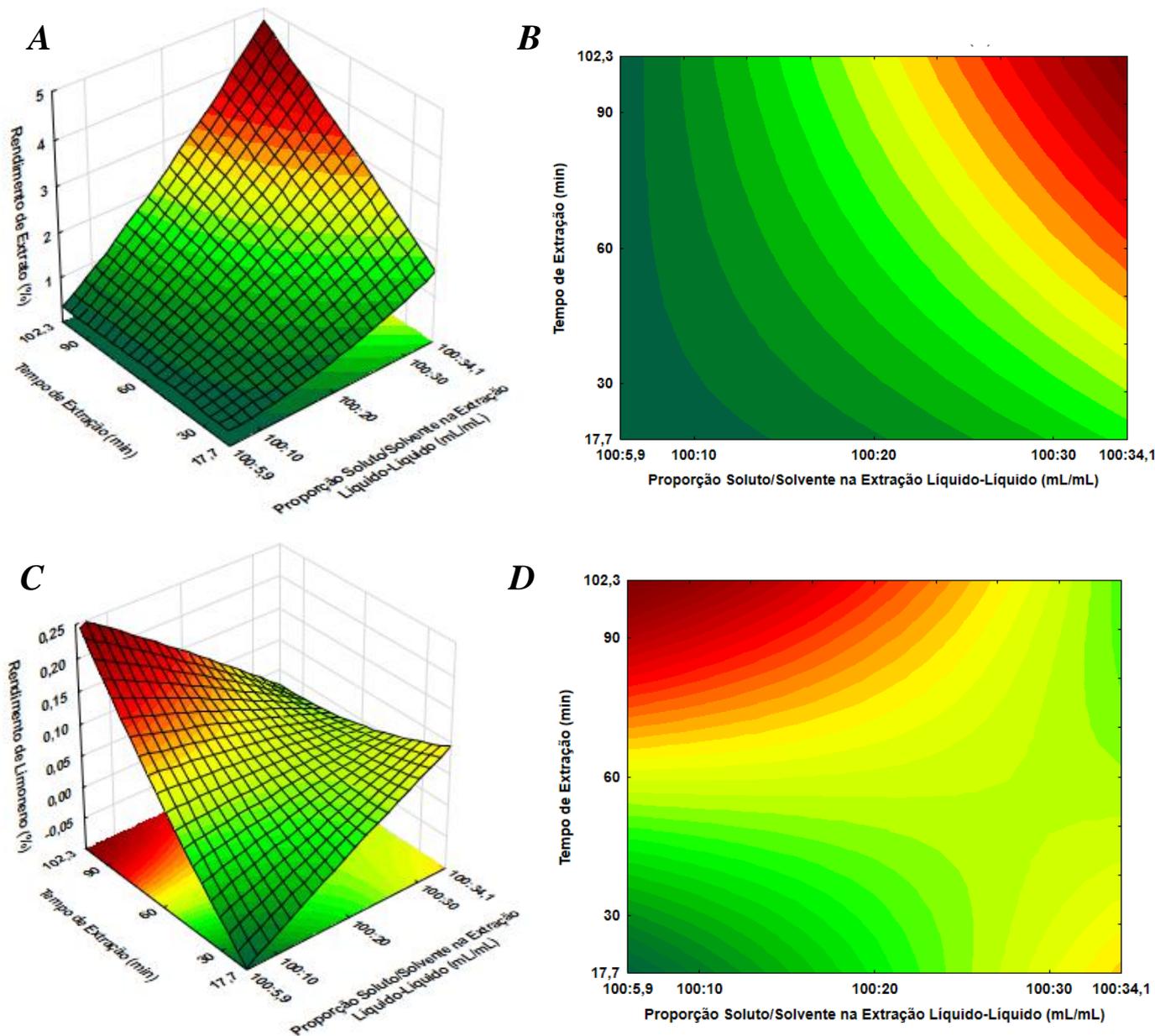
Tabela 4. Matriz do delineamento experimental (valores reais e codificados) com a resposta em termos de rendimento global de óleo essencial e limoneno para o método de hidrodestilação utilizando-se cascas secas a 50 °C.

| Ensaio | Proporção Extrações | | Tempo Extrações LL (min) | Rendimento | Rendimento |
|--------|--|--|-----------------------------|-----------------------|-----------------|
| | Líquido-Líquido (mL·mL ⁻¹) | | | Óleo Essencial (%) | Limoneno (%) |
| 1 | -1 (100/10) | | -1 (30') | 0,1798 | 0,0013 |
| 2 | +1 (100/30) | | -1 (30') | 1,5503 | 0,0315 |
| 3 | -1 (100/10) | | +1 (90') | 1,1248 | 0,2160 |
| 4 | +1 (100/30) | | +1 (90') | 4,0729 | 0,0314 |
| 5 | 0 (100/20) | | 0 (60') | 1,1563 | 0,0431 |
| 6 | 0 (100/20) | | 0 (60') | 1,3996 | 0,0522 |
| 7 | 0 (100/20) | | 0 (60') | 2,0579 | 0,0768 |
| 8 | -1,41 (100/5,9) | | 0 (60') | 0,3989 | 0,0154 |
| 9 | +1,41 (100/34,1) | | 0 (60') | 2,9820 | 0,0793 |
| 10 | 0 (100/20) | | +1,41 (102'18'') | 1,7560 | 0,1378 |
| 11 | 0 (100/20) | | -1,41 (17'42'') | 1,0545 | 0,0000 |

Fonte: Autores (2022).

Tomando-se por base os resultados expressos na Tabela 4, e utilizando-se o software Statistica® (Statsoft Inc, EUA), foi realizada a análise estatística do planejamento experimental, por meio de análise de variância (ANOVA) adotando-se nível de confiança de 95% ($p < 0,05$), análise de regressão, plotagem de superfície de resposta e superfície de contorno. Os modelos obtidos foram validados pelo teste-F. Assim, fez-se possível a identificação do ponto ótimo para otimização da extração, conforme ilustrado na Figura 5.

Figura 5. Superfície de resposta e curva de contorno obtidas em relação à interação entre tempo de extração e proporção soluto/solvente na ELL para o rendimento de extrato (A e B, respectivamente) e de limoneno (C e D, respectivamente)



Fonte: Autores (2022).

Obteve-se para análise estatística relacionada ao rendimento do óleo essencial um coeficiente de determinação (R^2) de 0,9; para o estudo do rendimento quanto ao limoneno obtido no processo de extração, já considerando-se o real percentual do terpeno verificado no óleo essencial, o coeficiente de determinação obtido possui valor 0,8; assim, asseguram-se as análises posteriores vinculadas ao estudo estatístico do planejamento experimental.

Verifica-se, a partir das Figuras 5A e 5B, a interação positiva vinculada a associação de um maior tempo de cada uma das duas etapas da ELL e o aumento da proporção de solvente frente ao soluto na mesma etapa do processo de extração do óleo essencial; a influência positiva entre as variáveis indica que, aumentando-se o tempo e a proporção de solvente orgânico, maximiza-se a quantidade de óleo essencial obtido, aumentando o rendimento da extração. Tal comportamento era esperado, visto que, havendo um maior tempo de contato entre o solvente e o produto de interesse, e aumentando-se a proporção de

solvente em relação ao volume total da solução, considerando-se ainda a interação química entre estes, simplifica-se o contato entre as moléculas, aumentando o número de contatos efetivos que permitam ao óleo essencial migrar da fase aquosa para fase orgânica (Battista et al., 2020).

Todavia, apesar de verificar-se que o aumento da proporção de solvente e a adoção de maiores tempos de ELL estão diretamente vinculadas ao aumento do rendimento obtido para extração do óleo essencial, a maximização destas variáveis não é totalmente viável, ao considerar-se que implica em processos mais longos e custosos, dado um maior tempo de operação e consumo de solvente.

Constata-se ainda, por meio das Figuras 5C e 5D, que Extrações Líquido-Líquido de menor duração, não permitem interações suficientes para transferência efetiva do limoneno para o éter de petróleo, de forma que maiores tempos de processo são indicados. No que se refere à proporção solvente:soluto, pondera-se que, dentro dos intervalos testados, volumes maiores de solvente não são indicados, arrastando da fase aquosa inúmeros compostos além do limoneno, reduzindo assim a concentração do mesmo no óleo essencial (Nellis et al., 2017).

Desta forma, no que se refere à otimização do rendimento de limoneno na amostra de óleo essencial obtida no processo, conforme indicado na Figura 6 e na Tabela 4, é preferível a realização de ELLs sob as condições de uma baixa proporção de solvente relacionada à uma maior duração de cada etapa de extração.

Analisando a curva de contorno obtida para o limoneno, ilustrada na Figura 6B, observa-se que variação no rendimento global para hidrodestilação é pequena entre os tempos de 90 e 102,3 minutos, justificando-se assim a escolha do menor tempo (Condição +1), objetivando-se maior viabilidade de processo.

Assim, correlacionando as informações obtidas frente aos rendimentos do óleo essencial e do limoneno, sob as diferentes condições do delineamento experimental, apresentadas nas superfícies de resposta das Figuras 5A e 5C, adotou-se o Ensaio 3 como “Ponto Ótimo” para obtenção do limoneno.

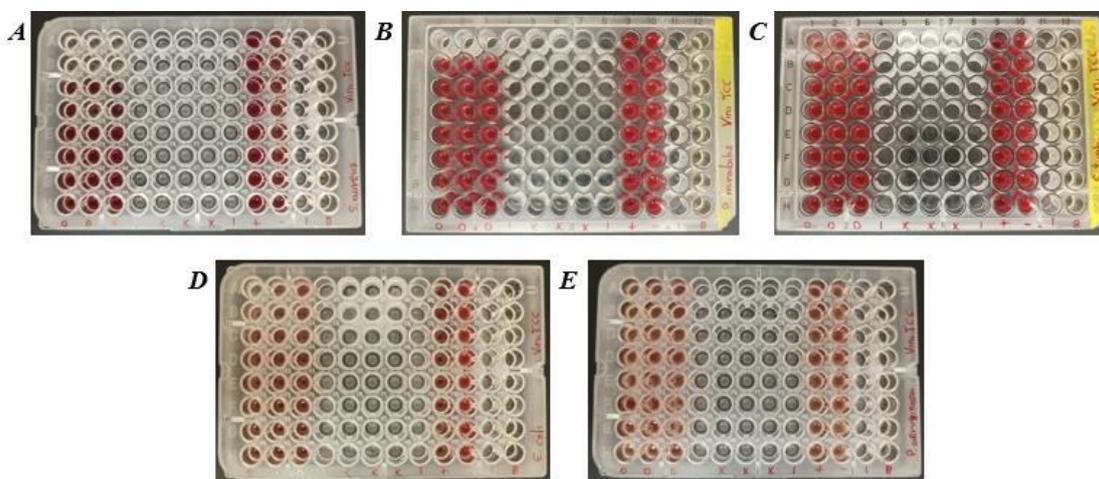
Visualizando-se a Tabela 4 é possível verificar que, apesar de um rendimento relativamente baixo em relação a outros ensaios, o Ensaio 3 apresentou rendimento superior ao indicado na literatura, o qual corresponde a 0,4% (Bizzo, Hovell & Rezende, 2009). Em relação ao limoneno, em específico, tem-se, no ensaio tratado, rendimento superior aos demais ensaios realizados no delineamento experimental.

Observa-se que, pelo Ensaio 3, atingiu-se rendimento inferior, no que tange à quantidade de óleo essencial extraída, bem como menor pureza de limoneno no mesmo, frente ao teste preliminar, na condição de extração na qual o método empregado foi a hidrodestilação, utilizando-se as cascas secas a 50 °C. Todavia, embora tenham sido verificados melhores rendimentos para as extrações do teste preliminar, a escolha do Ensaio 3 do planejamento experimental é preferível, como melhor condição para extração, dado que, menor volume de solvente é utilizado no procedimento.

3.4 Determinação da concentração inibitória mínima (MIC)

Os resultados das Concentrações Inibitórias Mínimas para o óleo essencial obtido nas condições de “Ponto Ótimo” estão apresentados abaixo, conforme a Figura 6 e a Tabela 5.

Figura 6. Ilustração dos resultados das análises de microdiluição em caldo com inóculo de 10^8 UFC·mL⁻¹ para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de óleo essencial frente a (A) *S. aureus*, (B) *P. mirabilis*, (C) *S. typhimurium* (D) *E. coli* e (E) *P. aeruginosa*.



Fonte: Autores (2022).

Tabela 5. Concentração inibitória mínima de óleo essencial obtida pela técnica de microdiluição em caldo com inóculo de 10^8 UFC·mL⁻¹ de óleo essencial frente às bactérias *S. aureus*, *P. mirabilis*, *S. typhimurium*, *E. coli* e *P. aeruginosa*

| Microrganismo | Concentração Inibitória Mínima (g·mL ⁻¹) |
|-------------------------------|--|
| <i>Staphylococcus aureus</i> | 0,1509 |
| <i>Proteus mirabilis</i> | 0,3019 |
| <i>Salmonella typhimurium</i> | > 0,3019 * |
| <i>Escherichia coli</i> | > 0,3019 * |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | > 0,3019 * |

* Não houve inibição das bactérias *E. coli*, *S. typhimurium* e *P. aeruginosa* na maior concentração testada indicada nas imagens da Figura 6. Fonte: Autores (2022).

Para interpretação dos resultados de CIM sabe-se que, em poços onde houve o crescimento do microrganismo testado, verifica-se a coloração vermelha, relacionada à interação entre o TTC e a bactéria ativa no BHI. Em poços onde a concentração de óleo essencial foi suficiente para inibir o desenvolvimento do microrganismo não ocorre a mudança de coloração. As indicações pelo TTC nas colunas “+” e “-” (colunas 9 e 10, respectivamente) asseguram a atividade do microrganismo, bem como garantem que o composto responsável pela atividade antimicrobiana não é o DMSO. A ausência de coloração na coluna “B” (coluna 12) confirma a esterilidade da placa, de forma que não houve contaminações externas na análise.

Conforme apresentado na Figura 6A, e na Tabela 5, infere-se que houve inibição para a gram-positiva *S. aureus* nos poços das linhas A e B, sendo de 0,1509 g·mL⁻¹ a concentração mínima inibitória na amostra, o equivalente à concentração de limoneno de 0,0289 g·mL⁻¹, a qual é consideravelmente superior à verificada por Zhang et. al. (2009) (0,0030 g·mL⁻¹), o que se deve à menor porcentagem de limoneno (19,2%) na amostra de óleo essencial obtido nos testes, quando comparados à literatura em questão, na qual o percentual de limoneno equivale a 77,49%. A CIM também é superior à obtida por Guo et al.

(2018), utilizando-se o óleo essencial proveniente das cascas de laranjas da espécie *C. sinensis Osbeck cv. Newhall*, a qual equivale a $3,13 \pm 0,19 \mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ ($0,026 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$).

Tal condição característica ao óleo essencial obtido, relacionada ao baixo percentual de limoneno presente na amostra de óleo essencial, diminui o potencial antimicrobiano do óleo essencial, não somente frente a cepa citada, mas também em relação à *P. mirabilis*, como apresentado em acordo a Figura 6B e a Tabela 5.

Frente à bactéria *P. mirabilis*, a qual é gram-negativa, constatou-se que seu crescimento foi inibido para concentração mínima de $0,3019 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$, concentração equivalente ao dobro daquela verificada para *S. aureus*, comportamento o qual se deve à estrutura da membrana celular do microrganismo testado, de forma a dificultar a interação entre a substância externa com o micróbio, pela redução da taxa de penetração do limoneno através da membrana celular (Blažeković et al., 2018).

De modo geral, a ação antibacteriana relaciona-se à hidrofobicidade do óleo essencial e à natureza lipofílica do mesmo, atuando de forma a penetrar nos lipídios da membrana celular bacteriana, ocasionando a destruição da mesma e tornando-a mais permeável (İşcan, 2017; Swamy et al., 2016). Assim, o mecanismo de inibição do crescimento bacteriano está vinculado ao efeito do composto aplicado sobre a integridade e as funções da membrana e do citoplasma das células (Raut & Karuppaiyil, 2014; Nazzaro et al., 2013), uma vez que a passagem do agente antimicrobiano através da parede celular e da membrana plasmática pode danificar as membranas mitocondriais, ocasionando a produção de radicais livres e gerando danos sobre proteínas, lipídios e o DNA (Li et al., 2019), bem como perturbar de maneira direta a respiração celular (Cox et al., 2000), a produção de energia e outras funções metabólicas regulatórias (Swamy et al., 2016). A presença de lipopolissacarídeos na parede celular das bactérias gram-negativas, os quais possuem qualidades hidrofílicas, impede o contato dos constituintes hidrofóbicos do óleo essencial com a célula bacteriana, resultando em uma maior resistência, tal qual evidenciado na análise tratada e ilustrado na Tabela 5 e na Figura 6 (Ehsani et al., 2017; Bezić et al., 2003).

Estudos conduzidos com geraniol, nerol e ésteres derivados, compostos os quais usualmente podem ser encontrados em menor quantidade no óleo essencial obtido de inúmeras variedades de laranja, possuem concentrações inibitórias mínimas para *P. mirabilis* que variam entre $0,0075 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ e $0,085 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$, para nerol e acetato de nerila, respectivamente, de forma que, a CIM verificada nos testes realizados indica um menor potencial antimicrobiano para o óleo essencial do que outros terpenos, quando se tratando da pureza de limoneno evidenciada para o “Ponto Ótimo” utilizado nas extrações (Zeferino, 2021).

Frente à *S. typhimurium*, apresentada na Figura 6C, constatou-se que, para maior concentração de óleo essencial testada, não houve inibição total do desenvolvimento da bactéria, como ilustrado pela coloração característica conferida pelo TTC, havendo apenas uma inibição parcial de seu crescimento, dada a redução na intensidade da coloração avermelhada vinculada ao aumento da concentração, evidenciada entre as linhas A e B. A concentração para linha A ($0,3019 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$), onde houve inibição parcial é muito superior à mínima concentração inibitória verificada por O’Bryan et al., (2008), o que também se deve ao baixo percentual de limoneno no óleo essencial testado (19,2%). Os estudos conduzidos por O’Bryan et al. (2008) apontam uma mínima concentração inibitória para *S. typhimurium* de $0,0084 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para o limoneno quando em elevado grau de pureza (99%). Cabe ressaltar que *S. typhimurium* também é uma bactéria gram-negativa, cuja composição da parede celular, tal como a *E. coli*, está associada com maior resistência ao composto ativo (Blažeković et al., 2018; Bezić et al., 2003). Desta forma, para inibição completa deste microrganismo também é necessário o emprego de concentrações de óleo essencial superiores a $0,3019 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

De acordo ao apresentado na Figura 6D, verifica-se que, para maior concentração de óleo essencial testada ($0,3019 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$), não houve inibição do microrganismo *E. coli*, o que possivelmente está associado com a pureza relativamente baixa do limoneno na amostra de óleo essencial aplicada na análise e à estrutura da bactéria em questão, dado que a mesma é gram-negativa, e sua parede celular, a qual é composta de lipopolissacarídeos, apresentando maior resistência à ação do composto ativo, dada a baixa permeabilidade deste através da parede celular e membrana plasmática (Blažeković et al., 2018; Bezić et

al., 2003). Desta forma, é necessário a utilização de concentrações de óleo essencial de laranja superior a $0,3019 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para inibir o crescimento deste microrganismo. Conforme Zhang et al. (2009), em testes conduzidos com óleo essencial apresentando 77,49% de limoneno, a concentração inibitória mínima para tal microrganismo é equivalente a $0,0158 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$, o que corresponde à concentração de limoneno de $0,0122 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$, a qual é consideravelmente inferior à maior concentração de limoneno testada no presente trabalho ($0,0579 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$, tendo-se um óleo essencial com pureza de 19,2% de limoneno), de forma a evidenciar-se o potencial antibacteriano vinculado ao óleo essencial, sobretudo ao limoneno, quando em elevado grau de pureza. A concentração inibitória mínima também é superior à verificada por Guo et al. (2018) para o óleo essencial das cascas de laranjas da espécie *Citrus sinensis Osbeck cv. Newhall*, a qual equivale a $1,56 \pm 0,11 \mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ ($0,0013 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$).

Para o microrganismo *P. aeruginosa* (Figura 6E) nas concentrações testadas, o comportamento foi semelhante ao evidenciado para *E. coli*, visto que a mesma também é gram-negativa e tende a apresentar menor suscetibilidade ao óleo essencial quando em baixos percentuais de limoneno. Estudos conduzidos por Zeferino (2021) utilizando-se geraniol e nerol, em elevado grau de pureza, bem como os respectivos ésteres derivados, compostos os quais, de acordo com Campelo, Sá, Feitosa, Sousa e Freitas (2013), podem ser encontrados em óleos essenciais de cítricos, indicaram concentração inibitória mínima frente à *P. aeruginosa* de $0,025 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

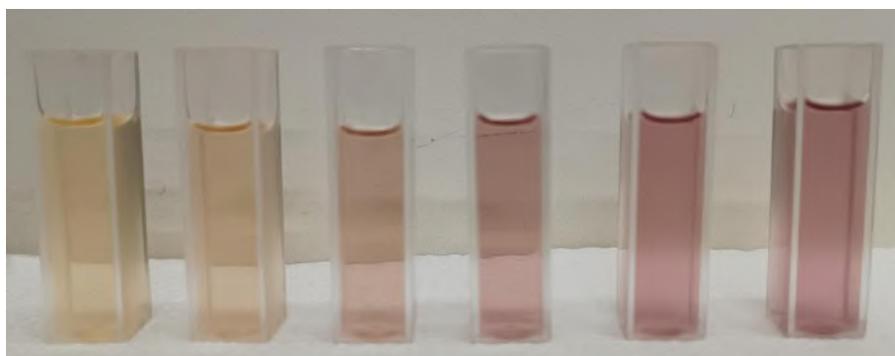
Vale ressaltar que as variações encontradas para os valores de CIM podem estar também relacionadas às cepas utilizadas, às adaptações na metodologia de análise e à concentração de células bacterianas (İşcan, 2017).

Assim, através dos resultados obtidos para a caracterização antibacteriana, verifica-se que o óleo essencial obtido por meio da rota proposta neste trabalho é capaz de inibir, de forma parcial ou completa, sobretudo bactérias gram-positivas, de forma a permitir sua utilização como aditivo antibacteriano em aplicações futuras em diversas áreas.

3.5 Avaliação da atividade antioxidante

A avaliação da atividade antioxidante do óleo essencial tem por base a análise da redução do radical livre DPPH quando na presença de antioxidantes, a qual pode ser observada através da redução da absorbância da amostra vinculada ao aumento da concentração do composto ativo na mesma, bem como pela alteração da coloração da solução, variando de púrpura a amarelo, conforme comportamento evidenciado na Figura 7.

Figura 7. Variação na coloração da amostra vinculada ao aumento da concentração do óleo essencial obtido nas condições operacionais do “Ponto Ótimo” e da ação antioxidante.



Fonte: Autores (2022).

Os resultados para os percentuais de atividade antioxidante obtidos pela Equação 3, relacionados a cada uma das concentrações testadas estão apresentados na Tabela 6.

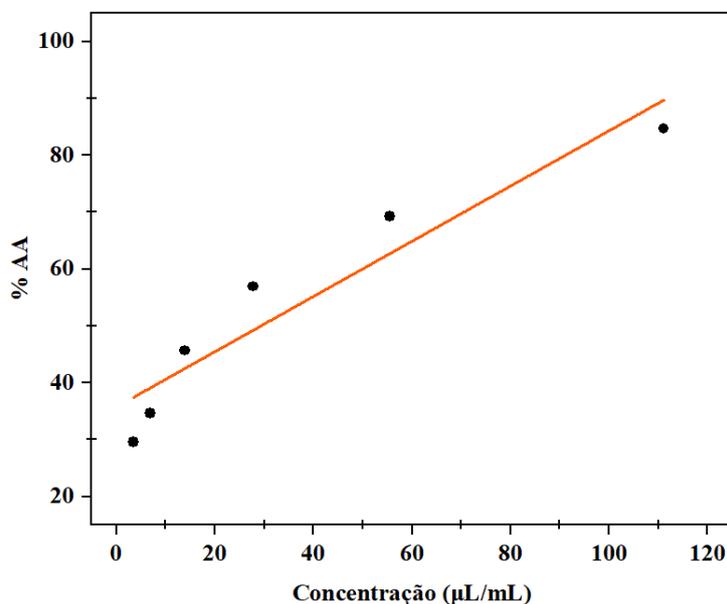
Tabela 6. Atividade Antioxidante (%AA) do óleo essencial obtido nas condições operacionais do “Ponto Ótimo” determinada por avaliação de redução de radical DPPH para as diferentes concentrações avaliadas.

| Concentração ($\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$) | Atividade Antioxidante (%AA) \pm Desvio Padrão |
|---|--|
| 111,11 | 84,64 \pm 2,35 |
| 55,56 | 69,20 \pm 2,35 |
| 27,78 | 56,93 \pm 5,67 |
| 13,89 | 45,67 \pm 2,95 |
| 6,94 | 34,60 \pm 4,37 |
| 3,47 | 29,56 \pm 1,98 |

Fonte: Autores (2022).

Tomando por base os percentuais de atividade antioxidante obtidos para cada uma das concentrações avaliadas, desenvolveu-se por meio do software Origin® 2018 (OriginLab, USA) a curva de calibração para atividade antioxidante, apresentada na Figura 8, cuja expressão encontra-se indicada na Equação 4.

Figura 8. Curva de calibração para ação antioxidante.



Fonte: Autores (2022).

O coeficiente de determinação obtido equivale a 0,9012, de forma a considerar-se que a equação de reta atende de maneira satisfatória o comportamento da ação antioxidante frente às diferentes concentrações testadas.

Utilizando-se a Equação 4 fez-se possível o cálculo da concentração necessária para inibir 50% dos radicais livres de DPPH, adotando-se %AA igual a 50%, de forma a encontrar-se para IC₅₀ uma concentração de 29,39 $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ (24,72 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), a qual indica que o óleo essencial avaliado é muito ativo, no que tange à ação antioxidante (Reynertson et al., 2005; Simonetti

et al., 2016). Tal potencial antioxidante também foi verificado por Yang et al. (2017), utilizando-se o óleo essencial obtido a partir de cascas de laranja da espécie *C. sinensis Osbeck cv. Newhall*.

O percentual de atividade antioxidante (%AA) verificado para o óleo essencial para maior concentração testada – 111,11 $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ (93,44 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), o qual equivale a $84,64 \pm 2,35\%$, é semelhante ao verificado por Favela-Hernández et al., (2016) para o suco de laranja (*C. sinensis*) (84,81%) para concentração de 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, e superior ao encontrado por Degirmenci e Erkurt (2020) em estudo para a mesma concentração, quando utilizando-se o óleo essencial obtido das flores de *Citrus aurantium L.*, no qual a atividade antioxidante verificada era equivalente a aproximadamente 15%.

A IC_{50} verificada para o óleo essencial obtido (24,72 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) é muito inferior à encontrada por Majnooni et al. (2011) para o óleo essencial proveniente das folhas de *C. aurantium L.*, a qual corresponde a $1040 \pm 0,9 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, e também por Degirmenci e Erkurt (2020), sendo esta $384,33 \pm 3,41 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

Estudos conduzidos por Torres-Alvarez et al. (2017) e Maróstica Junior et al. (2019) indicaram baixa ação antioxidante para o óleo essencial quando em alta concentração de limoneno, de forma a verificar-se um aumento da atividade antioxidante e consequente redução da IC_{50} para amostras onde o limoneno encontra-se associado à flavonoides, compostos fenólicos e terpenos oxigenados (Simonetti et al., 2016).

4. Conclusão

A aplicação de processos físicos e químicos na recuperação de resíduos industriais, de forma a reaproveitar materiais de baixo valor agregado, extraíndo destes compostos de interesse, tais como óleos essenciais, e atribuindo-lhes valor, é um campo promissor, dado a relativa simplicidade do processo e a sustentabilidade embarcada ao mesmo. Desta forma, foi avaliado, neste trabalho, o processo de extração do óleo essencial de *C. sinensis* ‘Valencia’, objetivando-se a otimização da rota proposta, com vistas à maximização do percentual de limoneno no mesmo.

O estudo dos resultados obtidos indica que a rota proposta é viável, visto que se fez possível a obtenção de óleo essencial, no qual a presença de limoneno foi comprovada via cromatografia. Evidenciou-se experimentalmente que a aplicação de hidrodestilação é preferível em relação à extração com solvente orgânico em soxhlet. A condição experimental ótima para extração líquido-líquido vinculada à hidrodestilação, cujas variáveis foram estudadas via delineamento experimental, ocorreu no tempo de 90 min e proporção de soluto:solvente de 100:10.

O óleo essencial obtido pela rota proposta apresentou atividade antimicrobiana frente à bactérias gram-positivas e gram-negativas, bem como teve ação antioxidante verificada, sendo considerado muito ativo. Desta forma, a partir dos resultados apresentados, evidencia-se o potencial do mesmo no que se refere à aplicações como aditivo antioxidante e antimicrobiano.

Referências

- Azambuja, W. (2021). Limoneno. <https://www.oleosessenciais.org/limoneno/>.
- Barros, C. B. (1986). Óleos Essenciais Cítricos do Brasil. (2a. Ed.). Campinas: Fundação Cargill, 1986.
- Battista, F., Remelli, G. & Bolzonella, S. Z. E. D. (2020). Valorização de casca de laranja, recuperação de limoneno, ácido graxos voláteis e produção de biogás. *ACS Química Sustentavel & Engenharia*, 8(17), 6834-6843.
- Bezić, N., Skočibušić, M., Dunkić, V. & Radonić, A. (2003). Composition and antimicrobial activity of *Achillea clavennae L.* essential oil. *Phytotherapy Research*, 17(9), 1037-1040. 10.1002/ptr.1290.
- Bizzo, H. R., Hovell, A. M. C. & Rezende, C. M. (2009). Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. *Química Nova*, 32, 588-594. 10.1590/S0100-40422009000300005.
- Blažeković, B., Yang, W., Wang, Y., Li, C., Kindl, M., Pepeljnjak, S. & Vladimir-Knežević, S. (2018). Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of essential oils of *Lavandula × intermedia* ‘Budrovka’ and *L. angustifolia* cultivated in Croatia. *Industrial Crops and Products*, 123, 173-182. 10.1016/j.indcrop.2018.06.041.

- Boutekedjiret, C., Bentahar, F., Belabbes, R., Bessiere, J. M. (2003). Extraction of rosemary essential oil by steam distillation and hydrodistillation. *Flavour and Fragrance Journal*, 18(6), 481-484. 10.1002/ffj.1226.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E. & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Science and Technology Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, 28(1), 25-30. 10.1016/S0023-6438(95)80008-5.
- Campelo, L. M. L., Sá, C. G., Feitosa, C. M., Sousa, G. F. & Freitas, R. M. (2013). Constituintes químicos e estudos toxicológicos do óleo essencial extraído das folhas de *Citrus limon* Burn (Rutaceae). *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 15(4), 708-716. 10.1590/S1516-05722013000500011.
- Associação Nacional dos Exportadores de Sucos Cítricos - CITRUSBR. (2022). <https://citrusbr.com/>.
- Clinical and Laboratory Standards Institute - CLSI. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically - CLSI document M07-A11* (ISBN 1-56238-837-1). (11a Ed). Pennsylvania: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2018.
- Colberg, J., Arat, S., Esguevillas, M. G., France, S., Huot, K., Kumar, R., Laity, D., Lall, M., Lee, J., Magano, J., Piper, J., Richardson, P., Roosen, P. & Watson, R. (2022). Pfizer's Green Chemistry Program. <https://communities.acs.org/t5/GCI-Nexus-Blog/Pfizer-s-Green-Chemistry-Program/ba-p/86557>.
- Cox, S. D., Mann, C. M., Markham, J. L., Bell, H. C., Gustafson, J. E., Warmington, J. R. & Wylie, S. G. (2000). The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *Journal of Applied Microbiology*, 88(1), 170-175. 10.1046/j.1365-2672.2000.00943.x.
- Değirmenci, H. & Erkurt, H. (2020). Relationship between volatile components, antimicrobial and antioxidant properties of the essential oil, hydrosol and extracts of *Citrus aurantium* L. flowers. *Journal of Infection and Public Health*, 13(1), 58-67. 10.1016/j.jiph.2019.06.017.
- De Moura, M. R. & Pires, V. G. A. (2017). Preparação de novos filmes poliméricos contendo nanoemulsões do óleo de melaleuca, copaíba e limão para aplicação como biomaterial. *Química Nova*, 40, 1-5. 10.21577/0100-4042.20160130.
- Ehsani A., Alizadeh O., Hashemi M., Afshari A. & Aminzare M. (2017). Phytochemical, antioxidant and antibacterial properties of *Melissa officinalis* and *Dracocephalum moldavica* essential oils. *Veterinary Research Forum*, 8(3), 223-229.
- Favela-Hernández, J. M. J., González-Santiago, O., Ramírez-Cabrera, M. A., Esquivel-Ferriño, P. C. & Camacho-Corona M. R. (2016). Chemistry and pharmacology of *Citrus sinensis*. *Molecules*, 21(2), 247. 10.3390/molecules21020247.
- Ferronato, A. N. & Rossi, R. C. (2018). Extração e aplicação do óleo essencial da casca da laranja como um ingrediente natural. *Estudos Tecnológicos em Engenharia*, 12(2), 78-93. 10.4013/ete.2018.122.05.
- Flores, P. I. G., Bañuelos-Valenzuela, R., Delgadillo-Ruiz, L., Meza-López, C. & Echavarría-Cháirez, F. (2019). Actividad antibacteriana de cinco compuestos terpenoides: carvacrol, limoneno, linalool, α -terpineno y timol. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 22(2), 241-248.
- Fundo de Defesa da Citricultura - FUNDECITRUS. (2022). <https://www.fundecitrus.com.br/>.
- Guo, Q., Liu, K., Deng, W., Zhong, B., Yang, W. & Chun, J. (2018). Chemical composition and antimicrobial activity of Gannan navel orange (*Citrus sinensis* Osbeck cv. Newhall) peel essential oils. *Food science & nutrition*, 6(6), 1431-1437. 10.1002/fsn3.688.
- International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC), *Standard methods for the analysis of oils, fats and derivatives*. (6a Ed). Oxford: Pergamon Press, 1979.
- İşcan, G. (2017). Antibacterial and Anticandidal Activities of Common Essential Oil Constituents. *Records of Natural Products*, 11(4), 374-388.
- Li, Z.-H., Cai, M., Liu, Y.-S., Sun, P.-L. & Luo, S.-L. (2019). Antibacterial Activity and Mechanisms of Essential Oil from *Citrus medica* L. var. *sarcodactylis*. *Molecules*, 24(8), 1577. 10.3390/molecules24081577.
- Maia, A. J., Schwan-Estrada, K. R. F., Faria, C. M. D. R., Oliveira, J. S. B., Jardimetti, V. A. & Batista, B. N. (2014). Óleo essencial de alecrim no controle de doenças e na indução de resistência em videira. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 49, 330-339. 10.1590/S0100-204X2014000500002.
- Majnooni, M. B., Mansouri, K., Gholivand, M. B., Mostafaie, A., Mohammadi-Motlagh, H. R., Afanzad, N. S., Abolghasemi, M. M. & Piriyaie, M. (2012). Chemical composition, cytotoxicity and antioxidant activities of the essential oil from the leaves of *Citrus aurantium* L. *African Journal of Biotechnology*, 11(2), 498-503. 10.5897/AJB11.1449.
- Maróstica Junior, M. R. Rocha e Silva, T. A. A., Franchi, G. C., Nowill, A., Pastore, G. M. & Hyslop, S. (2009). Antioxidant potential of aroma compounds obtained by limonene biotransformation of orange essential oil. *Food Chemistry*, 116(1), 8-12. 10.1016/j.foodchem.2009.01.084.
- Nazzaro, F., Fratianni, F., De Martino, L., Coppola, R. & De Feo, V. (2013). Effect of Essential Oils on Pathogenic Bacteria. *Pharmaceuticals*, 6(12), 1451-1474. 10.3390/ph6121451.
- Nellis, S. C., Correia, A. de F. K. & Spoto, M. H. F. (2017). Extração e quantificação de carotenoides em minitomate desidratado (Sweet Grape) através da aplicação de diferentes solventes. *Brazilian Journal of Food Technology*, 20. 10.1590/1981-6723.15616.
- O'Bryan, C. A., Crandall, P. G., Chalova, V. I. & Rieke, S. C. (2008). Orange essential oils antimicrobial activities against *Salmonella* spp. *Journal of Food Science*, 73(6), 264-267. 10.1111/j.1750-3841.2008.00790.x.
- Ozturk, B., Winterburn, J. & Conzalez-Miquel, M. (2019). Orange peel waste valorisation through limonene extraction using bio-based solvents. *Biochemical Engineering Journal*, 151. 10.1016/j.bej.2019.107298.
- Pires, T., Ribeiro, M. G. & Machado, A. (2018). Extração do R-(+)-limoneno a partir das cascas de laranja: avaliação e otimização da verdura dos processos de extração tradicionais. *Química Nova*, 41, 355-365. 10.21577/0100-4042.20170139.

PubChem - Open Chemistry Database. Limonene. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Limonene>.

Raut, J. S. & Karuppaiyil, S. M. (2014). A status review on the medicinal properties of essential oils. *Industrial Crops and Products*, 62, 250-264. 10.1016/j.indcrop.2014.05.055.

Reynertson, K. A., Basile, M. J. & Kennelly, E. J. (2005). Antioxidant potential of seven myrtaceous fruits. *Ethnobotany Research and Applications*, 3, 25-36.

Siddiqui, S. A., Pahmeyer, M. J., Assadpour, E. & Jafari, S. M. (2022). Extraction and purification of d-limonene from orange peel wastes: Recent advances. *Industrial Crops and Products*, 177, 114484. 10.1016/j.indcrop.2021.114484.

Sigma Aldrich. (2022). GC Analyse of Lemon Essential Oil on SLB. <https://www.sigmaaldrich.com/BR/pt/technical-documents/protocol/analytical-chemistry/gas-chromatography/gc-analysis-of-lemon-essential-oil-slb>.

Silva, R. S., Ribeiro, C. M. R., Borges, M. N. & Blois, G. S. (2009). Óleo essencial de limão no ensino da cromatografia em camada delgada. *Química Nova*, 32, 2234-2237. 10.1590/S0100-40422009000800042.

Simonetti, E., Ethur, M. E., Castro, L. C., Kauffmann, C., Giacomini, A. C., Ledur, A., Arossi, K., Pacheco, L. A., Goettert, M. I., Faleiro, D. & Freitas, E. M. (2016). Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos de *Eugenia anomala* e *Psidium salutare* (Myrtaceae) frente à *Escherichia coli* e *Listeria monocytogenes*. *Revista Brasileira de Plantas Medicináveis*, 18, 9-18. 10.1590/1983-084X/15_005.

Sun, J. (2007). D-Limonene: safety and clinical applications. *Alternative Medicine Review*, 12(3).

Swamy, M. K., Akhtar, M. S. & Sinniah, U. R. (2016). Antimicrobial Properties of Plant Essential Oils against Human Pathogens and Their Mode of Action: An Updated Review. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2016, 1-21. 10.1155/2016/3012462.

Torres-Alvarez, C., González, A. N., Rodríguez, J., Castillo, S., Leos-Rivas, C. & Báez-González, J. G. (2017). Chemical composition, antimicrobial, and antioxidant activities of orange essential oil and its concentrated oils. *CyTA-Journal of Food*, 15(1), 129-135. 10.1080/19476337.2016.1220021.

Vitti, A. M. S. & Brito, J. O. (2003). Óleo essencial de eucalipto. *Documentos florestais*, 17, 1-26.

Yang, C., Chen, H., Chen, H., Zhong, B., Luo, X. & Chun, J. (2017). Antioxidant and Anticancer Activities of Essential Oil from Gannan Navel Orange Peel. *Molecules*, 22(8), 1391. 10.3390/molecules22081391.

Zeferino, R. C. F. (2021). Síntese de acetato de geranila e acetato de nerila via catálise heterogênea com resina de troca iônica e caracterização dos ésteres para potenciais aplicações como aditivos antimicrobianos. (Tese de Doutorado em Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil).

Zhang, M. L., Tao, N. G. & Liu, Y. J., (2009). Chemical composition and antimicrobial activities of essential oil from the peel of bingtang sweet orange (*Citrus sinensis* Osbeck). *International Journal Of Food Science & Technology*, 44(7), 1281-1285. 10.1111/j.1365-2621.2009.01947.x.