

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA 'JÚLIO DE MESQUITA FILHO'
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA E BIOQUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

**PERFIL BIOATIVO E POTENCIAIS APLICAÇÕES DE RESÍDUOS
DE LARANJA E UVA ISOLADOS E FERMENTADOS**

DAFNE ANGELA CAMARGO
Prof^a Dr^a Luciana Francisco Fleuri
(Orientadora)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Biotecnologia - UNESP, Campus Botucatu, como
requisito para a obtenção do título de Mestre.

Botucatu

2020

DAFNE ANGELA CAMARGO

**PERFIL BIOATIVO E POTENCIAIS APLICAÇÕES DE RESÍDUOS
DE LARANJA E UVA ISOLADOS E FERMENTADOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Biotecnologia - UNESP, Campus Botucatu, como re-
quisito para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof^a Dr^a Luciana Francisco Fleuri

Botucatu

2020

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Camargo, Dafne Angela.

Perfil bioativo e potenciais aplicações de resíduos de
laranja e uva isolados e fermentados / Dafne Angela Camargo.
- Botucatu, 2020

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de
Botucatu

Orientador: Luciana Francisco Fleuri

Capes: 20805004

1. *Citrus sinensis*. 2. Uva. 3. Resíduos. 4. Enzimas.
5. Compostos bioativos.

Palavras-chave: Ação biológica; *Citrus sinensis* L. Osbeck;
Compostos bioativos; Enzimas; *Vitis vinifera*; *Vitis*
labrusca.

Agradecimentos

Em primeiro lugar, agradeço à Deus por me guiar nessa trajetória e me proporcionar experiências incríveis e amizades eternas.

À Prof^a Dr^a Luciana Francisco Fleuri, que foi muito além de uma orientadora. Pela constante dedicação e presença para ensinar, discutir e partilhar. Por apoiar nos desafios e incentivar as novas ideias. Por promover o crescimento e conhecimento de mundo a todos. Por acreditar no meu potencial desde o primeiro instante. Por todo o seu entusiasmo e otimismo que me levou a enxergar novos horizontes na pesquisa e na vida pessoal. Pela amizade e ajuda nesses dois anos de muito aprendizado, meus mais sinceros agradecimentos.

Aos meus pais, Maria do Carmo Silva e Benedito Jesus de Camargo, minha eterna gratidão e meu amor infinito. Por todo carinho e amor que me deram, sem medirem esforços para que eu pudesse realizar meus sonhos. Por serem maravilhosos e exemplos em tudo que fazem. Por me apoiarem sempre e me ajudarem a me tornar o que sou hoje. Meu MUITO OBRIGADA!

Ao meu namorado, Maurício Tidemann Wetzker, sou profundamente grata por todo o amor, respeito, confiança e força que tem nosso relacionamento, por estar presente nos momentos mais difíceis e ter paciência para me ajudar sem hesitar, por confidenciar todas as minhas dores e por ser o grande amor da minha vida.

Aos meus preciosos amigos da equipe do Laboratório de Bioprocessos que me ensinaram muito e me acolheram de todo coração, Milene S. Pereira, Mirella R. Zanutto Elgui, Andressa Genezini, Meliane A. Koike, Paulo H. Martinez, João V. Ignácio e Clarissa Okino Delgado.

Aos amigos inestimáveis que a vida me presenteou, Carla Tidemann e Márcia Tidemann que se tornaram minha família; Sarah G. Nunes, Bruno F. Moreira e Anna Érica C. Méró, amizades que construí na graduação e que me ajudaram muito nesse trabalho com discussões estatísticas, artes gráficas e sugestões, agradeço as risadas, conselhos, conversas e todo apoio; Edson M. Alves, Joyce F. de Souza e Bruna Escaramboni, amigos do laboratório de IC que permanecem no meu coração; Amanda A. de Oliveira Leite, amiga de longa data que tenho carinho enorme, e Bárbara R. R. Silveira, mais do que uma colega de apartamento, uma amiga sincera.

Às parcerias que enriqueceram muitíssimo o projeto e meu arcabouço profissional. Meus agradecimentos ao pessoal do Laboratório de Bioensaios e Dinâmica Celular (IBB-

Botucatu) na figura do Profº Drº Willian Zambuzzi, Célio Jr. da Costa Fernandes e Marcel R. Ferreira. E também aos parceiros do Laboratório de Bromatologia (FMVZ-Botucatu) coordenado pelo Profº Drº Paulo Meirelles, em especial à técnica Gisele Setznagl e Edgar Damasceno. E no Laboratório de Microbiologia, gostaria de agradecer a Jessica Luana Chechi por todo o auxílio prestado.

Ao Instituto de Biociências da UNESP-Botucatu por toda infraestrutura e subsídios para a realização da pesquisa, ao técnico de laboratório Fábio Fava e a prestimada secretária Gabriela Athanázio.

Às empresas JBT FoodTech e Vinícola Góes que doaram os resíduos agroindustriais utilizados nesta pesquisa, contribuindo para o levantamento de dados e a ciência no país.

À todas as pessoas que auxiliaram direta ou indiretamente neste projeto e, consequentemente no meu crescimento pessoal e profissional.

Meu humilde obrigada!

Dafne Angela Camargo

Sumário

Agradecimentos	II
Lista de Abreviaturas	VIII
Lista de Figuras	XI
Lista de Tabelas	XIII
Preâmbulo	12
Capítulo 1: Revisão Bibliográfica: Biomoléculas de resíduos de laranja e uva - obtenção direta e indireta	13
Resumo	13
Abstract	14
Resumo Gráfico	15
1.1. Resíduos e subprodutos agroindustriais	16
1.1.1. Resíduos da Citricultura	17
1.1.2. Resíduos da Vitivinicultura	19
1.1.3. Obtenção direta e indireta das biomoléculas a partir de resíduos	21
1.2. Enzimas	22
1.2.1. Fitases	23
1.2.2. Lipases	24
1.2.3. Proteases	25
1.3. Atividades biológicas dos resíduos de laranja e uva	25
1.3.1. Atividade antioxidante	26
1.3.2. Atividade antimicrobiana	28
1.3.3. Atividade antidiabética	30
1.3.4. Modulação celular – ênfase em citotoxicidade	32
1.3.5. Atividade anti-inflamatória	33
Referências Bibliográficas	35
Capítulo 2: Resíduos de laranja e uva, isolados e fermentados: fonte de fitases, lipases e proteases	51
Resumo	51
Abstract	52
1.1. Introdução	53
1.2. Objetivos	54
1.3. Material e Métodos	55
1.3.1. Obtenção e preparo dos resíduos	55
1.3.2. Cultivo microbiano e processo fermentativo	57
1.3.3. Caracterização bromatológica dos resíduos isolados e fermentados	58
1.3.4. Obtenção de enzimas a partir dos resíduos isolados e fermentados	60
1.3.5. Análises estatísticas	62
1.4. Resultados e Discussão	63
1.4.1. Caracterização bromatológica dos resíduos	63
1.4.2. Atividade de fitase dos resíduos de laranja e uva	69

1.4.3. Atividade de lipase dos resíduos de laranja e uva	72
1.4.4. Atividade de protease dos resíduos de laranja e uva	76
1.5. Conclusão.....	79
<i>Referências Bibliográficas</i>	80
<i>Capítulo 3: Resíduos de laranja e uva, isolados e fermentados: fontes de antioxidantes, antimicrobianos, antidiabéticos, moduladores celulares e anti-inflamatórios</i>	91
<i>Resumo</i>	91
<i>Abstract</i>	92
1.1. Introdução	93
1.2. Objetivos	96
1.3. Material e Métodos	96
1.3.1. Obtenção e preparo dos resíduos.....	96
1.3.2. Cultivo microbiano e processo fermentativo.....	96
1.3.3. Extração dos resíduos de laranja e uva.....	97
1.3.4. Atividade antioxidante dos extratos de laranja e uva	97
1.3.5. Atividade antimicrobiana dos extratos de laranja e uva.....	98
1.3.6. Atividade antidiabética dos resíduos de laranja e uva.....	99
1.3.7. Modulação celular - ênfase em citotoxicidade	100
1.3.8. Atividade anti-inflamatória dos extratos de laranja	101
1.3.9. Análises estatísticas.....	102
1.4. Resultados e Discussão	103
1.4.1. Atividade antioxidante dos extratos de laranja e uva	103
1.4.2. Atividade antimicrobiana dos extratos de laranja e uva.....	105
1.4.3. Atividade antidiabética dos resíduos de laranja e uva.....	111
1.4.4. Atividade de citotoxicidade celular por MTT	112
1.4.5. Atividades anti-inflamatórias dos extratos de laranja e uva.....	115
1.5. Conclusão.....	117
1.6. Perspectivas Futuras.....	118
<i>Referências Bibliográficas</i>	119

Lista de Abreviaturas

Abs. real	Absorbância das amostras subtraída o controle da amostra
A549	Carcinoma de pulmão
ABTS	2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BDA	Ágar Batata Dextrose
BF	Bagaço Fermentado
BI	Bagaço Isolado
CA	Controle da Amostra
CBMAI	Coleção Brasileira de Micro-organismos de Ambiente e Indústria
CEDES	Centro de Estudos e Debates Estratégicos
CF	Casca Fermentada
CI	Casca Isolada
CS	Controle do Substrato
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazila
DPP4	Dipeptidil-peptidase 4
EC	<i>Enzyme Comission</i>
EE	Extrato Etéreo
eNOS	Enzima óxido nítrico sintase endotelial – isoforma III
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
FAO	<i>Food and Agriculture Organization</i>
FD	Fator de Diluição
FDA	Fibra Detergente Ácido
FDN	Fibra Detergente Neutro
FES	Fermentação em Estado Sólido
FF	Frit Fermentado

FI	Frit Isolado
FRAP	<i>Ferric Reducing Antioxidant Power</i>
FS	Fermentação Submersa
GRAS	<i>Generally Recognized as Safe</i>
HaCat	Queratinócito humano
HeLa	Carcinoma de colo do útero
HeP2	Carcinoma de laringe
HIF1- α	Fator indutor de hipóxia subunidade alfa
HIF- β	Fator indutor de hipóxia subunidade beta
HL-60	Célula de leucemia promielocítica humana
HPg2	Carcinoma de fígado
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
HUVEC	Células Endoteliais de Veias do cordão Umbilical Humano
IC	Porcentagem de inibição da enzima
IDF	<i>International Diabetes Federation</i>
INF	Interferon
iNOS	Enzima óxido nítrico sintase endotelial – isoforma II
IUPAC	União Internacional de Química Pura
L-929	Células tumorais de roedores
MCF7	Carcinoma de mama
MCP-1	<i>Monocyte Chemoattractant Protein-1</i>
MFC	<i>Minimum Fungicidal Concentration</i>
MIC	<i>Minimum Inhibitory Concentration</i>
MM	Matéria Mineral
MTCC	<i>Microbial Type Culture Collection and Gene Bank</i>
NHI-3t3	Fibroblasto de camundongo
nNOS	Enzima óxido nítrico sintase endotelial – isoforma I
OIV	<i>International Organisation Of Vine And Wine</i>
ONU	Organização das Nações Unidas

ORAC	<i>Oxygen Radical Absorbance Capacity</i>
PB	Proteína Bruta
PMF	<i>Polymethoxylated Flavones</i>
p-NPB	p-nitrofenilbutirato
p-NPL	p-nitrofenilaurato
p-NPP	p-nitrofenilpalmitato
PT	Proteínas Totais
RT-qPCR	<i>Polymerase Chain Reaction Quantitative Real Time</i>
SCC9	Carcinoma epidermóide bucal
SISGEN	Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético
TNF- α	Fator de necrose tumoral
UC	Uva Cabernet Franc
UM	Uva Mista
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular

Lista de Figuras

Capítulo 1

Figura 1. Resíduos sólidos (Bagaço, Casca e Frit) originados do processamento do suco de laranja (OKINO-DELGADO e FLEURI, 2014) modificado.

Figura 2. Análise atual e estimada dos anos 2030 e 2045 no predomínio de diabéticos adultos, que possuem de 20 a 79 anos, em 7 regiões do globo: América do Norte e Caribe, América Central e Sul, África do Norte e Oriente médio, África, Sudeste da Ásia, Europa e Oeste do Pacífico (IDF, 2019).

Capítulo 2

Figura 1. Organograma de reaproveitamento dos resíduos do processamento do suco de laranja advindos diretamente da indústria de suco de laranja, coletados logo após o processo de lavagem na separação em extratora JBT FoodTech para utilização de forma isolada e fermentada por *A. niger* CBMAI 2084.

Figura 2. Organograma de reaproveitamento dos resíduos de vinícola após etapa de fermentação para a produção de vinhos tintos secos e suaves. Denominados como UC - Resíduos de uva da variedade Cabernet Franc e UM - Resíduos mistos de uvas Isabel + Bordô utilizados de forma isolada diretamente da indústria vitícola.

Figura 3. Classificação dos resíduos de laranja e uva de acordo com o processo de obtenção enzimática adotado. Os resíduos de laranja - bagaço, casca e frit - quando utilizados como fonte direta de enzimas foram denominados de resíduos isolados e codificados, respectivamente, como BI, CI e FI. Os resíduos de laranja - bagaço, casca e frit - fermentados com fungos, caracterizando-se como fonte indireta de obtenção de enzimas, foram denominados de resíduos fermentados e codificados, respectivamente, como BF, CF e FF. Os resíduos isolados de uva se distinguiram pela variedade adotada, a saber: UC (resíduos de uva da variedade Cabernet Franc) e UM (resíduos mistos de uvas Isabel + Bordô).

Figura 4. Fluxograma das análises bromatológicas seguindo esquema de Weende proposto por Henneberg em 1864 (Andrigueto et al., 1981) com modificação. Sugere a quantificação aproximada da composição centesimal dos resíduos isolados e fermentados, ponderando os grupos de compostos químicos: umidade ou matéria seca; cinzas ou matéria inorgânica; proteína bruta; extrato etéreo; fibra bruta.

Figura 5. Atividades de fitases dos resíduos de laranja e uva, isolados e fermentados. Atividades enzimáticas, expressas em $\text{U/g} \cdot \text{min}^{-1}$, dos resíduos de laranja e uva isolados (A) e fermentados (B). Atividades específicas de fitase, expressas em U/g , dos resíduos isolados (C) e fermentados (D). Sendo B – Bagaço de laranja, C - Casca de laranja, F – Frit de laranja, H_2O – Água residual de lavagem dos resíduos de laranja, I – Isolado, F – Fermentado, UC - Resíduos de uva da variedade Cabernet Franc e UM - Resíduos mistos de uvas Isabel + Bordô. Os resultados são representados em *Médias $\pm$ DP da média e letras iguais inferem que não há diferenças significativas ($p > 0,05$).

Figura 6. Atividades de lipases dos resíduos de laranja e uva, isolados e fermentados. (A) Atividades enzimáticas e (B) específicas, por titulação, nos resíduos isolados, expressos em $\text{U/g} \cdot \text{min}^{-1}$ e U/g . Atividades enzimáticas em p-PNP dos resíduos isolados (C) e fermentados (D). Atividades enzimáticas em p-NPB dos resíduos isolados (E) e fermentados (F). Sendo B – Bagaço de laranja, C - Casca de laranja, F – Frit de laranja, I – Isolado, F – Fermentado, UC - Resíduos de uva da variedade Cabernet Franc e UM - Resíduos mistos de uvas Isabel + Bordô. Os resultados são representados em *Médias $\pm$ DP da média e letras iguais inferem que não há diferenças significativas ($p > 0,05$).

Figura 7. Atividades específicas de lipases dos resíduos de laranja e uva, isolados e fermentados, expressas em U/g . Atividades específicas em p-NPP nos resíduos isolados (A) e fermentados (B). Atividades específicas em p-PNB das frações isoladas (C) e fermentadas (D). Sendo B – Bagaço de laranja, C - Casca de laranja, F – Frit de laranja, I – Isolado, F – Fermentado, UC - Resíduos de uva da variedade Cabernet Franc e UM - Resíduos mistos de uvas Isabel + Bordô. Os resultados são representados em *Médias $\pm$ DP da média e letras iguais inferem que não há diferenças significativas ($p > 0,05$).

Figura 8. Atividades de proteases dos resíduos de laranja e uva, isolados e fermentados. Atividades enzimáticas, expressa em $\text{U/g} \cdot \text{min}^{-1}$, nos resíduos vegetais isolados (A) e fermentados (B). Atividades específicas, expressa em U/g , nos resíduos vegetais isolados (C) e fermentados (D). Sendo B – Bagaço de laranja, C – Casca de laranja, F – Frit de laranja, H_2O – Água residual de lavagem dos resíduos de laranja, I – Isolado, F – Fermentado, UC – Resíduos de uva da variedade Cabernet Franc e UM – Resíduos mistos de uvas Isabel + Bordô. Os resultados são representados em *Médias $\pm$ DP da média e letras iguais inferem que não há diferenças significativas ($p > 0,05$).

Capítulo 3

Figura 1. Representação da leitura de avaliação qualitativa da atividade antimicrobiana por difusão em discos, na qual CP – controle positivo dado pela adição dos antibióticos; CN – controle negativo realizado pela solução etanol 99,8%; TP – triplicatas do extrato dos resíduos testado.

Figura 2. Esquema ilustrativo do processo de atividade mitocondrial (MTT) aplicado em células endoteliais (HUVEC) cultivadas em DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*), utilizando-se três concentrações dos extratos: 5, 10 e 15%.

Figura 3. Atividades antioxidantes dos extratos dos resíduos de laranja e uva, isolados e fermentados. Sendo B – Bagaço de laranja, C – Casca de laranja, F – Frit de laranja, H_2O – Água residual de lavagem dos resíduos de laranja, I – Isolado, F – Fermentado, UC – Resíduos de uva da variedade Cabernet Franc e UM – Resíduos mistos de uvas Isabel + Bordô. Os resultados são representados em *Médias $\pm$ DP da média e letras iguais inferem que não há diferenças significativas ($p > 0,05$).

Figura 4. Avaliação da formação de halos inibitórios em 72h a partir de análises de difusão em discos com extratos dos resíduos de laranja e uva, isolados e fermentados. (E) Linhagens de *A. fumigatus* IOC 0081. Imagens do verso de cada placas numeradas de 1 a 8, sendo que os extratos de resíduos foram ordenados em (1-2) Bagaço de laranja isolado e fermentado, (3-4) Casca de laranja isolada e fermentada, (5-6) Frit de laranja isolado e fermentado, (7) UC – Resíduos de uva da variedade Cabernet Franc e (8) UM – Resíduos mistos de uvas Isabel + Bordô.

Figura 5. Avaliação do aparecimento de halos inibitórios em 24h a partir de análises de difusão em discos com extratos dos resíduos de laranja e uva, isolados e fermentados. (A) Linhagens de *E. coli* ATCC 8739, (B) Linhagens de *S. aureus* ATCC 1901. (1-8) Extratos de resíduos ordenados em (1-2) Bagaço de laranja isolado e fermentado, (3-4) Casca de laranja isolada e fermentada, (5-6) Frit de laranja isolado e fermentado, (7) UC – Resíduos de uva da variedade Cabernet Franc e (8) UM – Resíduos mistos de uvas Isabel + Bordô.

Figura 6. Avaliação da formação de halos inibitórios em 24h a partir de análises de difusão em discos com extratos dos resíduos de laranja e uva, isolados e fermentados. (C) Linhagens de *L. monocytogenes* (ATCC 7644), (D) *S. enteritidis* (ATCC 13076). (1-8) Extratos de resíduos ordenados em (1-2) Bagaço de laranja isolado e fermentado, (3-4) Casca de laranja isolada e fermentada, (5-6) Frit de laranja isolado e fermentado, (7) UC – Resíduos de uva da variedade Cabernet Franc e (8) UM – Resíduos mistos de uvas Isabel + Bordô.

Figura 7. Atividades de inibição de α -amilase dos resíduos de laranja e uva, isolados e fermentados. Sendo B – Bagaço de laranja, C – Casca de laranja, F – Frit de laranja, I – Isolado, F – Fermentado, UC – Resíduos de uva da variedade Cabernet Franc e UM – Resíduos mistos de uvas Isabel + Bordô. Os resultados são representados em *Médias $\pm$ DP da média e letras iguais inferem que não há diferenças significativas ($p > 0,05$).

Figura 8: Extratos de laranja e uva afetam viabilidade de células endoteliais de veias do cordão umbilical humano (HUVEC). Após o período de tratamento, com os diferentes extratos, as células foram avaliadas quanto a citotoxicidade por incorporação de sal MTT e a citotoxicidade foi comparada à porcentagem do controle. B – Bagaço de laranja, C – Casca de laranja, F – Frit de laranja, I – Isolado, F – Fermentado, UC – Resíduos de uva da variedade Cabernet Franc e UM – Resíduos mistos de uvas Isabel + Bordô. Os resultados são representados em *Médias $\pm$ DP da média, e letras iguais inferem que não há diferenças significativas ($p > 0,05$).

Figura 9: Efeitos de extratos de laranja em marcadores de angiogênese. As células tratadas com os diferentes extratos, foram coletadas em TriZOL para extração de RNA. A expressão relativa (mRNA) foi normalizada pelo controle. O cDNA sintetizado foi utilizado para investigar a expressão gênica: A) VEGF, B) *nNOS*, C) *iNOS*, D) *eNOS*, E) *HIF1- α* , F) *HIF- β* e G) *INF- γ* . Os valores foram normalizados por valores de expressão do *18s* e os gráficos representam $n = 3$. * $p < 0,05$; ** $p < 0,0063$; *** $p < 0,0002$; **** $p < 0,0001$:

Diferença estatística quando comparado ao grupo controle. * $p < 0.05$; ** $p < 0.0063$; *** $p < 0.0002$; **** $p < 0.0001$: Diferença estatística quando comparado ao grupo CF.

Lista de Tabelas

Capítulo 1

Tabela 1. Comparativo da fermentação em estado sólido e fermentação submersa (ARORA et al., 2018).

Capítulo 2

Tabela 1. Caracterização bromatológica, expressa em porcentagem (%), dos resíduos de laranja e uva. As siglas MM – Matéria Mineral ou Cinzas; PB – Proteína Bruta; FDN - Fibra de Detergente Neutro; FDA – Fibra de Detergente Ácida; Sendo B – Bagaço de laranja, C - Casca de laranja, F – Frit de laranja, I – Isolado, F – Fermentado, UC - Resíduos de uva da variedade Cabernet Franc e UM - Resíduos mistos de uvas Isabel + Bordô. *Médias que apresentam letras iguais indicam diferenças estatísticas não significativas ($p > 0,05$). Letras minúsculas representam os testes comparativos entre todos os resíduos, referente a cada coluna. Letras maiúsculas referem-se às diferenças estatísticas entre os extratos isolados (fonte direta) e suas respectivas frações fermentadas (fonte indireta).

Capítulo 3

Tabela 1. Sequências de genes envolvidos na resposta inflamatória e parâmetros da RT-PCR.

Tabela 2. Atividades antimicrobianas dos extratos dos resíduos de laranja e uva, isolados e fermentados. Sendo B – Bagaço de laranja, C - Casca de laranja, F – Frit de laranja, I – Isolado, F – Fermentado, UC - Resíduos de uva de Cabernet Franc e UM - Resíduos mistos de uvas Isabel + Bordô. As atividades antibacterianas foram analisadas em 24 e 120h, já as fúngicas foram analisadas em 72h. A presença dos halos de inibição nas triplicatas foi subtraída dos seus respectivos controles negativos e foi expressa em mm. *Médias $\pm$ DP da média, e letras iguais inferem que não há diferenças significativas ($p > 0,05$).

Preâmbulo

Atualmente, a procura por tecnologias em bioprocessos que abaxem o custo de produção de biomoléculas com alto valor agregado e apresentem garantias de altos níveis de rendimento comercial é intensa. Alternativas nessa área de estudo, com resíduos agroindustriais pouco explorados ou diminuição de etapas no processo são comumente empregadas para viabilizar a produção de enzimas e compostos bioativos. Diante dessa questão, o cerne desta pesquisa se concentra em investigar os resíduos de laranja provenientes da fabricação de suco e os resíduos de uva advindos de vinícolas como fontes brutas para obtenção de enzimas (fitases, lipases e proteases) e perquirir acerca de compostos bioativos com ações biológicas. Dessa forma, para melhor clareza e discussão dos resultados alcançados, esta dissertação se divide em três capítulos. O Capítulo 1 apresenta o panorama geral, a partir de revisão atenta dos resíduos e das enzimas estudadas, bem como suas atividades biológicas. Já o Capítulo 2 quantifica as macromoléculas existentes nos resíduos brutos, através da caracterização bromatológica dos mesmos e aborda os resultados obtidos para as atividades enzimáticas. Por fim, o Capítulo 3 discute a bioatividade encontrada nos compostos bioativos dos resíduos trabalhados, como as ações antioxidantes, antimicrobianas, antidiabéticas, anti-inflamatórias e citotoxicidade celular. O estudo procura promover levantamento de informações sobre o potencial biotecnológico dos resíduos de uva e laranja, além de propor modelo de bioprocesso mais próximo a realidade industrial.

Capítulo 1: Revisão Bibliográfica: Biomoléculas de resíduos de laranja e uva - obtenção direta e indireta

Resumo

A produção de laranjas (*Citrus sinensis* L. Osbeck) e uvas (*Vitis vinifera* e *Vitis labrusca*) são culturas de extrema importância para a economia brasileira. Os resíduos dessas frutas, gerados em grande quantidade no processamento industrial, despontam em vários estudos como fontes de compostos bioativos (enzimas e antioxidantes) interessantes para diversas aplicações biotecnológicas. Os métodos de obtenção das biomoléculas são cruciais para baratear o bioprocesso, assim, os resíduos isolados (utilização direta) e fermentados (utilização indireta) são discutidos como alternativas limpas às tecnologias de síntese química por deterem vantagens sustentáveis e econômicas. As enzimas de alto valor comercial como fitases, lipases e proteases são amplamente utilizadas em processos catalíticos por disporem de propriedades bioquímicas versáteis e com vastos campos de aplicação. O potencial biológico dos resíduos de laranja e uva é ampliado pelas ações antioxidante, antimicrobiana, antidiabética, anti-inflamatória e de modulação celular. Dito isso, a presente revisão enfatiza a obtenção enzimática de biomoléculas a partir de resíduos de laranja e uva isolados e fermentados, além de investigá-los como potenciais fontes de atividades biológicas diversas.

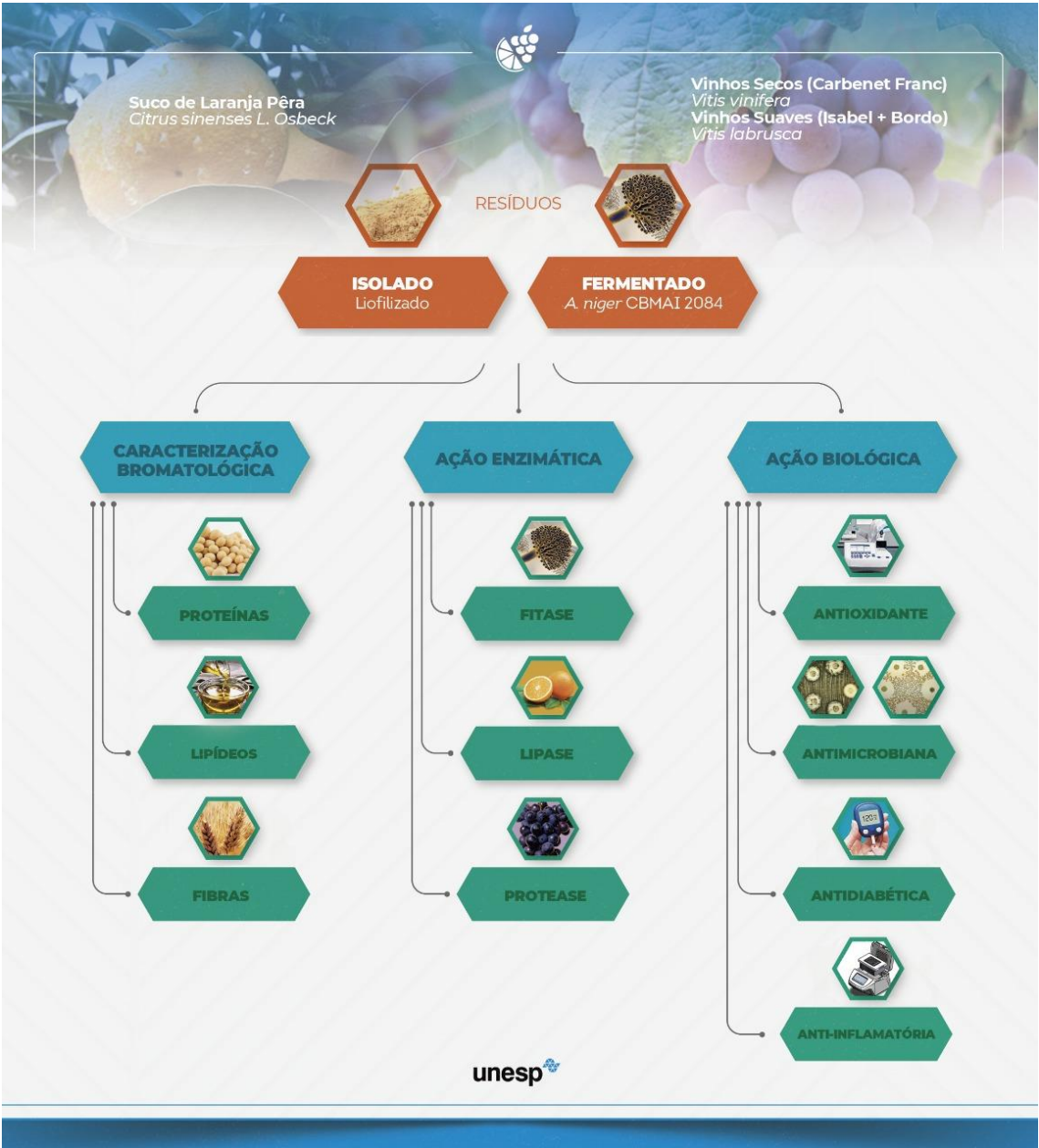
Palavras-chave: *Citrus sinensis* L. Osbeck, *Vitis vinifera* e *Vitis labrusca*, enzimas, compostos bioativos, ação biológica.

Abstract

The orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck) and grape (*Vitis vinifera* e *Vitis labrusca*) are extremely important crops for Brazilian economy. The residues of these fruits, generated in large quantities in industrial processing, it appears in several studies as bioactive compounds sources (enzymes and antioxidants) interesting for various biotechnological applications. The methods of obtaining are essential to lower the cost of bioprocess, thus, the isolated (direct use) and fermented (indirect use) bioprocess are discussed as clean alternatives to chemical synthesis technologies, due to its sustainable and economic advantages. The high commercial value enzymes like phytases, lipases and proteases, are widely used in catalytic processes because they have versatile biochemical properties and vast applications fields. The biological potential of orange and grape residues is amplified by antioxidant, antimicrobial, antidiabetic, anti-inflammatory actions and cell modulation. So, the present review emphasizes the enzymatic obtain of biomolecules from isolated and fermented orange and grape residues, besides investigating them as potential source of diverse biological activities.

Key Words: *Citrus sinensis* L. Osbeck, *Vitis vinifera* and *Vitis labrusca*, enzymes, bioactive compounds, biological activities.

Resumo Gráfico



1.1. Resíduos e subprodutos agroindustriais

Em relatório divulgado pela ONU (2019), o crescimento populacional mundial alcançará o patamar de 9,7 bilhões de pessoas nos próximos 30 anos. Esse contexto contribuirá para o aumento da demanda global por alimentos, porém ainda são registrados desperdícios da ordem de 1,3 bilhão de toneladas anuais, o que equivale a aproximadamente 33% do total de alimentos produzidos no mundo (FAO, 2019a).

No Brasil, esse desperdício de alimentos é calculado em 26,3 milhões de toneladas por ano (CEDES, 2018), representando cerca de 10% da produção brasileira, dos quais mais de 40% referem-se a frutas e hortaliças. Além disso, integra o conjunto de países da América Latina e Caribe que juntos somam desperdícios de até 20% da quantia mundial de alimentos, que são perdidos nos processos de colheita até o varejo (FAO, 2019b).

A economia brasileira é fortemente pautada na produção agrícola. O volume do processamento associado ao armazenamento, distribuição e colheita inadequado provoca perdas ao longo de todo o processo, como ocorre para as culturas do milho, soja, trigo, cana-de-açúcar, arroz, café, mandioca, frutas, entre outras (SANTOS et al., 2018). Tal desperdício pode resultar em prejuízos na escala de R\$ 112 bilhões anuais (TOCHETTO et al., 2010).

Nesse cenário, se faz necessário diferenciar o uso da terminologia “resíduos agroindustriais” e “subprodutos”. Tais definições divergem em muitos estudos na literatura, sendo que alguns discutem que os resíduos correspondem a todas as substâncias que são descartadas durante a cadeia produtiva (ONYEONAGU e NJOKU, 2010); já subproduto, trata-se de qualquer substância oriunda do processo de produção que possa ser diretamente comercializado, de forma que não cause danos à saúde ou algum impacto ambiental e, assim contribui para obter valor agregado ao que antes era resíduo (BRASIL, 2011).

Ao analisar o raciocínio econômico adotado por Santos et al. (2018), os resíduos, portanto, possuem pouco ou nenhum valor comercial conferido a eles, além disso, muitas vezes são direcionados a destinos menos nobres, no entanto, há ainda excedentes subnotificados que não são aproveitados e são descartados e/ou a indústria processadora necessita tratá-los de maneira adequada antes do descarte final (MARTÍNEZ et al., 2012). As finalidades corriqueiramente adotadas para o descarte são: incineração, incremento de ração, adubagem e aterros sanitários (WU et al., 2014; BACKES et al., 2007). Em atenção aos termos discutidos, foi utilizado, de forma mais apropriada neste trabalho, a expressão “resíduos” aos descartes de produção explorados.

Há inúmeras variedades de resíduos ou subprodutos suscetíveis a servir como fontes para a aquisição de biomoléculas de alto valor comercial: bagaço de cana-de-açúcar; farelos de trigo, soja e mandioca; casca de café; sabugo de milho; caroço e casca de frutas em geral (OLIVEIRA et al., 2018; CASTRO e SATO, 2013; HASHEMI et al., 2010); entretanto, os resíduos promissores que serão destacados neste trabalho são relacionados à citricultura e vinicultura brasileira. Esses são gerados em milhões de toneladas em todo ano e representam excedentes descartáveis durante o processo produtivo, por isso, correspondem a resíduos da citricultura e vinicultura.

1.1.1. Resíduos da Citricultura

O comércio mundial de laranja (*Citrus sinensis* L. Osbeck) produziu no último ano cerca de 50 milhões de toneladas da fruta e já no início de 2020, a CITRUSBR (2020) relatou aumento de 26,6% na exportação total dos sucos congelado e concentrado (FCOJ), e o pasteurizado (NFC) nos seis primeiros meses da safra.

O Brasil ocupa a primeira posição mundial no ranking de produção e exportação de suco de laranja, seguido de Estados Unidos com 4,9 milhões de toneladas. Na safra de 2019, foram produzidas 17 milhões de toneladas de laranja, exportando US\$ 1,7 bilhão em suco (CITRUSBR, 2019). No país, a produção é bem-estabelecida e reconhecida, entretanto, estima-se que 43% da fruta se transforme em resíduos no final do processamento de suco. Dessa forma, somente no último ano foram geradas mais de 8 milhões de toneladas de resíduos (OKINO-DELGADO et al., 2018a; CYPRIANO et al., 2016; MARTINI, 2009; LANZA, 2003).

As variedades de laranjas mais consumidas no Brasil são: Bahia, Pêra, Natal, Valência, Hamlin, Westin e Rubi (CITRUSBR, 2020). Os resíduos de laranja da variedade Pêra são objetos de estudo neste trabalho, não somente por se tratar da variedade mais consumida dentre as demais, devido às suas características organolépticas: sabor doce e acidez suave (EMBRAPA, 2013; MATTOS JUNIOR et al., 2005), mas pelos resultados de estudos prévios na investigação dos componentes e propriedades de variedade de laranja mais consumidas para suco (FRANCISCO et al., 2019; PEREIRA, 2017; OKINO-DELGADO e FLEURI, 2014).

A JBT FoodTech detém linha de extratoras que representa 75% do maquinário mundial para produção de suco cítrico caracterizada por ser totalmente mecânica e não alterar as propriedades bioquímicas das biomoléculas. Nesse processo são gerados três tipos de frações distintas de resíduos sólidos (Fig. 1) a saber: o bagaço, a casca e o frit,

además, a água residual do processo de lavagem dessas frações também gerada como resíduo aquoso (JBT FOODTECH, 2019). Essas frações consistem em material lignocelulósico rico em compostos como pectinas, óleos essenciais, ligninas, vitaminas, açúcares solúveis, entre outros (OKINO-DELGADO et al., 2018b; OKINO-DELGADO e FLEURI, 2016; REZZADORI et al., 2012; ARANHA, 2011).

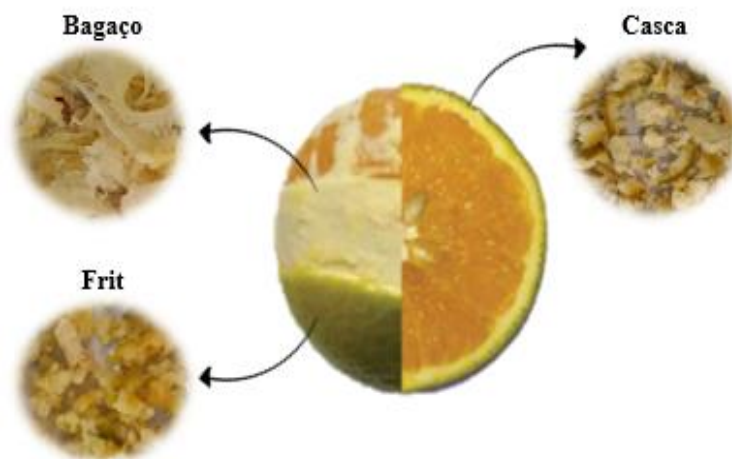


Figura 1. Resíduos sólidos (Bagaço, Casca e Frit) originados do processamento do suco de laranja (OKINO-DELGADO e FLEURI, 2014) modificado.

Tais substâncias podem ser aplicadas em diferentes áreas de estudo, como Saleem e Saeed (2020) que demonstraram o emprego das cascas de laranja como agente antimicrobiano natural. Outros estudos no campo farmacêutico são desenvolvidos sobre compostos fenólicos cítricos com potencial antioxidante (OZTURK et al., 2018). Pereira (2017) mostrou que os resíduos de laranja apresentaram aptidão em reduzir radicais de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo) em até 70% e avaliou a citotoxicidade sobre três linhagens celulares: HaCat (queratinócitos humanos), NHI-3t3 (fibroblastos de camundongo) e SCC9 (carcinoma epidermóide bucal).

Nas fábricas têxteis, esses resíduos podem ser utilizados como corantes naturais (KUMAR e DHINAKARAN, 2017). No campo da biotecnologia, são empregados em estudos para produção de biocombustíveis (OKINO-DELGADO et al., 2017; SANTOS et al., 2015) e ainda, na absorção de herbicidas em matrizes aquosas (PANDIARAJAN et al., 2018).

Os resíduos de laranja também são explorados na alimentação de ruminantes (LÓPEZ et al., 2010) e como suplemento na ração de aves (PAULO et al., 2019) e peixes (VICENTE et al., 2019). Notoriamente, tais resíduos estão sendo reaproveitados como subprodutos em inúmeros campos biotecnológicos.

1.1.2. Resíduos da Vitivinicultura

No âmbito da vitivinicultura (produção de vinhas e vinhos), a produção de vinhos representa uma das maiores atividades agrícolas do mundo. Contabilizada em 29,2 bilhões de litros em 2018, representa recuperação de 17% em relação ao ano anterior. Segundo relatório da OIV (*International Organisation of Vine and Wine*), nesse mesmo ano, o cultivo global de uva foi da ordem de 78 milhões de toneladas (OIV, 2019) e cerca de 80% da colheita foi destinada à fabricação de vinhos ocasionando geração de resíduos (casca, talos e semente) estimados em 20% do peso processado da fruta (TEIXEIRA et al., 2014). Isso representa excelente recurso nutritivo com potencial comercial e biotecnológico ainda pouco explorado.

A produção de uvas no Brasil representa 1,5 milhão de toneladas/ano, sendo que 50% destina-se a uvas de mesa, 24,5% para produção de vinhos, 24,5% para produção de sucos e 2% para confecção de produtos industrializados (EMBRAPA, 2020). Somente nas exportações em 2018, foram arrecadados US\$ 8,42 milhões correspondendo ao aumento de 182% do rendimento nos períodos calculados de 2005 a 2018. Em 2019, o Brasil exportou 3,7 milhões de litros de vinhos e espumantes (CONAB, 2020) representando recuo de 7,5%, em comparação ao ano anterior, devido às chuvas de granizo que atingiram as safras de 2018-2019. Esse perfil vitícola abre perspectivas diferenciadas no que diz respeito aos produtos obtidos da uva, uma vez que com as fortes chuvas, a colheita não pode ser aproveitada para os fins de produção de vinhos e sucos, mas pode servir para reaproveitar inclusive os resíduos provenientes da cadeia produtiva (EMBRAPA, 2018).

No Rio Grande do Sul, a produção é a maior do país, com 614,3 mil toneladas de uva (IBRAVIN, 2020). O Brasil exportou cerca de 39,8 mil toneladas de uvas frescas e arrecadou US\$ 88 milhões, aproximadamente, 88% das exportações do cultivo da uva (CONAB, 2020).

A principal espécie de uva destinada à produção de vinho é a *Vitis vinifera* (MELLO, 2014) e uma das variedades de maior volume processado é a Cabernet Sauvignon (RIZZON e MIELE, 2002). No entanto, essa cultivar atinge níveis de maturação tardios e para tanto, a variedade Cabernet Franc, com maturação adiantada em aproximadamente 20 dias, mostra-se como alternativa de substituição em vinhedos pelo risco da Cabernet Sauvignon não amadurecer completamente, principalmente em anos frios ou com volume acentuado de chuvas (BRIGHENTI et al., 2013). Além disso, a variedade Cabernet Franc produz vinhos mais suaves com maior teor de taninos, acidez controlada

e forte presença de aromas herbais, perfume de notas frescas e cítricas (WINES OF CHILE, 2019). Existem poucos estudos que abordem essa variedade em quaisquer esferas o que se torna uma lacuna muito interessante a ser aprofundada.

Resumidamente, para o entendimento dos resíduos utilizados nesta pesquisa, as etapas da vinicultura são: colheita, desengace e esmagamento, prensagem, fermentação, trasfega, clarificação e estabilização, amadurecimento e engarrafamento (RIZZON et al., 2003). Após o término da fermentação, para a produção de vinhos tintos secos (teor de açúcar tolerável em 4,0 g/L), ocorre a transferência de resíduos sólidos e leveduras para um tanque limpo - é nessa fase que os resíduos da uva são liberados no processo. Porém, para produção de vinhos tintos suaves, com teores de açúcar maiores que 20 g/L, os resíduos passam por novas fermentações para reutilizar sua coloração, ocasionando até em mistura de resíduos de variedades diferentes para intensificar a coloração do vinho (BRASIL, 1988).

O conteúdo resultante da produção se constitui em bagaço (casca e sementes) com rica composição funcional e de alto valor nutritivo, apresentando conteúdo fenólico em torno de 75% (ZHU et al., 2012; GHAFOOR et al., 2010; RUBILAR et al., 2007), como antocianinas, cianidinas, flavonoides, ácidos hidroxicinâmicos e hidroxibenzóicos, e estilbenos (FLAMINI et al., 2013; ROCKENBACH et al., 2011), exibindo propriedades antioxidativas (GRAEBIN et al., 2015), que podem ser aplicados nas áreas farmacêuticas e cosméticas (SOUZA e FERREIRA, 2010). Essas substâncias apresentam a capacidade de combater os radicais livres no organismo diminuindo riscos de doenças como câncer, Parkinson e Alzheimer (DEL FOLLO-MARTINEZ et al., 2013).

Outros trabalhos direcionam os resíduos de uva para indústrias alimentícias na produção de corantes, saborizantes, aromatizadores, farinhas para pães e biscoitos; e em indústrias de biocombustível para produção de biodiesel e bioetanol de 2ª geração (GARCÍA, 2019; FURLAN, 2015; ROSSI e DOS SANTOS, 2014; BAMPI et al., 2010).

Em relação à magnitude da geração de resíduos agroindustriais, algumas estratégias para minimizar esses obstáculos estão sendo desenvolvidas no âmbito tecnológico, por meio do reaproveitamento da biomassa em bioprocessos para a obtenção de substâncias bioativas como enzimas, pigmentos, biocombustíveis, antibióticos, entre outras, com alto valor agregado e bioquímico. Essa recuperação colabora na redução dos impactos ambientais e custos de produção (CUNHA et al., 2016).

1.1.3. Obtenção direta e indireta das biomoléculas a partir de resíduos

Compostos bioativos com diferentes aplicações biotecnológicas podem ser obtidos por fontes de origem animal, vegetal ou microbiana (NEVES, 2014). As enzimas vegetais, as quais podem ser obtidas de resíduos isolados (fonte direta), são vistas como mais seguras por serem naturais e, conseqüentemente, são empregadas com maior frequência nos processos farmacêuticos e alimentícios (FLEURI, 2016; SETH et al., 2014).

Apesar dos benefícios das enzimas vegetais, calcula-se que dentre 500 produtos industriais produzidos com enzimas, pelo menos 150 (30%) utilizam enzimas de micro-organismos (ZANUTTO-ELGUI, 2019; KUMAR e SINGH, 2013). O fato das enzimas microbianas ocuparem posição de destaque nas aplicações industriais, está diretamente relacionado às possibilidades de produzir múltiplos produtos e se utilizar de grande variedade de resíduos como substrato (fonte indireta) para o crescimento de micro-organismos. A combinação de diferentes substratos e parâmetros profícua em biomoléculas com pluralidade de propriedades catalíticas, ademais, os fungos filamentosos liberam as enzimas produzidas diretamente no meio em que estão, o que facilita a recuperação das mesmas (CASTRO e SATO, 2013; MUTHULAKSHMI et al., 2011).

Apesar de alguns estudos afirmarem que as enzimas vegetais possam ser mais baratas do que as microbianas (MOUNGUENGUI et al., 2013), os inconvenientes de tempo de obtenção, granulometria e manejo, tornam as enzimas microbianas mais exploradas pela indústria.

A produção de enzimas microbianas faz-se por processos fermentativos, nos quais os resíduos agroindustriais podem ser utilizados como substrato e caracterizar a forma indireta de obtenção de biomoléculas (ATHANÁZIO-HELIODORO et al., 2018; FLEURI, 2016). Os processos fermentativos, fermentação em estado sólido (FES) e fermentação submersa (FS), são elucidados pela Tabela 1 e a prevalência da FES sobre a FS de acordo com diversos fatores.

As vantagens proeminentes da FES sobre a FS se permeiam em aspectos econômicos, rendimento da produção, facilidade da técnica e recuperação dos produtos concentrados. Porém, alguns fatores ainda dificultam a disseminação da FES na indústria. Os biorreatores utilizados ainda não contemplam escalonamento para grandes processos industriais, se tornando um dos principais entraves da aplicação dessa fermentação. Além disso, para o crescimento dos micro-organismos é preferível que o tempo de cultivo para a esporulação seja o mais curto possível para evitar gastos com períodos de latência dos

esporos. Por se tratar de meio de cultivo sólido, dificuldades de controle de pH, umidade, oxigenação e homogeneidade são consideradas (MIENDA e IDI, 2011).

Tabela 1. Comparativos entre as fermentações em estado sólido e submersa (ARORA et al., 2018).

	FES	FS
Umidade Relativa	Volume do reator e risco de contaminação (<). Não há aparecimento de espumas. Custo do tratamento de efluentes: baixo	Volume do reator e risco de contaminação (>). Há o aparecimento de espumas. Custo do tratamento de efluentes: alto
Meio fermentativo	Baixo custo e natural. Suplemento mineral mínimo.	Utilização de produtos químicos altamente purificados elevando o custo.
Ambiente natural	Mimetismo do ambiente natural dos fungos.	Substrato dissolvido não proporciona o habitat natural para fungos.
Produtividade volumétrica	Produtividade relatada comparativamente mais alta.	Menor produtividade volumétrica é frequentemente associada ao FS.
Processo e obtenção do produto	Processo simplificado, o produto é altamente concentrado.	A concentração e purificação do produto encarecem o processo.
Aspectos ambientais	O reaproveitamento de resíduos naturais como substrato mantém a energia de biomassa.	Sustentabilidade ambiental significativa não é possível com o uso de constituintes de meios sintéticos e processados de alto grau analítico.

Dessa forma, pode-se vislumbrar a obtenção de biomoléculas a baixo custo reaproveitando resíduos isolados (fonte direta) e fermentados (fonte indireta) de acordo com as características bioquímicas mais adequadas ao bioprocessos escolhido e aplicação desejada.

1.2. Enzimas

Nas últimas décadas, a procura por tecnologias limpas está mobilizando grandes empresas a investirem em processos enzimáticos em substituição às catálises químicas (CHOI et al., 2015). Em 2018, a produção de biocatalisadores contabilizaram US\$ 5,5 bilhões no comércio mundial, com percentual de crescimento pautado em 4,9% ao ano, estima-se o aumento de US\$ 7 bilhões até o ano de 2023 (BCC RESEARCH, 2018).

Atualmente, a política brasileira de biocatalisadores se fundamenta, primordialmente na importação de enzimas, além disso, utiliza-se pouco dessas biomoléculas produzidas ou importadas nas indústrias em relação a outros países. Sendo assim, é necessá-

rio incorporar esta realidade de tecnologia enzimática ao contexto brasileiro (MONTEIRO e SILVA, 2009). Esse cenário abre perspectivas diferenciadas para a obtenção dessas substâncias de grande valor agregado por diversas metodologias já mencionadas.

1.2.1. Fitases

As fitases (E.C. 3.1.3.26) possuem capacidade de hidrolisar o ácido fítico em fosfato inorgânico e fosfato mio-inositol (JOSHI e SATYANARAYANA, 2015; BOHN et al., 2008), através da desfosforilação do fitato e formação de isômeros.

As classes de fosfatases determinadas pela IUPAC (União Internacional de Química Pura) podem ser classificadas através de sua regiosseletividade e o pH da atividade enzimática. Sendo assim, elas podem ser denominadas de 3-fitase (EC 3.1.3.8 ou mio-inositol hexacisfosfato 3-fosfo-hidrolase) ou 6-fitase (EC 3.1.3.26 ou mio-inositol hexacisfosfato 6-fosfo-hidrolase) de acordo com o local do primeiro fosfato a ser hidrolisado (SELLE e RAVINDRAN, 2007). Em relação ao pH ótimo, são nomeadas de: fosfatases ácidas histidinas com pH em torno de 5,0; ou fitases alcalinas com atividades mais proeminentes em torno do pH 8,0 (BARUAH et al., 2007).

O ácido fítico (fitato) é a principal estrutura de armazenamento de fósforo nos vegetais, porém na dieta foi considerado um componente antinutricional por quelar fortemente a alguns cátions, afetando a absorção e digestão de minerais: cálcio, cobre, ferro, magnésio, potássio e zinco (KONIETZNY e GREINER, 2003). Além disso, várias investigações atestaram que o fitato altera as estruturas proteicas, modificando o comportamento das mesmas (O'DELL e DE BOLAND, 1996). Também se aglomeram com carboidratos diminuindo sua degradação e inibindo a ação da amilase (SELLE et al., 2000), e lipídeos, criando o complexo lipofitina que pode desenvolver sabões metálicos no lúmen do intestino (VOHRA e SATYANARAYANA, 2003).

A ação da fitase, portanto, se estabelece para impedir a formação de complexos fitato-macromoléculas, atenuando os efeitos negativos e diminuindo a eutrofização nos ambientes aquáticos, uma vez que reduz a quantidade de fósforo liberados nas fezes de animais aquáticos, por exemplo (VICENTE et al., 2019; NOVELLI et al., 2016; SAPNA e SINGH, 2016).

Entretanto, outros autores relatam algumas propriedades benéficas do fitato na alimentação. De acordo com Vucenik e Shamsuddin (2003) e Shamsuddin (2002), foram avaliados potencial anticarcinogênico do fitato. Além disso, Minihane e Rimbach (2002) atestaram o efeito antioxidante da molécula, explicações que se baseiam em estruturas

tridimensionais específicas da complexação com o ferro que impedem a geração de radicais hidroxila. O papel dietético foi observado e revelou que o fitato pode diminuir a resposta à glicose sanguínea e regular a secreção de insulina pelo pâncreas (THOMPSON, 1993). Sendo assim, a influência do fitato na dieta necessita de mais estudos para determinar em quais circunstâncias se estabelece sua vilania ou benefício (KUMAR et al., 2010).

1.2.2. Lipases

As lipases (E.C. 3.1.1.3) possuem habilidade de hidrolisar triacilgliceróis ou sintetizar ésteres de ácidos graxos (MIRANDA et al., 2015) a partir de interface óleo-água. Dessa forma, esses biocatalisadores possuem a capacidade de reverter as reações químicas quando em condições de pouca ou nenhuma presença de água. Essas reações se referem à esterificação e transesterificação (VESCOVI, 2012).

Como elucidado por Andualema e Gessesse (2012), as lipases apresentam propriedades distintas de especificidade, estabilidade e regiosseletividade (BARBOSA et al., 2015). Despontaram com grande potencial no mercado superexplorado de lipídeos avaliado em bilhões de dólares (JOSEPH et al., 2008), o que se deve também às pesquisas com clonagem e expressão dessas enzimas em micro-organismos. No entanto, alguns pontos negativos acerca das lipases são discutidos, como o fato delas agirem de maneira mais eficiente em condições moderadas de pH e temperaturas e possuírem atividade enzimática muito mais fraca em comparação com os catalisadores químicos em processos de altas temperaturas, por exemplo, aumentando custos de produção e consumindo mais tempo do processo (SINGH e MUKHOPADHYAY, 2012).

As lipases dispõem de ampla atuação em indústrias de detergentes, farmacêuticas, alimentícias (aditivos alimentares), fábricas de papel (controle da formação de hidrocarbonetos residuais resultantes da formulação de papel, chamado de pitch), biopolímeros, cosméticos, biodiesel e biossensores (ANOBOM et al., 2014; FLEURI et al., 2014; SINGH e MUKHOPADHYAY, 2012). A partir das reações de hidrólise, pode ser utilizada para biorremediação de óleos e gorduras no ramo da oleoquímica (OKINO-DELGADO et al., 2017; NWOBİ et al., 2006).

1.2.3. Proteases

As proteases (E.C. 3.4.21.12) são enzimas ubíquas extremamente hábeis em hidrolisar ligações peptídicas de proteínas, podendo atuar em ligações ésteres e amidas (KOBLITZ et al., 2014). Correspondem a 60% do mercado mundial enzimático e mais de 25% das enzimas produzidas para aplicação industrial (NOVELLI et al., 2016; CASTRO e SATO, 2013; RAMAKRISHNA et al., 2010). De acordo com seu comportamento são classificadas em endopeptidases e exopeptidases, dependendo se atuam no interior ou na extremidade da cadeia polipeptídica e do sítio de ação dessas enzimas nas proteínas (TAVANO, 2013).

Como qualquer outra enzima, a ação das proteases está diretamente condicionada às condições bioquímicas como faixas de temperatura e pH ótimos, estabilidade enzimática, afinidade e especificidade ao substrato e ao sítio ativo. Todos esses aspectos são relevantes, pois podem comprometer o poder hidrolítico da enzima (MOLINA et al., 2013).

Enzimas proteolíticas possuem função primordial participando de inúmeros e complexos processos metabólicos. Elas apresentam papel importante no catabolismo de proteínas, disponibilização de hormônios, mecanismos de defesa, transporte intramembrana, coagulação sanguínea, crescimento de tumores, regulação da expressão gênica e apoptose celular (NEVES, 2014; KONNO et al., 2004; POZA et al., 2003; GODFREY e WEST, 1996).

Tais enzimas podem ser utilizadas em inúmeros processos biotecnológicos. No âmbito alimentício, atuam em cervejarias, indústria de laticínios e amaciante de carne (CASTRO e SATO, 2013; MAZORRA-MANZANO, 2013); na indústria têxtil, auxiliam no processamento do couro, degomagem da seda e retirada de pele animal; no campo farmacêutico, seu uso é destinado para atividades digestivas, nutracêuticas, inflamatórias, produtos para limpeza de lentes de contato e remoção de prata de raio-x; no tratamento de água e esgotos (JOSHI e SATYANARAYANA, 2013; FORNBACKE e CLARSUND, 2013; ZAMBARE et al., 2011; PAWAR et al., 2009).

1.3. Atividades biológicas dos resíduos de laranja e uva

Moléculas tidas como compostos bioativos em plantas são provenientes do metabolismo secundário vegetal que eliciam efeitos farmacológicos e toxicológicos em humanos e animais (BERNHOF, 2010), podendo apresentar efeitos nos sistemas biológicos,

justificando o conceito ‘bioativo’, e assim, conservando atributos importantes para à saúde (AZMIR et al., 2013). Substâncias como terpenos, ácidos graxos, compostos fenólicos, pigmentos, vitaminas e carotenoides (COSTA e JORGE, 2011).

Tais compostos obtidos de resíduos agroindustriais podem apresentar diversas outras atividades biológicas, além de ação enzimática. Os resíduos de laranja e uva possuem ação antioxidante, antimicrobiana, antidiabética, antineoplásica e anti-inflamatória (SALEEM e SAEED, 2020; HASSAN et al., 2019; SHAHRAM et al., 2019; ATHANÁZIO-HELIODO et al., 2018; CÁDIZ-GURREA et al., 2017; PEREIRA, 2017; PEREIRA et al., 2017; SHARMA et al., 2017; XU et al., 2014; CLIFTON, 2004). Algumas dessas atividades serão discutidas a seguir.

1.3.1. Atividade antioxidante

As espécies reativas de oxigênio (ERO's) são agentes que estão desemparelhados devido ao ganho de elétrons, se tornando instáveis e extremamente prejudiciais a nível fisiológico (HALLIWELL, 2007). Naturalmente são sintetizadas no organismo aeróbico através da respiração celular, porém o acúmulo de ERO está relacionado a inúmeras doenças degenerativas multifatoriais como Parkinson, Alzheimer, neoplasias, doenças cardiovasculares e diabetes (DÁVALOS et al., 2004; AKPAFFIONG e TAYLOR, 1998; AMES et al., 1993).

Os compostos com atividade antioxidante são de suma importância para neutralizar os radicais livres e diminuir possíveis danos oxidativos e, conseqüentemente, doenças associadas ao envelhecimento. O modo de ação pode classificá-los como: a) antioxidantes primários, os quais impedem a ocorrência da reação, tornando os radicais livres estáveis através da doação de hidrogênio ou por meio de receptores; e b) antioxidantes secundários que inibem a oxidação eliminando os promotores, íons metálicos, oxigênio molecular, entre outros (SHAHIDI e ZHONG, 2015).

As técnicas de mensuração de antioxidante podem ser aplicadas por diferentes métodos: a) DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) um dos testes mais utilizados que se baseia no consumo do radical do sal por composto antioxidante, geralmente fenólico (KEDARE e SINGH, 2011); b) ABTS 2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolína-6-ácido sulfônico) se fundamenta no sequestro do sal de amônio do ácido (RE et al., 1999); c) ORAC (*Oxygen Radical Absorbance Capacity*) que se apoia na redução do radical oxigênio, a qual respalda sua ação sobre o radical peroxila também oxidante menos reativo do que grupos OH (DÁVALOS et al., 2004); e d) FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*)

que possui potencial de produção de íon Fe^{2+} (forma ferrosa) a partir da redução do íon Fe^{3+} (forma férrica) (BENZIE e STRAIN, 1996).

Os resíduos de laranja e uva são descritos na literatura como potentes antioxidantes (OZTURK et al., 2018). O comportamento dos resíduos de laranja deve-se às mais de 170 substâncias antioxidantes existentes em frutas cítricas (ZHOU, 2012), como os carotenoides, mas principalmente referindo-se à presença de flavonoide hesperidina (PEREIRA, 2017) que ainda apresenta ação antineoplásica (DEVI et al., 2015), antidiabética (UMENO et al., 2016), antimicrobiana e anti-inflamatória (IRANSHAHI et al., 2015).

Nos estudos de Al-Ashaal e El-Sheltawy (2011) foram analisadas as concentrações de hesperidina na casca de laranja atestando que ela é um dos principais agentes antioxidantes em *Citrus* corroborando com Palma et al. (2004) e Balakrishnan e Menon (2007), os quais asseguraram esse efeito sobre toxicidade induzida por nicotina em ratos machos Wistar.

Inúmeros estudos relataram atividades antioxidantes de resíduos de laranja. Ghosh et al. (2019) avaliaram o potencial antioxidante em cascas de laranja, manga e romã, a partir de diferentes soluções extratoras (100% água, 100% etanol e 80% metanol) por DPPH e FRAP e obtiveram resultados menos expressivos para casca de laranja em ambas metodologias, não apresentando diferença estatísticas para FRAP (23,32, 17,48, 28,96 $\mu\text{M Fe (II)/mg}$). Bier et al. (2019) analisaram o potencial antioxidante de resíduos de laranja isolados e fermentados por fungo *Diaporthe* sp. pelos métodos ORAC, DPPH e CUPRAC (capacidade antioxidante redutora de íons cúpricos) e obtiveram resultados melhores para os fermentados em todos os testes realizados.

Já a composição da fruta da uva é muito rica em compostos fenólicos, flavonoides e estilbenos, e as atividades antioxidantes relatadas provenientes de seus resíduos são muito exploradas em trabalhos científicos (ROCHA et al., 2019; SILVA et al., 2017). Tang et al. (2018) examinaram a capacidade antioxidante, o caráter fenólico e de flavonoide em 30 variedades de sementes e cascas de uva identificando vários compostos fenólicos (ácido gálico, cianidina-3-glicosídeo, epicatequina, galato de catequina, ácido ferúlico, rutina e resveratrol) hábeis em contribuir para tal ação biológica.

Hassan et al. (2019) avaliaram o teor antioxidantes de sementes de uva em diferentes solventes orgânicos (metanol, etanol, clorofórmio e acetona) utilizando teste de DPPH e HPLC para quantificar compostos fenólicos. Diversos métodos convencionais (extração de sólido-líquidos, aquecimento, retificação) e não convencionais de extração (campos

elétricos pulsados, descargas elétricas de alta tensão, aquecimento ôhmico pulsado, ultrassons, micro-ondas, extrações de fluidos sub e supercríticos, pressurização) são estudados a fim de se obter antioxidantes (BARBA et al., 2016).

Tinello e Lante (2017) analisaram a capacidade antioxidante em bagas de Merlot e suco de uvas verdes através de DPPH e FRAP. Cascas de uvas brancas e vermelhas por DPPH foram testadas por processos térmicos e frescos de extração, apresentando maiores valores às cascas de uvas vermelhas (VODNAR et al., 2017). Por sua vez, Mirbagheri et al. (2018) trabalharam com extratos de sementes de uvas vermelhas, pretas e verdes do Irã, os quais apresentaram maiores valores às vermelhas e menores às verdes, correlacionados fortemente a cor com o perfil fenólico quantificado.

Esses estudos demonstram a variedade de conteúdo fenólico e caráter antioxidante presente nesses resíduos decorrentes de maturação do fruto, tempo de colheita, alterações climáticas, origem geográfica e condições de armazenamento (LASANTA et al., 2014). Embora existam vastas pesquisas sobre as atividades antioxidantes e composição fenólica de uvas e seus resíduos (ORAK, 2007), pouco se perscruta sobre variedades de resíduos mais próxima à realidade industrial, obtidas por processos de fabricação de vinhos suaves em que se misturam classes de uvas para se alcançar a coloração desejada, ou ainda, estilos de uvas pouco comuns como Cabernet Franc, dos quais são objeto de estudo neste trabalho.

1.3.2. Atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana dos resíduos de laranja e uva foi descrita para vários patógenos. Shahram et al. (2019) relataram a ação antibacteriana dos resíduos de laranja processados manualmente contra *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* comumente conhecidos por causarem intoxicações alimentares, mostrando que as gram-positivas foram mais sensíveis aos tratamentos do que as gram-negativas.

Tais resultados contrastam com os achados de Saleem e Saeed (2020) que testaram cascas de laranjas obtidas manualmente no combate de uma gama maior de bactérias, em que as gram-negativas (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium* e *Serratia marcescens*) atestaram sensibilidade de 20 a 30% maior do que as cepas gram-positivas (*Aeromonas hydrophila*, *Enterococcus faecalis*, *Lactobacillus casei*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pyogenes*).

O estudo ainda comparou as cascas de laranja, limão e banana em ação antifúngica sobre *Aspergillus niger*, *Candida albicans*, *Penicillium citrinum* e *Saccharomyces cerevisiae*, por diferentes métodos de extração aquosa e aferição através da concentração mínima de inibição (*Minimum Inhibitory Concentration* – MIC) e método de difusão em poços, nos quais demonstraram atividades inibitórias ineficazes para *P. citrinum* e *S. cerevisiae* e moderadamente efetivo para *A. niger* e *C. albicans* (SALEEM e SAEED, 2020).

Sementes e polpa de laranja foram avaliadas por método de difusão em poços contra *E. coli*, *P. fluorescens* e *S. aureus*, deparando-se com valores mais promissores para a polpa (ARORA e KAUR, 2013).

Estudos de atividade antimicrobiana e perfil fenólico foram realizados para os resíduos de uva vermelha e branca tratados ou não com processo térmico, apresentando melhores resultados contra cepas de *S. aureus* que se mostraram menos resistência aos tratamentos dentre as estirpes testadas: *Bacillus. cereus*, *E. coli*, *Enterococcus faecalis*, *Fusarium nucleatum*, *L. monocytogenes*, *P. aeruginosa*, *Pseudomonas anaerobius*, *S. aureus*, *S. Typhimurium*, através de MIC e MFC (*Minimum Fungicidal Concentration*) (VODNAR et al., 2017).

Além disso, nessa pesquisa também se observou que os resíduos de uvas vermelhas obtiveram melhores resultados em comparação com as brancas, os quais foram correlacionados aos teores de polifenóis existentes nos frutos. Atividades antifúngicas contra *Aspergillus flavus*, *A. niger*, *C. albicans*, *Candida parapsilosis* e *Penicillium funiculosum* também foram testadas e a performance que despontou foi a ação dos resíduos de uva contra *A. flavus*. Os autores concluíram que esses resíduos detinham os maiores valores de atividade antimicrobiana devido às altas concentrações de antocianinas reportadas (VODNAR et al., 2017).

Foram relatadas ações antagônicas de caules e cascas de uvas verdes em fungos causadores de micoses como *Candida*, *Microsporum* e *Trichophyton* (WHITE et al., 2014) por MIC correlacionando com os níveis de poliméricos flavan-3-ol, outro grupo de compostos fenólicos presentes em resíduos de uva que possuem atividades antimicrobianas recentemente descobertas pelos autores (SIMONETTI et al., 2019; PASQUA e SIMONETTI, 2016).

Soto et al. (2019) compararam a capacidade antimicrobiana de resíduos de laranja e uva (Cabernet Sauvignon) a partir da síntese de nanopartículas de prata utilizadas para combater *E. coli* (ATCC 25922) e *L. monocytogenes* (ATCC 35152). O grupo mexicano

observou, através do método de difusão e densidade óptica, que para a inibição da bactéria gram-positiva, não foram registradas diferenças entre os extratos, entretanto, para a gram-negativa, apenas as nanopartículas produzidas a partir de resíduos de uva exibiram inibição.

1.3.3. Atividade antidiabética

O diabetes é uma doença causada pela produção insuficiente ou absorção inapta do hormônio insulina que regula a glicose sanguínea. Decorre da complexa interação multifatorial, a saber: fatores genéticos, socioeconômicos e comportamentais (GROSS et al., 2002).

Segundo a Federação Internacional de Diabetes (IDF, 2019), 463 milhões de pessoas têm diabetes, aproximadamente 9,3% da população mundial, sendo que metade dessa porcentagem se refere a casos que não são diagnosticados (SBEM, 2019).

O país com maiores índices de diabéticos é a China com 116,4 milhões de pessoas acometidas. O Brasil ocupa a 5ª posição com 13 milhões de diabéticos, aproximadamente 6,9% da população de brasileiros (SBD, 2019). Indicadores afirmam que 10% (US\$ 760 bilhões) dos gastos globais com saúde estão relacionados à Diabetes.

A Figura 2 mostra a relação de adultos diabéticos, entre 20 a 79 anos, e a população de cada região do mundo. Nota-se que a região do Oriente Médio e Norte da África possuem os maiores indicadores, já a região da África possui as menores porcentagens, isso se deve às condições de subnutrição e baixos índices de urbanização (IDF, 2019).

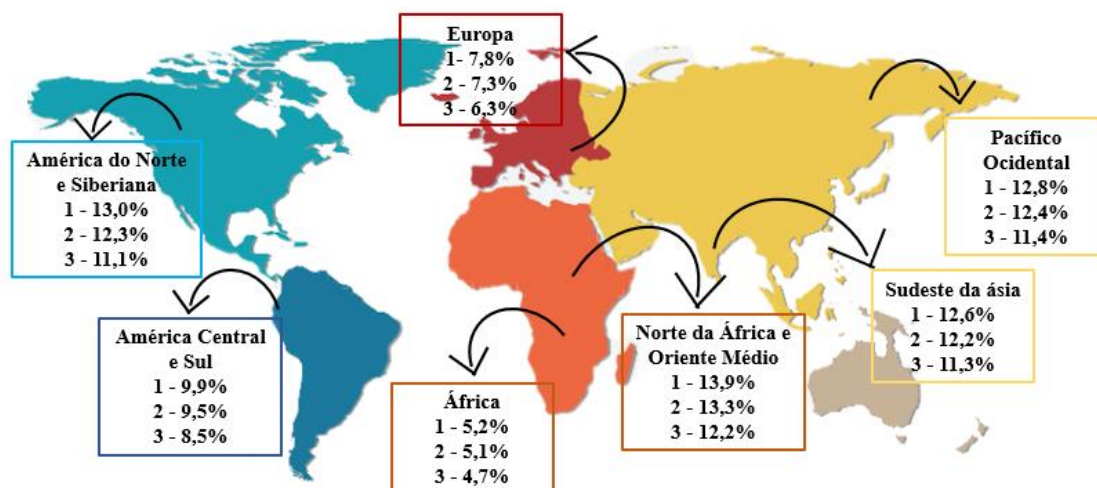


Figura 2. Análise atual e estimada dos anos 2030 e 2045 no predomínio de diabéticos adultos, que possuem de 20 a 79 anos, em 7 regiões do globo: América do Norte e Caribe, América Central e Sul, África do Norte e Oriente médio, África, Sudeste da Ásia, Europa e Oeste do Pacífico. Representação dos anos analisados (1) 2045; (2) 2030 e (3) 2019 (IDF, 2019) modificado.

Os tipos de diabetes (1 e 2) são discriminados segundo a produção de insulina pelo pâncreas. No tipo I, a insulina não é produzida ou poucos níveis são liberados pelas células beta, denominada ainda como doença autoimune. Já o tipo II, que acomete 90% da população diabética e está associado ao ganho de peso, o organismo possui certa resistência à insulina produzida (GROSS et al., 2002).

Diante dessa problemática mundial, tornam-se de extrema importância os estudos para minimizar as atribuições e baratear os fármacos disponibilizados. Fayek et al. (2017) utilizaram cascas de *Citrus*, (*C. reticulata* Blanco cv. Egípcia), laranja doce (*C. sinensis* L. Osbeck cv. Olinda Valência), toranja branca (*C. paradisi* Macfad. cv. Duncan) e limão (*C. paradisi aurantifolia* (Christm.) Swingle cv. Mexicano), em testes *in vivo* para avaliar efeitos antidiabéticos e hipocolesterolêmico observando que seus níveis são diretamente proporcionais às quantidades de nobiletina (flavonas polimetoxiladas - classe de PMF) aferidas (TSUTSUMI et al., 2014).

Muhtadi et al. (2015) também realizaram testes com 20 ratos Wistar induzidos a diabetes, para atestar atividades antidiabéticas de cascas de laranja doce em diferentes dosagens diárias (45, 125, 250, 500 mg/kg peso corporal). Após 15 dias de tratamento, a maior concentração administrada de extratos da casca (500 mg/kg) apresentou melhor resultado de redução (61,3%) dos níveis de glicose sanguíneo dentre os demais ensaios.

Dietas com biscoito de trigo suplementados com 10% de casca de laranja também foram avaliadas para diminuir os níveis glicêmicos em ratos diabéticos (YOUSSEF et al., 2013). Dentre as quatro variedades testadas (laranja Baladi, laranja Abo-Sora, tangerine e limão Baladi) a laranja Baladi apresentou maiores valores para a diminuição de peso e níveis glicêmicos nos animais.

Doshi et al. (2015) estudaram a utilização de extratos preparados por meio de semente, casca e talo de uva (*Pusa navaranga* e *Merlot*) para avaliar o efeito insulínico, verificando aumento da secreção de insulina pelas ilhotas do pâncreas de camundongos nas diferentes variedades e resíduos testados, o que permite vislumbrar possíveis tratamento ao diabetes tipo 2.

Extratos de casca de Cabernet Sauvignon também foram relatados como estimulantes para produção de insulina em diferentes concentrações atrelando tais resultados aos compostos extraídos da casca, ou seja, ao ácido oleanólico, substância mais abundante na casca do que antocianinas com ação antioxidante, anti-inflamatória, anti-lipídêmica; e resveratrol, polifenol com ação antioxidante e anti-inflamatória (ZHANG et al., 2004). O ácido oleanólico foi avaliado no controle da glicemia pós-prandial em ratos diabéticos a

partir de folhas de oliveiras constatando a inibição da atividade da amilase pancreática humana entorno de IC 0,1 mg/mL (KOMAKI et al., 2003).

Patel (2015) verificou que novos tratamentos contra a diabetes tipo 2 estão relacionados aos inibidores da dipeptidil-peptidase 4 (DPP4), dessa forma, ratificou-se que as procianidinas derivadas de sementes de uva podem modular a atividade e expressão da DPP4. A inibição dessa atividade enzimática chave pode ajudar na homeostase da glicose diretamente ou pela expressão gênica (GONZALEZ-ABUIN et al., 2012).

Por meio de estudos com oito voluntários saudáveis, Sapwarobol et al. (2012) demonstraram que a ingestão de extrato de semente de uva, juntamente com uma refeição rica em carboidratos, afeta a glicemia pós-prandial. Tal efeito moderador da hiperglicemia foi atribuído à inibição da α -glucosidase intestinal e da α -amilase pancreática pelo extrato consumido.

1.3.4. Modulação celular – ênfase em citotoxicidade

A investigação sobre a citotoxicidade celular proporciona informações sobre o comportamento tóxico dos mecanismos bioquímicos celulares. A citotoxicidade celular foi observada em hesperidina extraída de cascas de laranja contra células de carcinomas de fígado (HPg2), mama (MCF7), colo do útero (HeLa) e laringe (HeP2) por metodologia ELISA. Os resultados revelaram altas taxas de inibição (IC) em todas as linhagens cancerígenas, porém mais acentuadamente para carcinogênese da laringe (HANAN et al., 2011).

Estudos com nanopartículas de prata à base de cascas de laranja apresentaram citotoxicidade contra linhagens de câncer de pulmão (A549) devido à indução de apoptose específica durante o ciclo celular em G0/G1 (ANNU et al., 2018)

O desempenho de flavonoides de *Citrus* como a tangeretina foi reportado na indução de apoptose em células de leucemia promielocítica humana (HL-60). Células tumorais de roedores (L-929) sofrem processo de morte celular pela ação dos flavonoides estimulando TNF- α (fator de necrose tumoral) a induzir apoptose (MANTHEY et al., 2001).

Quatro variedades de laranja foram estudadas em casca e frit de laranja extraídos em água para avaliar a citotoxicidade presente em três linhagens celulares: HaCat, NHI-3t3 e SCC9. Para casca, a cultivar Hamlin, nas concentrações de 10 e 20%, obteve melhores resultados em inviabilizar o crescimento de SCC9, o que também se manteve para o frit nas frações de Hamlin, Valência e Natal, já a variedade Pêra aumentou o metabolismo das células cancerígenas nas diferentes frações e concentrações (PEREIRA, 2017).

Hidrolisados de óleos de milho e girassol por resíduos de laranjas Hamlin foram testados quanto à viabilidade celular de HaCat, NHI-3t3 e SCC9, apresentando resultados promissores em que os hidrolisados de óleo de milho catalisados a partir do sistema 5 - frit fermentado em *Penicillium* sp. 02, foi o único que diminuiu o crescimento das linhagens NHI-3t3 e SCC9 na concentração de 20%, todos os outros sistemas de hidrólise estimularam o crescimento da HaCat e NHI-3t3. Já para os hidrolisados de óleo de girassol, a concentração de 10% do sistema 1 – *A. niger* CBMAI 2084 em substrato frit, conseguiu diminuir a proliferação celular de SCC9, porém em todas as concentrações testadas (5, 10 e 20%) também diminuiu a taxa de crescimento celular de NHI-3t3, os outros produtos de reação testados promoveu o crescimento de NHI-3t3 e HaCat (ATHANÁZIO-HELIODORO et al., 2018).

Nassiri e Hosseinzadeh (2016) realizaram revisão bibliográfica acerca das propriedades bioativas encontradas em resíduos de uva. Dentre elas, efeitos anticancerígenos e apoptose induzida em linhagens de câncer de cólon foram identificadas em semente de uva Italia e Palieri (DINICOLA et al., 2012). Derry et al. (2013) efetuaram testes com extratos de semente de uva induzindo apoptose em linhagens de câncer colorretal (SW480, SW620 e HCT116) e aferiram a liberação do citocromo c, além da perda da atividade mitocondrial das células carcinogênicas.

Houve correlação na ação das proantocianidinas no aumento da sensibilidade radioelétrica do carcinoma hepático humano (HepG2), câncer cervical humano (HeLa) e linhagem celular de leucemia humana (K562) em relação aos raios-X avaliado *in vitro*, altos níveis contra as K562 foram atribuídas ao comportamento modulador das proantocianidinas, as quais são encontradas em maior concentração conhecida (95%) em sementes de uva *Vitis vinifera* (PAN et al., 2012).

Embora tenham sido constatados os potenciais citotóxicos dos resíduos de laranja e uva em vários estudos experimentais em animais e ensaios celulares, é necessário realizar estudos clínicos para confirmar a ação dos componentes ativos em humanos.

1.3.5. Atividade anti-inflamatória

O processo inflamatório é a resposta às lesões celulares e teciduais, caracterizadas por aumento de permeabilidade vascular, fluxo celular no local e migração de leucócitos (especialmente neutrófilos), ocasionando eventualmente edemas. Seu objetivo principal

é a eliminação do agente infeccioso através de destruição tecidual e, para tanto, são necessários mediadores químicos da inflamação (advindos do plasma, células dos tecidos endotelial e conjuntivo, plaquetas e leucócitos) (ABBAS et al., 2008).

Apesar de se tratar de processo fisiológico normal, pessoas com doenças autoimunes e respostas alérgicas não conseguem controlar a resposta inflamatória fazendo-se necessária a administração de compostos anti-inflamatórios. Após estudos iniciais sobre a origem dessas substâncias em vegetais (SALGADO e GREEN, 1956), muitos outros trabalhos se sucederam para entender sobre os melhores métodos de extração e os mecanismos de ação (BENAVENTE-GARCÍA e CASTILLO, 2008; MANTHEY et al., 2001; GÁBOR, 1979).

Recentemente, propriedades anti-inflamatórias foram associadas a flavonoides em *Citrus*. Chen et al. (2017) compararam cascas de laranja (*Citrus reticulata*) de cinco diferentes localidades e obtiveram, através de ensaios de Western Blot e RT-qPCR, correlação de altas atividades anti-inflamatórias e altos rendimentos de polifenóis e flavonoides. As flavonas polimetoxiladas (PMFs) são potentes inibidores de TNF- α , uma classe de citocinas secretadas por macrófagos capazes de matar células tumorais (MANTHEY et al., 1999). Os teores de hesperidina, nobiletina e tangeretina encontradas também aumentaram significativamente a expressão das propriedades anti-inflamatórias (HO e KUO, 2014; LONDOÑO-LONDOÑO et al., 2010).

Outros estudos apontam as PMFs como responsáveis pelos altos efeitos anti-inflamatórios mostrados na expressão gênica (MURAKAMI et al., 2000). Gossiau et al. (2014) realizaram testes *in vivo* em edema induzido nas patas de camundongo, relatando o potencial anti-inflamatório comparável aos efeitos de ibuprofeno, por meios de análises nutrigenômicas. Curiosamente, as PMFs são exclusivamente encontradas em cascas de *Citrus* (*Citrus sinensis* e *Citrus reticulata*) (GOSSLAU et al., 2014; LI et al., 2006).

As sementes e cascas de uvas também são relatadas como potenciais anti-inflamatórias, mas os polifenóis protagonistas neste caso são as proantocianinas que apresentaram altas atividades após testes de expressão de MCP-1 (*Monocyte Chemoattractant Protein-1*), marcador de inflamação vascular, em células endoteliais da veia umbilical humana (HUVECs) (CÁDIZ-GURREA et al., 2017).

Ferri et al. (2017) utilizaram resíduos de uva branca (*Vitis vinifera* L., mistura de cultivares Trebbiano e Verdicchio) para obter ações antioxidantes, anti-tirosinases e anti-inflamatórias em solvente a base de água e álcool. Os extratos à base de água apresentaram melhores resultados de diminuição da resposta inflamatória induzida por TNF- α .

As vantagens dos resíduos investigados neste trabalho em comparação com os descritos na literatura se fundamenta no fato de serem advindos diretamente do processo industrial, ou seja, grande quantidade de material disponível, continuação da cadeia produtiva e respeito ao conteúdo bioquímico da biomassa, sem submetê-la a alterações estruturais drásticas e, conseqüentemente, sem afetar os compostos bioativos presente nos resíduos, mais próximo da realidade industrial da matéria-prima estudada. Ademais, os resíduos de laranja orquestrados nesta pesquisa se diferem dos apresentados inclusive pelo nosso grupo de estudo, até o presente momento, devido a adição de água em seu processo de obtenção no processamento do suco, o que contribui para explorar este caráter distinto dos resíduos.

Referências Bibliográficas

ABBAS, A. K.; FAUSTO, N.; MITCHELL, R. N.; KUMAR, V. **Robbins Patologia Básica**. Elsevier Brasil, 2008.

AKPAFFIONG, M. J.; TAYLOR, A. A. Antihypertensive and vasodilator actions of antioxidants in spontaneously hypertensive rats. **American Journal of Hypertension**, v. 11, n. 12, p. 1450-1460, 1998.

AL-ASHAAL, H. A.; EL-SHELTAWY, S.T. Antioxidant capacity of hesperidin from citrus peel using electron spin resonance and cytotoxic activity against human carcinoma cell lines. **Pharmaceutical Biology**, v. 49, n. 3, p. 276-282, 2011.

AMES, B. N.; SHIGENAGA, M. K.; HAGEN, T. M. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 90, n. 17, p. 7915-7922, 1993.

ANDUALEMA, B.; GESSESSE, A. Microbial lipases and their industrial applications. **Biotechnology**, v. 11, n. 3, p. 100-118, 2012.

ANNU, M.; AHMED, S.; KAUR, G.; SHARMA, P.; SINGH, S; IKRAM, S. Fruit waste (peel) as bio-reductant to synthesize silver nanoparticles with antimicrobial, antioxidant and cytotoxic activities. **Journal of Applied Biomedicine**, v. 16, n. 3, p. 221-231, 2018.

ANOBOM, C. D.; PINHEIRO, A. S.; DE-ANDRADE, R. A.; AGUIEIRAS, E. C.; ANDRADE, G. C.; MOURA, M. V.; ALMEIDA, R. V.; FREIRE, D. M. From structure to catalysis: Recent developments in the biotechnological applications of lipases. **BioMed Research International**, v. 2014, 2014.

ARANHA, C. P. M. **Caracterização de óleos extraídos de sementes de laranjas (*Citrus sinensis*) como aproveitamento de resíduos agroindustriais**. Dissertação (Mestrado na área de Engenharia e Ciência de Alimentos) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista ‘Júlio de Mesquita Filho’, São José do Rio Preto-SP, 2011.

ARORA, M.; KAUR, P. Antimicrobial & antioxidant activity of orange pulp and peel. **International Journal of Science and Research**, v. 2, p. 412-415, 2013.

ARORA, S.; RANI, R.; GHOSH, S. Bioreactors in solid state fermentation technology: Design, applications and engineering aspects. **Journal of Biotechnology**, v. 269, p. 16-34, 2018.

ATHANÁZIO-HELIODORO, J. C.; OKINO-DELGADO, C. H.; FERNANDES, C. J. C.; ZANUTTO, M. R.; PRADO, D. Z.; SILVA, R. A.; FACANALI, R.; ZAMBUZZI, W. F.; MARQUES, M. O. M.; FLEURI, L. F. Improvement of lipase obtaining system by orange waste-based solid-state fermentation: production, characterization and application. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v. 48, n. 7, p. 565-573, 2018. <https://doi.org/10.1080/10826068.2018.1476879>.

AZMIR, J.; ZAIDUL, I. S. M.; RAHMAN, M. M.; SHARIF, K. M.; MOHAMED, A.; SAHENA, F.; JAHURUL, M. H. A.; GHAFOR, K.; NORULAINI, N. A. N.; OMAR, AKM . Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. **Journal of Food Engineering**, v. 117, n. 4, p. 426-436, 2013.

BACKES, A. A.; RONE, M. N. B.; OLIVEIRA, V. S.; FERREIRA, A. C. D. Aproveitamento de resíduos sólidos orgânicos na alimentação humana e animal. **Revista de Fapese**, v. 3, n. 2, p. 17-24, 2007.

BALAKRISHNAN, A.; MENON, V. P. Effect of hesperidin on matrix metalloproteinases and antioxidant status during nicotine-induced toxicity. **Toxicology**, v. 238, n. 2-3, p. 90-98, 2007.

BAMPI, M.; BICUDO, M. O. P.; FONTOURA, P. S. G.; RIBANI, R. H. Chemical composition of fruit, concentrated extract and flour from "Japanese grape"/Composição centesimal do fruto, extrato concentrado e da farinha da uva-do-japão. **Ciencia Rural**, v. 40, n. 11, p. 2361-2368, 2010.

BARBA, F. J.; ZHU, Z.; KOUBAA, M.; SANT'ANA, A. S.; ORLIEN, V. Green alternative methods for the extraction of antioxidant bioactive compounds from winery wastes and by-products: A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 49, p. 96-109, 2016.

BARBOSA, O.; ORTIZ, C.; BERENGUER-MURCIA, A.; TOREES, R.; RODRIGUE, R. C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Strategies for the one-step immobilization-purification of enzymes as industrial biocatalysts. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 5, p. 435-456, 2015.

BARUAH, K.; SAHU, N. P.; PAL, A. K.; DEBNATH, D.; YENGKOKPAM, S.; MUKHERJEE, S. C. Interactions of dietary microbial phytase, citric acid and crude protein level on mineral utilization by rohu, *Labeo rohita* (Hamilton), juveniles. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 38, n. 2, p. 238-249, 2007.

BENAVENTE-GARCÍA, O.; CASTILLO, J. Update on uses and properties of citrus flavonoids: new findings in anticancer, cardiovascular, and anti-inflammatory activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 15, p. 6185-6205, 2008.

BENZIE, I. F.; STRAIN, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. **Analytical Biochemistry**, v. 239, n. 1, p. 70-76, 1996.

BERNHOF, A. A brief review on bioactive compounds in plants. **Bioactive compounds in plants-benefits and risks for man and animals**, v. 50, p. 11-17, 2010.

BCC RESEARCH. **Global markets for enzymes in industrial applications**. Disponível em: <<https://www.bccresearch.com/market-research/biotechnology/global-markets-for-enzymes-in-industrial-applications-bio030k.html>>. Acessado em: Novembro de 2018.

BIER, M. C. J.; MEDEIROS, A. B. P.; DE KIMPE, N.; SOCCOL, C. R. Evaluation of antioxidant activity of the fermented product from the biotransformation of R-(+)-limonene in solid-state fermentation of orange waste by *Diaporthe* sp. **Biotechnology Research and Innovation**, v. 3, n. 1, p. 168-176, 2019.

BOHN, L.; MEYER, A. S.; RASMUSSEN, S. K. Phytate: impact on environment and human nutrition. A challenge for molecular breeding. **Journal of Zhejiang University Science B**, v. 9, n. 3, p. 165-191, 2008.

BRASIL, Ministério Do Meio Ambiente. **Decreto lei n. 73/2011**, de 17 de junho de 2011. Altera o regime geral da gestão de resíduos e transpõe a Directiva n.º 2008/98/CE, do Parlamento Europeu e do Conselho, de 19 de Novembro. Disponível em: <www.mma.gov.br>. Acessado em: Janeiro de 2020.

BRASIL, Ministério de Estado da Agricultura. **Portaria nº 229**, de 25 de outubro de 1988. Aprovar as Normas referentes a Complementação dos Padrões de Identidade e Qualidade do Vinho. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/vigilancia-agropecuaria/ivegetal/bebidas-arquivos/portaria-no-229-de-25-de-outubro-de-1988.pdf/view>> Acessado em: Janeiro de 2020.

BRIGHENTI, A. F.; BRIGHENTI, E.; BONIN, V.; RUFATO, L. Caracterização fenológica e exigência térmica de diferentes variedades de uvas viníferas em São Joaquim, Santa Catarina-Brasil. **Ciência Rural**, v. 43, n. 7, p. 1162-1167, 2013.

CÁDIZ-GURREA, M. D. L. L.; BORRÁS-LINARES, I.; LOZANO-SÁNCHEZ, J.; JOVEN, J.; FERNÁNDEZ-ARROYO, S.; SEGURA-CARRETERO, A. Cocoa and grape seed byproducts as a source of antioxidant and anti-inflammatory proanthocyanidins. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 2, p. 376, 2017.

CASTRO, R. J. S.; SATO, H. H. Synergistic effects of agroindustrial wastes on simultaneous production of protease and α -amylase under solid state fermentation using a simplex centroid mixture design. **Industrial Crops and Products**, v. 49, p. 813-821, 2013.

CEDES – Centro de Estudos e Debates Estratégicos. **Perdas e desperdícios de alimentos: Estratégias para redução**. Disponível em: <<https://www2.camara.leg.br/a-camara/estruturaadm/altosestudios/pdf/perdas-e-desperdicio-de-alimentos-no-brasil-estrategias-para-reducao>> Acessado em: Janeiro de 2020.

CHEN, X.-M.; TAIT, A. R.; KITTS, D. D. Flavonoid composition of orange peel and its association with antioxidant and anti-inflammatory activities. **Food Chemistry**, v. 218, p. 15-21, 2017.

CHOI, J.-M.; HAN, S.-S.; KIM, H.-S. Industrial applications of enzyme biocatalysis: Current status and future aspects. **Biotechnology Advances**, v. 33, p. 1443-1454, 2015.

CLIFTON, P. M. Effect of grape seed extract and quercetin on cardiovascular and endothelial parameters in high-risk subjects. **BioMed Research International**, v. 2004, n. 5, p. 272-278, 2004.

CITRUSBR – Associação Nacional dos Exportadores de Sucos Cítricos. **Mercado Externo: Estatísticas de exportação (2020)**. Disponível em: < <http://www.citrusbr.com/mercadoexterno/?me=01>> Acessado em: Janeiro de 2020.

CITRUSBR – Associação Nacional dos Exportadores de Sucos Cítricos. **Laranja e suco**. Disponível em: < <http://www.citrusbr.com/laranjaesuco/?ins=20>> Acessado em: Janeiro de 2020.

CITRUSBR – Associação Nacional dos Exportadores de Sucos Cítricos. **Exportações de suco de laranja cresceram 26,6% na safra 2019/20**. Disponível em: <<http://www.citrusbr.com/noticias/?id=312803>> Acessado em: Janeiro de 2020.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. **Uva – Análise Mensal – Dezembro 2019 – Janeiro 2020**. Disponível em: <<https://www.conab.gov.br/info-agro/analises-do-mercado-agropecuário-e-extrativista/analises-do-mercado/historico-mensal-de-uva/item/12781-uva-analise-mensal-dezembro-2019-janeiro-2020>> Acessado em: Janeiro de 2020.

COSTA, T.; JORGE, N. Beneficial bioactive compounds present in nut and walnuts. **UNOPAR Científica: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 3, p. 195–203, 2011.

CUNHA, J. R. B.; SANTOS, F. C. P. D.; ASSIS, F. G. D. V. D.; LEAL, P. L. Cultivation of *Penicillium* spp. in soy bean crop residues for production of cellulase, protease and amylase. **Revista Ceres**, v. 63, n. 5, p. 597-604, 2016.

CYPRIANO, D. Z.; SILVA, L. L.; MARINO, M. A.; TASIC, L. A biomassa da laranja e seus subprodutos. **Revista Virtual de Química**, v. 9, n. 1, 2016.

DÁVALOS, A.; MIGUEL, M.; BARTOLOME, B.; LOPEZ-FANDINO, R. Antioxidant activity of peptides derived from egg white proteins by enzymatic hydrolysis. **Journal of Food Protection**, v. 67, n. 9, p. 1939-1944, 2004.

DEL FOLLO-MARTINEZ, A.; BANERJEE, N.; LI, X.; SAFE, S.; MERTENS-TALCOTT, S. Resveratrol and quercetin in combination have anticancer activity in colon cancer cells and repress oncogenic microRNA-27a. **Nutrition and Cancer**, v. 65, n. 3, p. 494-504, 2013.

DERRY, M.; RAINA, K.; AGARWAL, R.; AGARWAL, C. Differential effects of grape seed extract against human colorectal cancer cell lines: the intricate role of death receptors and mitochondria. **Cancer Letters**, v. 334, n. 1, p. 69-78, 2013.

DEVI, K. P.; RAJAVEL, T.; NABAVI, S. F.; SETZER, W. N.; AHMADI, A.; MANSOURI, K.; NABAVI, S. M. Hesperidin: A promising anticancer agent from nature. **Industrial Crops and Products**, v. 76, p. 582–589, 2015.

DINICOLA, S.; CUCINA, A.; PASQUALATO, A.; D'ANSELM, F.; PROIETTI, S.; LISI, E.; BIZZARRI, M. Antiproliferative and apoptotic effects triggered by grape seed extract (GSE) versus epigallocatechin and procyanidins on colon cancer cell lines. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, n. 1, p. 651-664, 2012.

DOSHI, P.; ADSULE, P.; BANERJEE, K.; OULKAR, D. Phenolic compounds, antioxidant activity and insulinotropic effect of extracts prepared from grape (*Vitis vinifera* L.) byproducts. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 1, p. 181-190, 2015.

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Considerações sobre a produção de laranja no Estado de São Paulo (2013)**. Disponível em: <<http://www.alice.cnptia.embrapa.br>> Acessado em: Janeiro de 2020.

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Inteligência e Mercado de Uva e Vinho**. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/cim-inteligencia-e-mercado-uva-e-vinho/a-viticultura-no-brasil>> Acessado em: Janeiro de 2020.

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Tecnologias para o aproveitamento integral dos resíduos da indústria vitivinícola (2018)**. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/198137/1/Doc-132-residuos-vitivinicolos.pdf>> Acessado em: Janeiro de 2020.

FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Key facts on food loss and waste you should know!** Disponível em: <<http://www.fao.org/save-food/resources/keyfindings/en/>> Acessado em: Janeiro de 2020a.

FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations. **The world state of food and agriculture 2019 (SOFA)**. Disponível em: <<https://nacoesunidas.org/america-latina-e-caribe-respondem-por-20-da-comida-perdida-e-desperdicada-no-mundo/>> Acessado em: Janeiro de 2020b.

FAYEK, N. M.; EL-SHAZLY, A. H.; ABDEL-MONEM, A. R.; MOUSSA, M. Y.; ABD-ELWAHAB, S. M.; EL-TANBOULY, N. D. Comparative study of the hypocholesterolemic, antidiabetic effects of four agro-waste Citrus peels cultivars and their HPLC standardization. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 27, n. 4, p. 488-494, 2017.

FERRI, M.; RONDINI, G.; CALABRETTA, M. M.; MICHELINI, E.; VALLINI, V.; FAVA, F.; RODAC, A.; MINNUCCI, G.; TASSONI, A. White grape pomace extracts, obtained by a sequential enzymatic plus ethanol-based extraction, exert antioxidant, anti-tyrosinase and anti-inflammatory activities. **New Biotechnology**, v. 39, p. 51-58, 2017.

FLAMINI, R.; MATTIVI, F.; ROSSO, M. D.; ARAPITSAS, P.; BAVARESCO, L. Advanced knowledge of three important classes of grape phenolics: Anthocyanins, stilbenes and flavonols. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 10, p. 19651-19669, 2013.

FLEURI, L. F. **Resíduos como fontes diretas e indiretas de enzimas**. Tese (Livre-docência na área de Bioquímica Geral). Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista ‘Júlio de Mesquita Filho’, Botucatu-SP, 2016.

- FLEURI, L. F.; NOVELLI, P. K.; DELGADO C. H. O.; PIVETTA, M. R.; PEREIRA, M. S.; ARCURI, M. L.C.; CAPOVILLE, B. L. Biochemical characterization and application of lipases produced by *Aspergillus* sp. on solid-state fermentation using three substrates. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 49, p. 2585-2591, 2014.
- FORNBACKE, M.; CLARSUND, M. Cold-adapted proteases as an emerging class of therapeutics. **Infectious Diseases and Therapy**, v. 2, n. 1, p. 15-26, 2013.
- FRANCISCO V. C. B.; OKINO-DELGADO, C. H.; ZANUTTO- ELGUI, M. R.; FERNANDES, C. J. D. C.; FACANALI, R.; DA SILVA, R. A.; ZAMBUZZI, W. F.; MARQUES, M. O. M; FLEURI, L. F. Plant oil bioconversion into increase biological activity through lipases derived from wastes. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 54, n. 4, p. 1089-1099, 2019.
- FURLAN, A. D. F. **Produção de bioetanol de segunda geração pelo consórcio *Zymomonas mobilis* CCT4494 e *Candida tropicalis* em resíduos de uvas Isabel e Bordô**. Dissertação (Mestrado na área de Engenharia e Ciências de Alimentos) - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho', São José do Rio Preto-SP, 2015.
- GÁBOR, M. Anti-inflammatory substances of plant origin. In: **Anti-inflammatory drugs**. Springer, Berlin, Heidelberg, p. 698-739, 1979.
- GARCÍA, Y. R. **Obtenção de um extrato concentrado a partir da casca de uva cv. Alicante Bouschet (*Vitis vinifera* L.): Caracterização química, bioacessibilidade e aplicação como corante**. Embrapa Agroindústria de Alimentos - Tese (Doutorado na área de Ciência e Tecnologia dos Alimentos) – Instituto de Tecnologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica-RJ, 2019.
- GHAFOOR, K.; PARK, J.; CHOI, Y.-H. Optimization of supercritical fluid extraction of bioactive compounds from grape (*Vitis labrusca* B.) peel by using response surface methodology. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 11, n. 3, p. 485-490, 2010.
- GHOSH, S.; CHATTERJEE, J. K.; HAZRA, A. K. Comparative evaluation of in vitro antioxidant activities and high-performance liquid chromatography fingerprinting of fruit peels collected from food processing industry wastes. **Pharmacognosy Research**, v. 11, n. 4, p. 346, 2019.
- GODFREY, T.; WEST, S. **Industrial enzymology**. 2. ed. New York: Macmillan Publishers Inc., 1996.
- GOSSLAU, A.; CHEN, K. Y.; HO, C. T.; LI, S. Anti-inflammatory effects of characterized orange peel extracts enriched with bioactive polymethoxyflavones. **Food Science and Human Wellness**, v. 3, n. 1, p. 26-35, 2014.
- GRAEBIN, N. G.; SUHRE, T.; HERTZ, P. F.; AYUB, M. A. Z. An eco-friendly design for bioactive compounds extraction from grape pomace. **Current Bioactive Compounds**, v. 11, n. 2, p. 91-99, 2015.
- GONZALEZ-ABUIN, N.; MARTINEZ-MICHAEL, N.; BLAY, M.; PUJADAS G.; GARCIA-VALLVE, S.; PINENT, M.; ARDÉVOL, A. Grape seed-derived procyanidins decrease dipeptidyl-peptidase 4 activity and expression. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 36, p. 9055-9061, 2012.

GROSS, J. L.; SILVEIRO, S. P.; CAMARGO, J. L.; REICHELT, A. J.; AZEVEDO, M. J. D. Diabetes melito: diagnóstico, classificação e avaliação do controle glicêmico. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 46, n. 1, p. 16-26, 2002.

HALLIWELL, B. Biochemistry of oxidative stress. **Biochemical Society Transactions**, v. 35, p. 1147-1150, 2007.

HANAN, A. A.-A.; SHAKINAZ, T. E.-S. Antioxidant capacity of hesperidin from citrus peel using electron spin resonance and cytotoxic activity against human carcinoma cell lines. **Pharmaceutical Biology**, v. 49, n. 3, p. 276-282, 2011.

HASSAN, Z. M.; OSHEBA, A. S.; KHALLAF, M. F.; ABDEL-FATTAH, A. A. Assessment of grape seeds as a source of antioxidant compounds. **Arab Universities Journal of Agricultural Sciences**, v. 27, n. 1, p. 501-509, 2019.

HASHEMI, M.; RAZAVI, S. H.; SHOJAOSADATI, S. A.; MOUSAVI, S. M.; KHAJEH, K.; SAFARI, M. Development of a solid-state fermentation process for production of an alpha amylase with potentially interesting properties. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 110, n. 3, p. 333- 337, 2010.

HO, S.-C.; KUO, C.-T. Hesperidin, nobiletin, and tangeretin are collectively responsible for the anti-neuroinflammatory capacity of tangerine peel (*Citri reticulatae pericarpium*). **Food and Chemical Toxicology**, v. 71, p. 176-182, 2014.

IBRAVIN - Instituto Brasileiro do Vinho. **Produção de Uvas**. Disponível em: <<https://www.ibravin.org.br/admin/arquivos/estatisticas/1561748795.pdf>> Acessado em: Janeiro de 2020.

IDF – International Diabetes Federation. **Atas de diabetes da IDF – 9 Edição**. Disponível em: <<https://www.diabetesatlas.org/en/>> Acessado em: Janeiro de 2020.

IRANSHAHI, M.; REZAEI, R.; PARHIZ, H.; ROOHBAKHSH, A.; SOLTANI, F. Protective effects of flavonoids against microbes and toxins: The cases of hesperidin and hesperetin. **Life Sciences**, v. 137, p. 125–132, 2015.

JBT FOODTECH. **Um fornecedor líder de soluções integradas de processamento de alimentos**. Disponível em: <<https://www.jbtc.com/en/south-america/foodtech>> Acessado em: Janeiro de 2020.

JOSEPH, B.; RAMTEKE, P. W.; THOMAS, G. Cold active microbial lipases: Some hot issues and recent developments. **Biotechnology Advances**, v. 26, n. 5, p. 457-470, 2008.

JOSHI, S.; SATYANARAYANA, T. Heterologous expression of yeast and fungal phytases: Developments and future perspectives. **Indian Journal of Biotechnology**, v. 14, p. 293–311, 2015.

JOSHI, S.; SATYANARAYANA, T. Biotechnology of cold-active proteases. **Biology**, v. 2, n. 2, p. 755-783, 2013.

KEDARE, S. B.; SINGH, R. P. Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. **Journal of Food Science and Technology**, v. 48, n. 4, p. 412–422, 2011.

- KOBLITZ, M. K.; HUMA, Z. E.; DANGLES, O. A comprehensive review on flavanones the major citrus polyphenols. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 33, p. 85-104, 2014.
- KOMAKI, E.; YAMAGUCHI, S.; MARU, I.; KINOSHITA, M.; KAKEHI, K.; OHTA, Y.; TSUKADA, Y. Identification of anti- α -amylase components from olive leaf extracts. **Food Science and Technology Research**, v. 9, n. 1, p. 35-39, 2003.
- KONIETZNY, U.; GREINER, R. Phytic acid: Nutritional impact. **Encyclopaedia of Food Science and Nutrition**, Elsevier, London, p. 4555-4563, 2003.
- KONNO, K.; HIRAYAMA, C.; NAKAMURA, M.; TATEISHI, K.; TAMURA, Y.; HATTORI, M. Papain protects papaya trees from herbivorous insects: Role of cysteine proteases in latex. **Plant Journal**, v. 37, p. 370-378, 2004.
- KUMAR, C. S.; DHINAKARAN, M. Extraction and application of natural dyes from orange peel and lemon peel on cotton fabrics. **Textile Research Journal**, v. 80, p. 2117-2123, 2017.
- KUMAR, A.; SINGH, S. Directed evolution: Tailoring biocatalysts for industrial applications. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 33, n. 4, p. 365-378, 2013.
- KUMAR, V.; SINHA, A. K.; MAKKAR, H. P.; BECKER, K. Dietary roles of phytate and phytase in human nutrition: A review. **Food Chemistry**, v. 120, n. 4, p. 945-959, 2010.
- LANZA, C. M. Processed and derived products of oranges. **Chapter of citrus fruits/processed and derived products of oranges**, Elsevier Science Ltd., University of Catania, Catania, p.1346-1348, 2003.
- LASANTA, C.; CARO, I.; GÓMEZ, J.; PÉREZ, L. The influence of ripeness grade on the composition of musts and wines from *Vitis vinifera* cv. Tempranillo grown in a warm climate. **Food Research International**, v. 64, p. 432-438, 2014.
- LI, S.; LO, C.-Y.; HO, C.-T. Hydroxylated polymethoxyflavones and methylated flavonoids in sweet orange (*Citrus sinensis*) peel. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 12, p. 4176-4185, 2006.
- LONDOÑO-LONDOÑO, J.; DE LIMA, V. R.; LARA, O.; GIL, A.; PASA, T. B. C.; ARANGO, G. J.; PINEDA, J. R. R. Clean recovery of antioxidant flavonoids from citrus peel: Optimizing an aqueous ultrasound-assisted extraction method. **Food Chemistry**, v. 119, n. 1, p. 81-87, 2010.
- LÓPEZ, J. Á. S.; LI, Q.; THOMPSON, I. P. Biorefinery of waste orange peel. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 30, n. 1, p. 63-69, 2010.
- MANTHEY, J. A.; GROHMANN, K.; MONTANARI, A.; ASH, K.; MANTHEY, C. L. Polymethoxylated flavones derived from citrus suppress tumor necrosis factor- α expression by human monocytes. **Journal of Natural Products**, v. 62, n. 3, p. 441-444, 1999.
- MANTHEY, J. A.; GUTHRIE, N.; GROHMANN, K. Biological properties of citrus flavonoids pertaining to cancer and inflammation. **Current Medicinal Chemistry**, v. 8, n. 2, p. 135-153, 2001.

- MARTÍNEZ, R.; TORRES, P.; MENESES, M. A.; FIGUEROA, J. G.; PÉREZÁLVAREZ, J. A.; VIUDAMARTOS, M. Chemical, technological and in vitro antioxidant properties of mango, guava, pineapple and passion fruit dietary fibre concentrate. *Food Chemistry*, v. 135, n. 3, p. 1520–1526, 2012.
- MARTINI, P. R. R. **Conversão pirolítica de bagaço residual da indústria de suco de laranja e caracterização química dos produtos**. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria-RS, 2009.
- MATTOS JUNIOR, D. M.; DE NEGRI, J. D.; JORGINO, J. O. F.; JUNIOR, P. Citros: Principais informações e recomendações de cultivo. **Boletim Técnico 200**, Instituto Agronômico de Campinas, 2005.
- MAZORRA-MANZANO, M. A.; MORENO-HERNÁNDEZ, J. M.; RAMÍREZSUAREZ, J. C.; TORRES-LLANEZ, M. J.; GONZÁLEZ-CÓRDOVA, A. F.; VALLEJO-CÓRDOBA, B. Sour orange *Citrus aurantium* L. flowers: A new vegetable source of milk-clotting proteases. *LWT- Food Science and Technology*, v. 54, p. 325–330, 2013.
- MELLO, L. M. R. Vitivinicultura brasileira: Panorama 2013. Bento Gonçalves, 2014. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/992334/vitivinicultura-brasileira-panorama-201>>. Acesso em: Agosto de 2018.
- MIENDA, B. S.; IDI, A. Microbiological features of solid state fermentation and its applications. An overview. **Research in Biotechnology**, v. 2, n. 6, p. 21–26, 2011.
- MINIHANE, A. M.; RIMBACH, G. Iron absorption and the iron binding and anti-oxidant properties of phytic acid. **International Journal Of Food Science & Technology**, v. 37, n. 7, p. 741-748, 2002.
- MIRANDA, S. S.; MIRANDA, L. S. M.; SOUZA, R. O. M. A. Lipases: valuable catalysts for dynamic kinetic resolutions. **Biotechnology Advances**, v. 33, p. 372-393, 2015.
- MIRBAGHERI, V. S.; ALIZADEH, E.; YOUSEF ELAHI, M.; ESMAEILZADEH BAHABADI, S. Phenolic content and antioxidant properties of seeds from different grape cultivars grown in Iran. **Natural Product Research**, v. 32, n. 4, p. 425-429, 2018.
- MOLINA, G.; PRAZERES, J. N.; BALLUS, C.A. Aplicações de enzimas na indústria de alimentos. Capítulo de Biotecnologia de Alimentos, Coleção Ciência, tecnologia, engenharia de alimentos e nutrição, editora Atheneu, São Paulo, Rio de Janeiro e Belo Horizonte, v. 12, p. 343–363, 2013.
- MONTEIRO, V. N.; SILVA, R. N. Aplicações industriais da biotecnologia enzimática. **Revista Processos Químicos**, v. 3, n. 5, p. 9-23, 2009.
- MOUNGUENGUI, R. W. M.; BRUNSCHWIG, C.; BARÉA, B.; VILLENEUVE, P.; BLIN, J. Are plant lipases a promising alternative to catalyze transesterification for biodiesel production? **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 39, n. 5, p. 441–456, 2013.
- MUHTADI, H.; AZIZAH, T.; SUHENDI, A.; YEN, K. H. Antidiabetic and antihypercholesterolemic activities of *Citrus sinensis* peel: In vivo study. **National Journal of Physiology, Pharmacy and Pharmacology**, v. 5, n. 5, p. 382-385, 2015.

MURAKAMI, A.; NAKAMURA, Y.; OHTO, Y.; YANO, M.; KOSHIBA, T.; KOSHIMIZU, K.; TOKUDA, H.; NISHINO, H.; OHIGASHI, H. Suppressive effects of citrus fruits on free radical generation and nobletin, an anti-inflammatory polymethoxyflavonoid. **Biofactors**, v. 12, n. 1-4, p. 187-192, 2000.

MUTHULAKSHMI, C.; GOMATHI, D.; KUMAR, D. G. Production, purification and characterization of protease by *Aspergillus flavus* under solid state fermentation. **Jordan Journal Of Biological Sciences**, v. 147, n. 621, p. 1-12, 2011.

NASSIRI-ASL, M.; HOSSEINZADEH, H. Review of the pharmacological effects of *Vitis vinifera* (grape) and its bioactive constituents: An update. **Phytotherapy Research**, v. 30, n. 9, p. 1392-1403, 2016.

NEVES, K. C. S. **Produção de proteases coagulantes por espécies de Pleurotus em resíduos vegetais da Amazônia**. Tese (Doutorado na área de Biotecnologia) – Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife-PE, 2014.

NOVELLI, P. K.; BARROS, M. M.; FLEURI, L. F. Novel inexpensive fungi proteases: Production by solid state fermentation and characterization. **Food Chemistry**, v. 198, p. 119-124, 2016.

NWOBI, B. E.; OFOEGBU, O.; ADESINA, O. Extraction and qualitative assessment of african sweet orange seed oil. **African Journal of Food Agricultural and Nutrition**, v. 6, p. 1–11, 2006.

O'DELL, B.L.; DE BOLAND, A. Complexation of phytate with proteins and cations in corn germ and oil seed meals. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 24, n. 4, p. 804-808, 1976.

OIV – International Organisation Of Vine And Wine. **OIV 2019 Report on the world vitivinicultural situation**. Disponível em: <<http://www.oiv.int/en/oiv-life/oiv-2019-report-on-the-world-vitivinicultural-situation>> Acessado em: Janeiro de 2020.

OKINO-DELGADO, C. H.; FLEURI, L. F. Obtaining lipases from byproducts of orange juice processing. **Food Chemistry**, v. 163, p. 103–107, 2014.

OKINO-DELGADO, C. H.; FLEURI, L. F. Orange and mango by-products: Agro-industrial waste as source of bioactive compounds and botanical versus commercial description—A review. **Food Reviews International**, v. 32, n. 1, p. 1-14, 2016.

OKINO-DELGADO, C.H.; DO PRADO, D.Z.; FACANALI, R.; MARQUES, M.M.O.; NASCIMENTO, A.S.; DA COSTA FERNANDES, C.J.; ZAMBUZZI, W.F.; FLEURI, L.F. Bioremediation of cooking oil waste using lipases from wastes. **PloSone**, v. 12, n. 10, 2017.

OKINO-DELGADO, C. H.; PEREIRA, M. S.; DA SILVA, J. V. I.; KHARFAN, D.; DO PRADO, D. Z.; FLEURI, L. F. Lipases obtained from orange wastes: Commercialization potential and biochemical properties of different varieties and fractions. **Biotechnology Progress**, v. 35, n. 1, p. e2734, 2018a.

OKINO-DELGADO, C. H.; DO PRADO, D. Z.; FLEURI, L. F. Brazilian fruit processing, wastes as a source of lipase and other biotechnological products: A review. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 90, n. 3, p. 2927-2943, 2018b.

OLIVEIRA, H. F.; SOUTO, C. N.; CASTRO, I. C. D.; MELLO, H. H. C.; MASCARENHAS, A. G. Resíduos agroindustriais do processamento de frutas na alimentação de frangos de corte: Revisão. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 113, n. 607, p. 1-10, 2018.

ONU - United Nations – Department of Economic and Social Affairs Population Dynamic. **Revision of world population prospects 2019**. Disponível em: <<https://population.un.org/wpp/>> Acessado em: Janeiro de 2020.

ONYEONAGU, C. C.; NJOKU, O. L. Crops residues and agro-industrial by-product used in traditional sheep and goat production in rural communities of Markudi LGA. **Journal of Tropical Agriculture, Food, Environment and Extension**, v.9, n.3, p.161-169, 2010.

ORAK, H. H. Total antioxidant activities, phenolics, anthocyanins, polyphenoloxidase activities of selected red grape cultivars and their correlations. **Scientia Horticulturae**, v. 111, n. 3, p. 235-241, 2007.

OZTURK, B.; PARKINSON, C.; GONZALEZ-MIQUEL, M. Extraction of polyphenolic antioxidants from orange peel waste using deep eutectic solvents. **Separation and Purification Technology**, v. 206, p. 1-13, 2018.

PALMA, S.; D'AQUINO, S.; AGABBIO, M.; SCHIRRU, S. Changes in flavonoids, ascorbic acid, polyphenol content and antioxidant activity in cold-stored fortune mandarin. In: **V International Postharvest Symposium 682**, p. 617-622, 2004.

PAN, X. J.; WANG, M.; WANG, X. X.; LIU, B.; ZHANG, H. Study on the effect of grape seed proanthocyanidins on increasing the radiosensitivity for X-ray. **Zhong Yao Cai= Zhongyaocai= Journal Of Chinese Medicinal Materials**, v. 35, n. 2, p. 264-269, 2012.

PANDIARAJAN, A.; KAMARAJ, R.; VASUDEVAN, S.; VASUDEVAN, S. OPAC (orange peel activated carbon) derived from waste orange peel for the adsorption of chlorophenoxyacetic acid herbicides from water: adsorption isotherm, kinetic modelling and thermodynamic studies. **Bioresource Technology**, v. 261, p. 329-341, 2018.

PASQUA, G.; SIMONETTI, G. Antimicrobial and antiviral activities of grape seed extracts. **Nova Science Publishers: New York**, p. 211-224, 2016.

PATEL, S. Grape seeds: Agro-industrial waste with vast functional food potential. In: **Emerging Biore-sources with Nutraceutical and Pharmaceutical Prospects**. Springer, Cham, p. 53-69, 2015.

PAULO, L. M.; GOUVEIA, A. B. V. S.; DA SILVA, J. M. S.; SILVA, W. J.; DOS SANTOS, J. B.; SAM-PAIO, S. A.; JÚNIOR, E. M. A.; COSTA, K. O.; DE SOUZA, J. G.; DE SOUSA, F. E.; DOS SANTOS, F. R.; MINAFRA, C. S. Coprodutos de frutas e carboidratos na alimentação de aves: Revisão. **Pubvet**, v. 13, p. 176, 2019.

PAWAR, R.; ZAMBARE, V.; BARVE, S.; PARATKAR, G. Application of protease isolated from *Bacillus* sp. 158 in enzymatic cleansing of contact lenses. **Biotechnology**, v. 8, n. 2, p. 276-280, 2009.

- PEREIRA, M. S. **Resíduos de laranja como fonte de enzimas e compostos bioativos**. Dissertação (Mestrado na área de Biotecnologia) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista ‘Júlio de Mesquita Filho’, Botucatu-SP, 2017.
- PEREIRA, R. M.; LÓPEZ, B.G.C.; DINIZ, S. N.; ANTUNES, A. A.; GARCIA, D. M.; OLIVEIRA, C. R.; MARCUCCI, M. C. Quantification of flavonoids in Brazilian orange peels and industrial orange juice processing wastes. **Agricultural Sciences**, v. 8, n. 07, p. 631, 2017.
- POZA, M.; SIEIRO, C.; CARREIRA, L.; BARROS-VALÁZQUEZ, J.; VILLA, T. G. Production and characterization of the milk clotting protease of *Myxococcus xanthus* strain 442. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 30, p. 691– 698, 2003.
- RAMAKRISHNA, V.; RAJASEKHAR, S.; REDDY, L. S. Identification and purification of metalloprotease from dry grass pea (*Lathyrus sativus* L.) seeds. **Applied Biochemistry Biotechnology**, v. 160, p. 63-71, 2010.
- 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 Biology And Medicine**, v. 26, n. 9-10, p. 1231-1237, 1999.
- REZZADORI, K.; BENEDETTI, S.; AMANTE, E. R. Propostas para a recuperação de resíduos: Resíduos de laranja como matéria-prima para novos produtos. **Processamento De Alimentos e Bioprodutos**, v. 90, n. 4, p. 606-614, 2012.
- RIZZON, L.A.; MENEGUZZO, J; MANFROI, L. Planejamento e instalação de uma cantina para elaboração de vinho tinto. Bento Gonçalves: **Embrapa Uva e Vinho**, 2003.
- RIZZON, L. A.; MIELE, A. Evaluation of the cv. Cabernet Sauvignon in the manufacture of red wine. **Ciência e Tecnologia de Alimentos (Brazil)**, 2002.
- ROCHA, A. M.; LOPES, N. B.; LUCCHETTA, L.; ALMEIDA, I. V.; DALMOLIN, I. A. L.; VICENTINI, V. E. P.; DÜSMAN, E. Uvas: formas de uso, consumo e atividades biológicas - Uma revisão. **Acta Elit Salutis**, v. 1, n. 1, p. 11, 2019.
- ROCKENBACH, I. I.; GONZAGA, L. V.; RIZELIO, V. M.; GONÇALVES, A. E. S. S.; GENOVESE, M. I.; FETT, R. Phenolic compounds and antioxidant activity of seed and skin extracts of red grape (*Vitis vinifera* and *Vitis labrusca*) pomace from Brazilian winemaking. **Food Research International**, Oxford, v. 44, n. 4, p. 897-901, 2011.
- ROSSI, E.; DOS SANTOS, K. G. Óleo de uva para produção de biodiesel. **Revista Monografias Ambientais**, v. 13, n. 2, p. 3139-3145, 2014.
- RUBILAR, M.; PINELO, M.; SHENE, C.; SINEIRO, J.; NUÑEZ, M. J. Separation and HPLC-MS identification of phenolic antioxidants from agricultural residues: almond hulls and grape pomace. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 25, p. 10101-10109, 2007.

SALEEM, M.; SAEED, M. T. Potential application of waste fruit peels (orange, yellow lemon and banana) as wide range natural antimicrobial agent. **Journal of King Saud University-Science**, v. 32, n. 1, p. 805-810, 2020.

SALGADO, E.; GREEN, D. M. Action of bioflavonoids on inflammation. **Journal Of Applied Physiology**, v. 8, n. 6, p. 647-650, 1956.

SANTOS, P. S.; SOLIDADE, L. S.; SOUZA, J. G. B.; SAMPAIO, G.; BRAGA JR, A. C. R.; DE ASSIS, F. G. D. V.; LEAL, P. L. Fermentação em estado sólido em resíduos agroindustriais para a produção de enzimas: Uma revisão sistemática. **The Journal of Engineering and Exact Sciences**, v. 4, n. 2, p. 0181-0188, 2018.

SANTOS, C. M.; DWECK, J.; VIOTTO, R. S.; ROSA, A. H.; de MORAIS, L. C. Application of orange peel waste in the production of solid biofuels and biosorbents. **Bioresource Technology**, v. 196, p. 469-479, 2015.

SAPNA, J. J.; SINGH, B. Characteristics and biotechnological applications of bacterial phytases. **Process Biochemistry**, v. 51, p. 159–169, 2016.

SAPWAROBOL, S.; ADISAKWATTANA, S.; CHANGPENG, S.; RATANAWACHIRIN, W.; TANRUTTANAWONG, L.; BOONYARIT, W. Postprandial blood glucose response to grape seed extract in healthy participants: A pilot study. **Pharmacognosy Magazine**, v. 8, n. 31, p. 192, 2012.

SBD – Sociedade Brasileira de Diabéticos. **O que é Diabetes?** Disponível em: <<https://www.diabetes.org.br/publico/diabetes/oque-e-diabetes>> Acessado em: Janeiro de 2020.

SBEM – Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia. **Números do diabetes pelo Mundo**. Disponível em: <<https://www.endocrino.org.br/numeros-do-diabetes-no-mundo/>> Acessado em: Janeiro de 2020.

SELLE, P. H.; RAVINDRAN, V. Microbial phytase in poultry nutrition. **Animal Feed Science and Technology**, v. 135, n. 1-2, p. 1-41, 2007.

SELLE, P. H.; RAVINDRAN, V.; CALDWELL, A.; BRYDEN, W. L. Phytate and phytase: Consequences for protein utilisation. **Nutrition Research Reviews**, v. 13, n. 2, p. 255-278, 2000.

SETH, S.; CHAKRAVORTY, D.; DUBEY, V. K.; PATRA, S. An insight into plant lipase research - challenges encountered. **Protein Expression and Purification**, v. 95, p. 13–21, 2014.

SHAHIDI, F.; ZHONG, Y. Measurement of antioxidante activity. **Journal of Funtional Foods**, v. 18, p. 757–781, 2015.

SHAHRAM, H.; DINANI, S. T.; AMOUHEYDARI, M. Effects of pectinase concentration, ultrasonic time, and pH of an ultrasonic-assisted enzymatic process on extraction of phenolic compounds from orange processing waste. **Journal of Food Measurement and Characterization**, v. 13, n. 1, p. 487-498, 2019.

SHAMSUDDIN, A. M. Anti-cancer function of phytic acid. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 37, n. 7, p. 769-782, 2002.

SHARMA, G.; GUPTA, A. K.; GANJEWALA, D.; GUPTA, C.; PRAKASH, D. Phytochemical composition, antioxidant and antibacterial potential of underutilized parts of some fruits. **International Food Research Journal**, v. 24, n. 3, p. 1167, 2017.

SILVA, L. F.; SILVA, M. M.; RIBEIRO, D. S. Atividade antioxidante e teor de antocianinas de extratos hidroalcóolicos de bagaço de uvas tintas cultivadas no agreste pernambucano. **Revista Brasileira de Agro-tecnologia**, v. 7, n. 2, p. 248-253, 2017.

SIMONETTI, G.; D'AURIA, F. D.; MULINACCI, N.; MILELLA, R. A.; ANTONACCI, D.; INNOCENTI, M.; PASQUA, G. Phenolic content and in vitro antifungal activity of unripe grape extracts from agro-industrial wastes. **Natural Product Research**, v. 33, n. 6, p. 803-807, 2019.

SINGH, A. K.; MUKHOPADHYAY, M. Overview of fungal lipase: a review. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 166, n. 2, p. 486-520, 2012.

SOTO, K. M.; QUEZADA-CERVANTES, C. T.; HERNÁNDEZ-ITURRIAGA, M.; LUNA-BÁRCENAS, G.; VAZQUEZ-DUHALT, R.; MENDOZA, S. Fruit peels waste for the green synthesis of silver nanoparticles with antimicrobial activity against foodborne pathogens. **LWT**, v. 103, p. 293-300, 2019.

SOUZA, V. B. FERREIRA, J. R. Desenvolvimento e estudos de estabilidade de cremes e géis contendo sementes e extratos do bagaço da uva Isabel (*Vitis labrusca* L.). **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 31, p. 217-222, 2010.

TANG, G. Y.; ZHAO, C. N.; LIU, Q.; FENG, X. L.; XU, X. Y.; CAO, S. Y.; MENG, X.; LI, S.; GAN, R.-Y.; LI, H.-B. Potential of grape wastes as a natural source of bioactive compounds. **Molecules**, v. 23, n. 10, p. 2598, 2018.

TAVANO, O. L. Protein hydrolysis using proteases: An important tool for food biotechnology. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 90, p. 1–11, 2013.

TEIXEIRA, A.; BAENAS, N.; DOMINGUEZ-PERLES, R.; BARROS, A.; ROSA, E.; MORENO, D. A.; GARCIA-VIGUERA, C. Natural bioactive compounds from winery by-products as health promoters: A review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, n. 9, p. 15638-15678, 2014.

TINELLO, F.; LANTE, A. Evaluation of antibrowning and antioxidant activities in unripe grapes recovered during bunch thinning. **Australian Journal of Grape and Wine Research**, v. 23, n. 1, p. 33-41, 2017.

THOMPSON, L.U. Potential health benefits and problems associated with antinutrients in foods. **Food Research International**, v. 26, n. 2, p. 131-149, 1993.

TOCHETTO, C. C.; FERRARI, M. R.; BERGAMO, M. M. C.; VANCIM, V. Estudo sobre as perdas físicas e financeiras decorrentes da produção, transporte, armazenagem e comercialização de hortifrutigranjeiros no município de Erechim/RS. **Revista Perspectiva**, v. 34, n. 123, p. 7- 17, 2010.

TSUTSUMI, R.; YOSHIDA, T.; NII, Y.; OKAHISA, N.; IWATA, S.; TSUKAYAMA, M.; HASHIMOTO, R.; TANIGUCHI, Y.; SAKAUE, H.; HOSAKA, T.; SHUTO, E.; SAKAI, T. Sudachitin, a polymethoxylated flavone, improves glucose and lipid metabolism by increasing mitochondrial biogenesis in skeletal muscle. **NUTRITION & METABOLISM**, v. 11, n. 1, p. 32, 2014.

UMENO, A.; HORIE, M.; MUROTOMI, K.; NAKAJIMA, Y.; YOSHIDA, Y. Antioxidative and antidiabetic effects of natural polyphenols and isoflavones. **Molecules**, v. 21, p. 708, 2016.

VESCOVI, V. **Extração, purificação e imobilização de lipases vegetais destinadas à síntese de biodiesel e ésteres**. Dissertação (Mestrado na área de Engenharia Química) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos–SP, 2012.

VICENTE, I. S.; FLEURI, L. F.; CARVALHO, P. L.; GUIMARÃES, M. G.; NALIATO, R. F.; MÜLLER, H. D. C.; PEZZATO, L. E.; BARROS, M. M. Orange peel fragment improves antioxidant capacity and haematological profile of Nile tilapia subjected to heat/dissolved oxygen-induced stress. **Aquaculture Research**, v. 50, n. 1, p. 80-92, 2019.

VODNAR, D. C.; CĂLINOIU, L. F.; DULF, F. V.; ȘTEFĂNESCU, B. E.; CRIȘAN, G.; SOCACIU, C. Identification of the bioactive compounds and antioxidant, antimutagenic and antimicrobial activities of thermally processed agro-industrial waste. **Food Chemistry**, v. 231, p. 131-140, 2017.

VOHRA, A.; SATYANARAYANA, T. Phytases: microbial sources, production, purification, and potential biotechnological applications. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 23, n. 1, p. 29-60, 2003.

VUCENIK, I.; SHAMSUDDIN, A.M. Cancer inhibition by inositol hexaphosphate (IP6) and inositol: From laboratory to clinic. **The Journal of Nutrition**, v. 133, n. 11, p. 3778S-3784S, 2003.

XU, C.; YAGIZ, Y.; HSU, W. Y.; SIMONNE, A.; LU, J.; MARSHALL, M. R. Antioxidant, antibacterial, and antibiofilm properties of polyphenols from muscadine grape (*Vitis rotundifolia* Michx.) pomace against selected foodborne pathogens. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 28, p. 6640-6649, 2014.

Wines of Chile. **Tipos de uvas – Diversidade vitivinícola**. Disponível em: <<https://winesofchilebrasil.com/pais-vitivinicola/os-tipos-de-uvas/#>> Acessado em: Janeiro de 2020.

WHITE, T. C.; FINDLEY, K.; DAWSON JR., T. L.; SCHEYNIUS, A.; BOEKHOUT, T.; CUOMO, C. A.; XU, J.; SAUNDERS, C. W. Fungi on the skin: Dermatophytes and Malassezia. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 4, n. 8, p. a019802, 2014.

WU, T. Y.; LIM, S. L.; LIM, P. N.; SHAK, K. P. Biotransformation of biodegradable solid wastes into organic fertilizers using composting or/and vermicomposting. **Chemical engineering transactions**, v. 39, p. 1579-1584, 2014.

YOUSSEF, M. K. E.; YOUSSEF, H. M. K. E.; MOUSA, R. M. Evaluation of antihyperglycaemic activity of citrus peels powders fortified biscuits in albino induced diabetic rats. **Food Public Health**, v. 3, n. 3, p. 161-167, 2013.

ZAMBARE, V.; NILEGAONKAR, S.; KANEKAR, P. A novel extracellular protease from *Pseudomonas aeruginosa* MCM B-327: Enzyme production and its partial characterization. **New Biotechnology**, v. 28, n. 2, p. 173-181, 2011.

ZANUTTO-ELGUI, M. R. **Produção de proteases fúngicas e aplicação para uso de peptídeos bioativos**. Tese (Doutorado na área de Biotecnologia) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista ‘Júlio de Mesquita Filho’, Botucatu-SP, 2019.

ZHANG, Y.; JAYAPRAKASAM, B.; SEERAM, N. P.; OLSON, L. K.; DEWITT, D.; NAIR, M. G. Insulin secretion and cyclooxygenase enzyme inhibition by Cabernet sauvignon grape skin compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 2, p. 228-233, 2004.

ZHOU, Z. Q. Citrus fruits nutrition. **Beijing, China: Science Press**, 2012.

ZHU, L.; ZHANG, Y.; LU, J. Phenolic contents and compositions in skins of red wine grape cultivars among various genetic backgrounds and originations. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, n. 3, p. 3492-3510, 2012.

Capítulo 2: Resíduos de laranja e uva, isolados e fermentados: fonte de fitases, lipases e proteases

Resumo

As ações versáteis de fitases, lipases e proteases têm ampliado sua utilização em processos biotecnológicos industriais. Tais enzimas podem ser obtidas utilizando resíduos agroindustriais isolados (forma direta em que o resíduo sozinho é fonte de biomoléculas) ou fermentados por fungos (forma indireta de utilização de resíduos como substratos de processo fermentativo em estado sólido), com destaques para os resíduos de laranja e uva que despontam como culturas de grande porte na economia brasileira. Esta pesquisa objetivou avaliar a característica bromatológica dos resíduos brutos de laranja e uva, isolados e fermentados, bem como investigar a presença de fitases, lipases e proteases. Nos resíduos de uva na forma bruta não foi bem sucedido o crescimento fúngico, provavelmente pela presença de compostos fenólicos com ação antifúngica no resíduo. Os resíduos de laranja fermentados apresentaram resultados superiores em relação aos resíduos isolados quanto ao teor de matéria mineral, proteína bruta e fibras. De modo geral, as fitases obtidas de resíduos isolados apresentaram melhores resultados (em unidades de atividade enzimática) até 20 vezes maiores do que as fitases obtidas por resíduos fermentados. O mesmo perfil foi observado para as proteases, ou seja, os resíduos isolados apresentaram atividade enzimática 69% maior do que os fermentados. Em relação às lipases, as atividades de lipases capazes de hidrolisar ácidos graxos de cadeias intermediárias (p-NPL) não foram identificadas nos resíduos isolados e fermentados, porém tanto resíduos de laranja quanto de uva apresentaram maiores atividades em hidrólises de ácidos graxos de cadeia curta (p-NPB), além disso, bagaço, casca e frit de laranja fermentados apresentaram atividades 91; 77,7; e 79,5% maiores do que suas respectivas frações isoladas.

Palavras-chave: Caracterização bromatológica, enzimas *homemade*, resíduos de laranja e uva, obtenção direta e indireta.

Abstract

The versatile actions of phytases, lipases and proteases have increased their use in industrial biotechnological processes. Such enzymes can be obtained utilizing isolated agro-industrial residues (direct way processes that the waste alone is a source of biomolecules) or fermented by fungi (indirect way of using residues as substrates for solid state fermentation), with orange and grape residues highlights that emerge as large crops in the Brazilian economy. This research aimed to evaluate the bromatological characteristic of crude orange and grape residues, isolated and fermented, as well as to investigate the presence of phytase, lipases and protease. In raw grape residues, fungal growth was not successful, probably due to the presence of phenolic compounds with antifungal action in the residue. The fermented orange wastes presented superior results than the isolated residues in terms of the content mineral matter, crude protein and fibers. In general, phytases obtained of isolated residues represents better results (in enzymatic activities unities) until 20 times bigger than phytases obtained by fermented residues. The same profile was observed to proteases, that is, the isolated residues showed 69% higher enzymatic activity than the fermented. In relation to lipases, the activities of lipases capable of hydrolyzing intermediate chain fatty acids (p-NPL) were not identified in the isolated and fermented residues, however both orange and grape residues presented greater activities in short chain fatty acid hydrolysis (p-NPB), furthermore, fermented orange bagasse, peel and frit showed activities 91; 77,7; e 79,5% greather than their respective isolated fractions.

Key Words: Bromatological characterization, homemade enzymes, orange and grape residues, direct and indirect obtaining.

1.1. Introdução

Enzimas *homemade* ganham cada vez mais espaço como biocatalisadores industriais devido às suas performances, sustentabilidade e custo competitivo nos processos tecnológicos. Atualmente, o mercado global dos biocatalisadores movimenta US\$ 5,5 bilhões com crescimento anual de 4,9% e, somente no ramo de alimentos, o seu uso deve aumentar de US\$ 1,8 bilhão para US\$ 2,2 bilhões em 2022 (BBC RESEARCH, 2018).

Dentre essas biomoléculas, as fitases são grupo de fosfatases que hidrolisam fitato em fosfato inorgânico e fosfato mio-inositol (JOSHI e SATYANARAYANA, 2015). Podem ser utilizadas nas indústrias alimentícias para biodisponibilização do fósforo na dieta animal e para melhorar a qualidade e a durabilidade de pães (BOHN et al., 2008). Nas indústrias farmacêuticas, essas enzimas são aplicadas contra formação de cálculos renais e doenças cardíacas. São ainda utilizadas para eliminar porções de fitato nas manufaturas de papel e celulose (PRADO et al., 2018; SAPNA e SINGH, 2016).

As lipases, por sua vez, são hábeis em catalisar reações de síntese e hidrólise dependendo dos níveis de água no meio reacional. Além disso, podem quebrar tamanhos diferentes de ácidos graxos, tornando-as muito hábeis e específicas para diferentes aplicações como produção de detergentes, aromas, chás, biodiesel e biossensores, antibióticos, kits de diagnósticos e cosméticos. Podem inclusive serem utilizadas para biorremediação de óleos residuais e em indústria de papel para degradar hidrocarbonetos residuais presos nos maquinários (OKINO-DELGADO et al., 2017; GOLAKI et al., 2015; FLEURI et al., 2014a; MESSIAS et al., 2011; TREICHEL et al., 2010; HASAN et al., 2006).

Já as enzimas proteolíticas representam 60% do mercado de enzimas por apresentarem a capacidade de hidrolisar ligações peptídicas. Dessa forma, elas são aplicadas na produção de bebidas e alimentos com cervejas, queijos e amaciante de carne; na indústria têxtil para o tratamento do couro e degomagem da seda; na farmacêutica sendo a base de medicamentos com atividades digestivas e anti-inflamatórias; e na química como produtos para limpeza de lentes de contato, remoção de prata de raio-x e no tratamento de efluentes (CASTRO e SATO, 2013; JOSHI e SATYANARAYANA, 2013; FORNBACKE e CLARSUND, 2013; ZAMBARE et al., 2011; PAWAR et al., 2009).

Fontes de produção para tais enzimas são exploradas com o intuito de baratear os custos gerais do bioprocesso e investigar mecanismos de ação enzimáticos distintos. As

enzimas de origem vegetal (obtenção direta) são tidas como mais seguras e podem diminuir etapas de processamento tornando-se menos caras; enquanto que as microbianas (obtenção indireta) são mais aproveitadas em escala industrial devido à grande diversidade de produtos obtidos de acordo com a ampla variedade de resíduos agroindustriais disponíveis somado à pluralidade de micro-organismos existente na natureza que podem se enquadrar como veículos de transformação (PAQUES e MACEDO, 2006). Ambas as formas de obtenção se utilizam de resíduos, pois, de maneira geral, eles são ricos em matéria lignocelulósica, açúcares, compostos fenólicos, micro e macronutrientes (MOREIRA et al., 2012). Porém, além de estudos econômicos para compreender a viabilidade da origem adotada, faz-se necessário realizar a caracterização bromatológica dos resíduos para analisar a sua composição nutricional e assim adequá-las às aplicações dos produtos resultantes.

Concomitante a procura por novas fontes de biomoléculas, no mundo são geradas grandes quantidades de biomassa da ordem de 1,3 bilhão de toneladas de alimentos desperdiçados, o que estimula ainda mais trabalhos de reaproveitamento de resíduos agroindustriais (FAO, 2019). Nesse cenário, os resíduos de laranja e uva despontam como potenciais fontes de enzimas tanto vegetais quanto microbianas.

Em relação ao mercado agrícola brasileiro, a citricultura produziu 17 milhões de toneladas de laranja em 2018 (CITRUSBR, 2019), sendo que 43% da massa total da laranja é convertido em resíduos no processamento de suco que podem ser divididos nas frações industriais: bagaço, casca e frit que, respectivamente, correspondem à 37, 35 e 14% desse valor (OKINO-DELGADO et al., 2018a). Já a produção de vinhos e sucos de uva gera resíduos correspondentes a 20% do total da fruta, cuja quantia gira em torno de 1,5 milhão de toneladas/ano de uva produzida (EMBRAPA, 2020).

Os descartes dessas culturas podem ser considerados resíduos, uma vez que mesmo com possíveis aplicações menos nobres, há excedentes sem nenhuma aplicação direta até o momento. Assim sendo, esta pesquisa investiga a obtenção de fitases, lipases e proteases oriundas de resíduos de laranja e uva de forma isolada ou fermentada por fungos.

1.2. Objetivos

- Explorar os resíduos de laranja e uva processados mais próximos à realidade industrial de forma isolada ou fermentada por *Aspergillus niger* CBMAI 2084;
- Caracterizar bromatologicamente os resíduos isolados e fermentados;
- Obter/produzir fitases, lipases e proteases a partir dos resíduos isolados e fermentados.

1.3. Material e Métodos

1.3.1. Obtenção e preparo dos resíduos

Os resíduos do processamento do suco de laranja (*Citrus sinensis* L. Osbeck var Pêra) foram obtidos da companhia JBT FoodTech (Araraquara-SP; 21°49'32.966" S, 48°9'11.185" W), após adição de água no processo de lavagem para a obtenção das frações residuais bagaço, casca e frit (Fig. 1). A água residual dessa etapa também foi analisada. As amostras foram trituradas mecanicamente (processador doméstico), liofilizadas (liofilizador L101 – Liotop®) por 48h a -60 °C, maceradas até atingir menores tamanhos de partículas e armazenadas a -20 °C (OKINO-DELGADO e FLEURI, 2014 – com modificações).

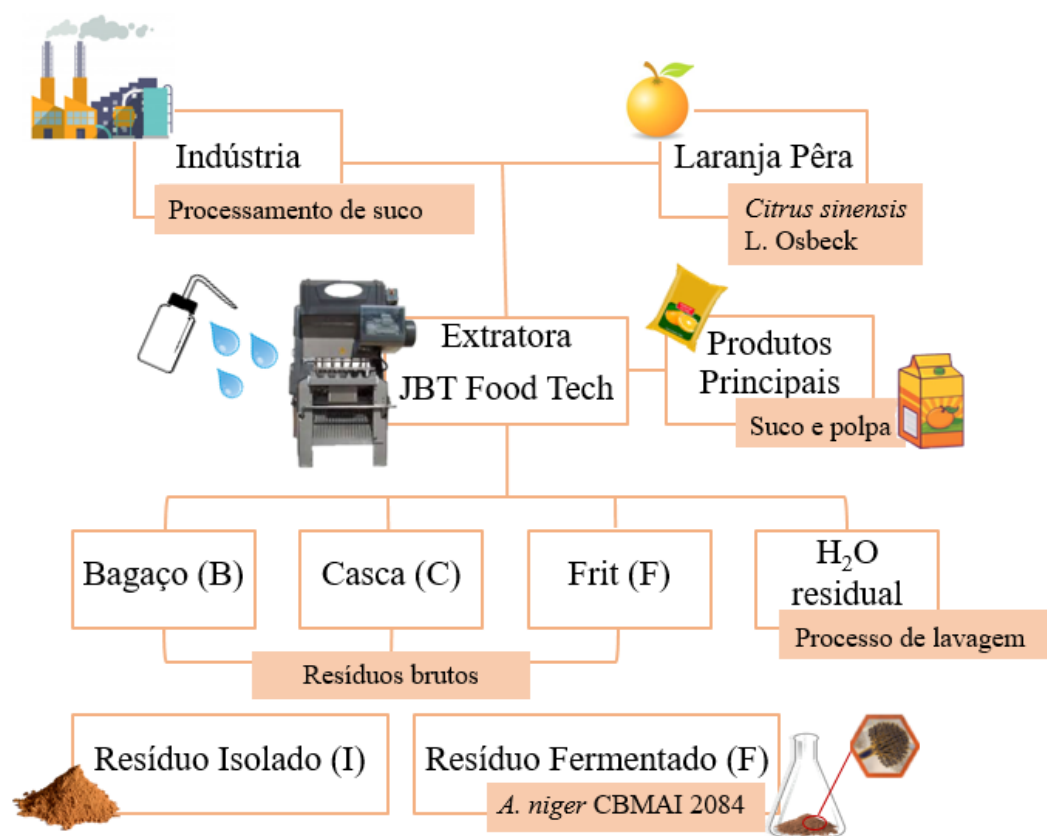


Figura 1. Organograma de reaproveitamento dos resíduos do processamento do suco de laranja advindos diretamente da indústria de suco de laranja, coletados logo após o processo de lavagem na separação em extratora JBT FoodTech para utilização de forma isolada e fermentada por *A. niger* CBMAI 2084.

Já os resíduos de uva (*Vitis vinifera* e *Vitis labrusca*), casca e semente, foram doados pela Vinícola Góes (São Roque-SP; 23°36'37.609" S, 47°9'37.386" W) após o processo de fermentação da produção de vinhos tintos com duração entre 2 a 3 semanas. O processo de produção de vinhos suaves consiste na mistura de diferentes variedades para intensificar a coloração dos tintos, dessa forma, os resíduos de uva obtidos foram de dois processos distintos, a saber: a) da produção de vinhos secos da variedade *Vitis vinifera* var Cabernet Franc; e b) da produção de vinhos suaves decorrentes da mistura de *Vitis labrusca* var Isabel e Bordô (Fig. 2). Os pré-tratamentos dos resíduos de uva seguiram o mesmo protocolo descrito para os resíduos de laranja (OKINO-DELGADO e FLEURI, 2014 – com modificações).

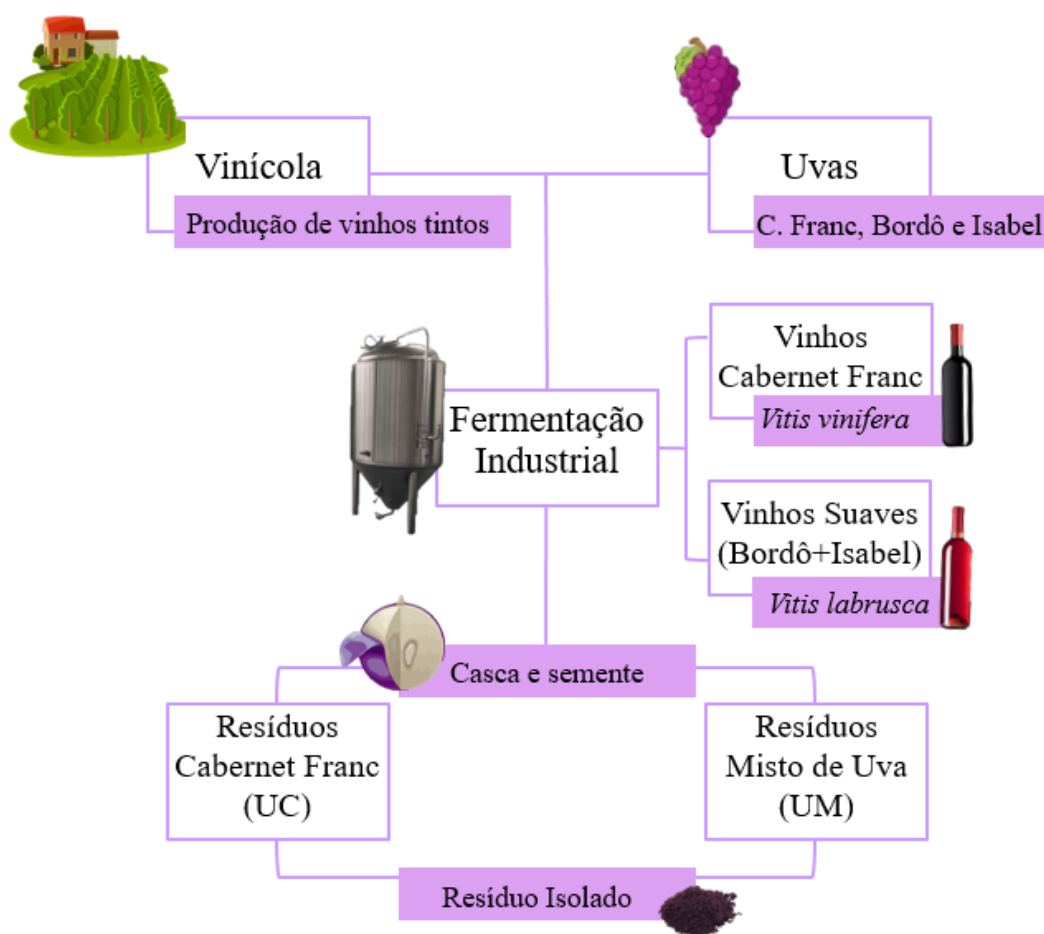


Figura 2. Organograma de reaproveitamento dos resíduos de vinícola após etapa de fermentação para a produção de vinhos tintos secos e suaves. Denominados como UC - Resíduos de uva da variedade Cabernet Franc e UM - Resíduos mistos de uvas Isabel + Bordô utilizados de forma isolada diretamente da indústria vitícola.

1.3.2. Cultivo microbiano e processo fermentativo

Os micro-organismos e resíduos que foram utilizados estão regularizados quanto ao acesso ao Patrimônio Genético sob o n. A3B3487 na plataforma do Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético (SISGEN), conforme preconizado pela Lei da Biodiversidade brasileira (n. 13.123/15).

O micro-organismo *Aspergillus niger* CBMAI 2084 isolado pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Bioprocessos (Botucatu-SP; 22°53'30.8" S, 48°29'39.3" W) foi escolhido para obtenção indireta de biomoléculas, uma vez que foi identificado como promissor em estudos anteriores (FLEURI et al., 2014b). Nesse experimento o fungo foi utilizado em fermentação em estado sólido (FES) utilizando os resíduos de laranja e uva. Para isso a cepa foi inoculada em erlenmeyers de 250 mL contendo Ágar Batata Dextrose (BDA) (Kasvi®, São José dos Pinhais, Brasil) a 30 °C para preparo da suspensão de esporos (RANI e GHOSH, 2011).

O armazenamento da linhagem ocorreu em *slants* a 4 °C em vaselina estéril (Pro-lab®, São Paulo, Brasil) para evitar ressecamento e oxidação, e foram repicados a cada três meses de armazenamento para conservação da linhagem. Ao término do período de 120h, o inóculo foi lavado em Tween 80 0,01% (v/v) (Dinâmica®, Indaiatuba, Brasil) para liberar os esporos produzidos com auxílio do uso de agitação mecânica constante (CAVALCANTE et al., 2018; SPIER et al., 2008). A concentração foi estabelecida em esporos/g de massa seca após contagem na câmara de Neubauer e utilizando Equação 1, na qual consiste na somatória da contagem de esporos encontradas em cada quadrante da câmara, multiplicado pela área total da câmara (expoente 5), convertida em volume (10⁴) e multiplicado pelo fator de diluição (FD).

$$N^{\circ} \frac{\text{células}}{\text{mL}} = \sum \text{dos quadrantes} \times 5 \times 10^4 \times FD \quad (1)$$

A FES foi realizada em erlenmeyers de 250 mL contendo 10 g de massa úmida do resíduo bruto triturado por, em média, 40 pulsações (processador doméstico) e sem passar por etapa prévia de liofilização, sem adição de água, e após esterilização em luz ultravioleta por 1h, foi inoculado o *A. niger* CBMAI 2084 em suspensão (10⁶ esporos/g) a 30 °C (Fig. 3). Após 168h, o produto resultante da fermentação foi liofilizado a -60 °C por 48h, macerado e armazenado em freezer, assim como descrito no item 1.3.1. para as amostras isoladas (ATHANÁZIO-HELIODORO et al., 2018).

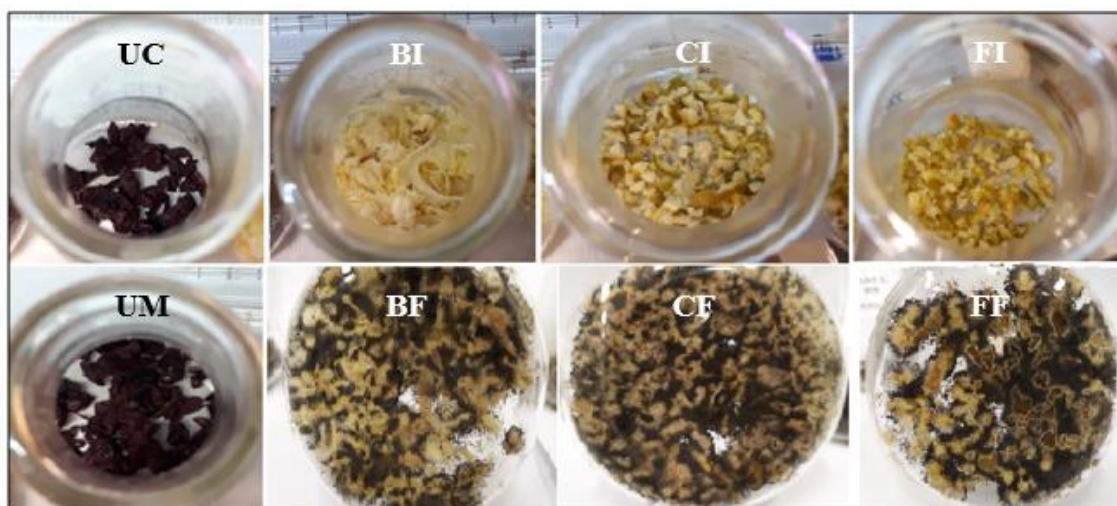


Figura 3. Classificação dos resíduos de laranja e uva de acordo com o processo de obtenção enzimática adotado. Os resíduos de laranja - bagaço, casca e frit - quando utilizados como fonte direta de enzimas foram denominados de resíduos isolados e codificados, respectivamente, como BI, CI e FI. Os resíduos de laranja - bagaço, casca e frit - fermentados com fungos, caracterizando-se como fonte indireta de obtenção de enzimas, foram denominados de resíduos fermentados e codificados, respectivamente, como BF, CF e FF. Os resíduos isolados de uva se distinguiram pela variedade adotada, a saber: UC (resíduos de uva da variedade Cabernet Franc) e UM (resíduos mistos de uvas Isabel + Bordô).

1.3.3. Caracterização bromatológica dos resíduos isolados e fermentados

Os resíduos isolados e fermentados foram caracterizados para a determinação da composição físico-química presente no seu arcabouço bioquímico e analisar a influência da atuação fúngica na FES nas proporções de macronutrientes disponíveis. Para isso, foram executados ensaios para os seguintes testes (Fig. 4):

(1) Umidade: os teores de água dos materiais foram mensurados a partir da pesagem dos mesmos (0,5 g) em gral de porcelana anteriormente secos e etiquetados, e submetidos à secagem em estufa a 105 °C até a obtenção do peso constante da matéria seca das amostras (IAL, 1985);

(2) Matéria Mineral/Cinzas (MM): foram separados gral de porcelanas numerados, previamente aquecidos em mufla (forno mufla Q318M – Quimis®) a 550 °C, resfriados em dessecador até atingir temperatura ambiente e pesados para desconsiderar seu peso no cálculo da matéria mineral. As amostras secas foram pesadas (0,5 g) e incineradas em mufla a 550-570 °C por 3h até as cinzas se encontrarem com coloração branca ou levemente acinzentada. Em seguida, foram resfriadas em dessecador e pesadas até alcançar estabilidade da massa (SILVA e QUEIROZ, 2005);

(3) Proteína Bruta (PB): realizada pelo método Kjeldahl possibilita a determinação de nitrogênio total como forma indireta para a quantificação de proteínas. Após a pesagem de 0,1 g de amostra seca transcorreu-se o processo de digestão por 3h a 400 °C com ácido sulfúrico concentrado e sulfato de sódio como catalisador (bloco digestor TE-040/25 –

Tecnal[®]). Em seguida, inicia-se a destilação com hidróxido de sódio a 40% (m/v) (destilador de nitrogênio TE-0364 – Tecnal[®]), concluída após a formação de borato de amônio observado pela mudança de coloração a partir da solução indicadora (ácido bórico a 2%, verde de bromocresol 0,1% e vermelho de metila 0,1%). Por último, o borato de amônio foi titulado com ácido clorídrico (0,01 mol/L) e PB é expressão por meio de fator de correção de 6,25, considerando que as proteínas da amostra apresentem 16% de nitrogênio (GALVANI e GAERTNER, 2006);

(4) Extrato Etéreo (EE): foram pesados 0,3 g dos resíduos secos em cartuchos numerados de Soxhlet, amarrados com arame e acoplados em suportes metálicos. Posteriormente, foi adicionado o reagente éter de petróleo no extrator Soxhlet (extrator de óleos e graxas MA044/850 - Marconi[®]) e as amostras foram submetidas à extração por 4h a 50 °C. Concluída essa etapa, os cartuchos foram retirados do equipamento, o éter foi destilado e transferido para balão com a solução extraída e, dessa forma, foi seco em estufa a 105 °C e pesado, após resfriamento no dessecador (SILVA e QUEIROZ, 2005);

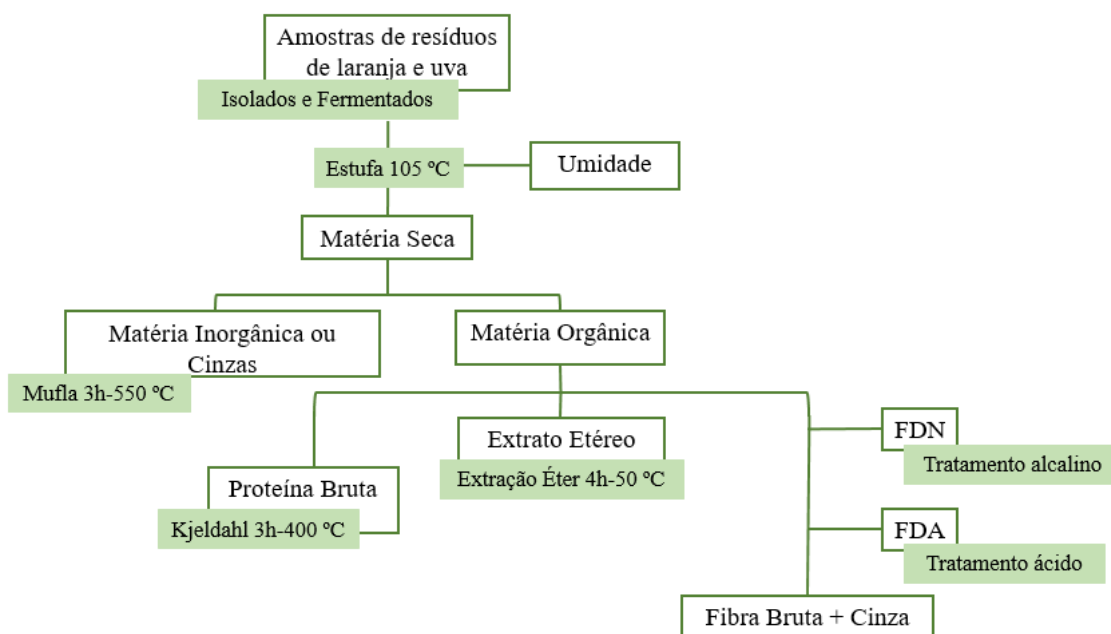


Figura 4. Fluxograma das análises bromatológicas seguindo esquema de Weende proposto por Henneberg em 1864 (Andrigueto et al., 1981) com modificação. Sugere a quantificação aproximada da composição centesimal dos resíduos isolados e fermentados, ponderando os grupos de compostos químicos: umidade ou matéria seca; cinzas ou matéria inorgânica; proteína bruta; extrato etéreo; fibra bruta.

(5) Fibra Detergente Neutro (FDN): foram pesadas 0,35 g de resíduos secos em saquinhos de tecido revestido por fibras e polipropileno, em seguida foram colocados conduzidos para digestão (bloco digestor TE-040/25 – Tecnal[®]) com 35 mL de solução detergente neutro, no qual permaneceram por 60 min. Após esse período os saquinhos foram lavados três vezes com água destilada aproximadamente a 70 °C até não sobrar mais espuma e

lavados duas vezes com acetona (40 mL). Posteriormente, as amostras foram secadas em estufa a 50 °C para obter as concentrações de celulose, hemicelulose, lignina e matéria mineral (VAN SOEST, 1963);

(6) Fibra Detergente Ácido (FDA): os ensaios de FDA foram realizados subsequentemente ao processo de FDN descrito acima, sendo que foi utilizada 35 mL de solução detergente ácido para a solubilização do interior da célula vegetal. Dessa forma, repetiu-se as etapas de lavagem e secagem em estufa a 50 °C como transcorrido no item anterior, após etapa de digestão (bloco digestor TE-040/25 – Tecnal[®]), e os valores obtidos correspondem à massa composta de celulose e lignina, e o conteúdo liberado, observado nos cálculos de subtração de FDN por FDA, se referem aos resultados da hemicelulose (VAN SOEST, 1963).

1.3.4. Obtenção de enzimas a partir dos resíduos isolados e fermentados

Os ensaios enzimáticos (fitase, lipase e protease) foram conduzidos com os resíduos de laranja e uva, isolados e fermentados.

As atividades de fitase foram determinadas com a adição de 1 mL de 5 mM 4-nitrofenilfosfato dissódico hexahidratado e 500 µL de tampão acetato de sódio pH 5,0 (0,8 M) contendo 0,005 g de amostra (STOCKMANN et al., 2003). Após a incubação a 37 °C por 10 min (banho-maria SL 150/10 – Solab), a reação foi paralisada com 2 mL de hidróxido de sódio 0,1 M. Os meios reacionais foram centrifugados por 10 min a 2.130,5 x g (centrífuga Q222T – Quimis) e a liberação de p-nitrofenol foi lida à 410 nm (espectrofotômetro UV-M51 - Bel Photonics). Para os cálculos, utilizou-se curva de calibração com solução concentrada de p-nitrofenil e suas diluições. A unidade de fitase (U) foi estabelecida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 µmol de p-nitrofenol por min de reação em cada g de extrato nas condições testadas, sendo expressa em U/g.min⁻¹.

A atividade de lipase foi determinada por metodologia titulométrica (MACEDO et al., 1997) modificada por Okino-Delgado e Fleuri (2014), utilizando 0,5 g da amostra e 5 mL de solução emulsificante: 30 mL de óleo extra virgem para 90 mL de goma arábica 7% (m/v) diluída em tampão fosfato 0,1 M pH 7,0; e 3 mL de tampão fosfato 0,1 M pH 7,0. O sistema foi incubado a 40 °C por 30 min a 130 oscilações/min (banho termostático Dubnoff – Nova Ética). A reação foi interrompida acrescentando 15 mL de acetona e álcool diluídos na proporção 50:50 (v/v) e a titulação foi realizada a partir da solução de NaOH 0,05 M e fenolftaleína como indicador. Os cálculos foram mensurados através

de curva padrão de ácido oléico e suas diluições, sendo a unidade das lipases definida como a quantidade de lipase necessária para que 1 mol de ácido graxo fosse liberado em 1 min de reação por g de peso seco da amostra sob as condições especificadas, sendo os resultados expressos em U/g.min^{-1} .

Realizaram-se ainda as atividades de lipase por espectrofotometria utilizando os substratos sintéticos p-nitrofenilbutirato (p-NPB), p-nitrofenilaurato (p-NPL) e p-nitrofenilpalmitato (p-NPP). Segundo o descrito por Calado et al. (2002) com modificações, a quantificação de ácidos graxos de cadeia curta (4 carbonos), p-NP, ocorreu através da reação de 0,01 g do resíduo liofilizado com 3,43 mL da solução substrato: 0,2% de Triton X-100 (0,02 mL), 0,43 M de tetrahidrofurano (0,02 mL) e 1,12 mM p-NPB (0,0115 mL) (Sigma-Aldrich®, St Louis, EUA) em 10 mL de tampão fosfato 50 mM pH 7,2, em temperatura ambiente por 15 min, seguido de centrifugação a $2.130,5 \times g$ por 10 min (centrífuga Q222T – Quimis) e leitura a 405 nm (espectrofotômetro UV-M51 - Bel Photonics).

O método de determinação do p-NPL, ácido graxo sintético de cadeia média (12 carbonos), deu-se pela dissolução de 2,5 mM de p-NPL (0,0082 g) (Sigma-Aldrich®, St Louis, EUA) em 10 mL de tampão fosfato de sódio 0,5 M pH 7,0 com homogeneização do agitador magnético. Para a reação, 0,25 mL dessa solução diluída foi adicionada com 0,02 g de amostra e 2,2 mL de tampão fosfato de sódio 0,5 M pH 7,0, e incubados em banho-maria (SL 150/10 – Solab) por 15 min a 30 °C. Transcorrido o tempo de reação, a centrifugação foi realizada a $2.130,5 \times g$ por 10 min (centrífuga Q222T – Quimis) e leitura a 412 nm (espectrofotômetro UV-M51 - Bel Photonics) (GUTARRA et al. 2009).

Já a atividade de p-NPP (16 carbonos) se estabeleceu conforme Mahadik et al. (2002) adaptado. Os extratos foram pesados (0,02 g), homogeneizados em 0,1 mL tampão fosfato de sódio 0,5 M pH 7,0 e incubados a 40 °C por 15 min (banho-maria SL 150/10 – Solab) em 0,9 mL de solução reacional: 0,1 g de goma arábica, 0,4 mL de Triton X-100, 0,017 g de p-NPP (Sigma-Aldrich®, St Louis, EUA) diluídos em 90 mL de água destilada e 12 mL de isopropanol. As misturas reacionais foram centrifugadas a $2.130,5 \times g$ por 10 min (centrífuga Q222T – Quimis) e o sobrenadante lido a 410 nm (espectrofotômetro UV-M51 - Bel Photonics). A curva padrão para realização dos cálculos foi determinada com solução concentrada de p-nitrofenil e suas diluições. A unidade das lipases aferida por método espectrofotométrico foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μmol de p-nitrofenol por min e a cada g de extrato sob as condições especificadas (U/g.min^{-1}).

A atividade de protease foi quantificada de acordo com a metodologia adaptada de Charney e Tomarelli (1947) com solução de azocaseína 0,5% (m/v) (Sigma-Aldrich®, St. Louis, EUA) diluída em tampão fosfato 0,1 M pH 7,0 com agitação magnética. As amostras foram pesadas (0,005 g) e acrescentadas à 0,5 mL da solução de azocaseína e 0,1 mL do tampão, incubadas a 37 °C por 40 min, paralisando a reação com 0,5 mL de ácido tricloroacético (TCA) 10% (v/v). Em seguida, foram centrifugadas a 2.130,5 x *g* por 10 min (centrífuga Q222T – Quimis). Retirou-se sobrenadante e adicionou-se 1 mL de KOH 5 M (1:1 v/v). Calculou-se os resultados a partir da Equação 2.

$$U/g = \left[\left(\frac{\text{Abs. real} - CS}{0,1} \right) / 0,5 \right] * FD \quad (2)$$

“Abs. Real” é a média das absorbâncias de cada amostra já descontado o valor dos controles das amostras (CA); “CS” trata-se do valor do controle do substrato aferido; e “FD” refere-se ao fator de diluição utilizado na leitura. A unidade proteolítica foi definida como o aumento de 0,1 na absorbância à 428 nm por min de reação, comparado com o controle da reação e expressa em U/g.min⁻¹.

Para todas as atividades enzimáticas foram feitos dois controles visando aferir a real quantificação enzimática. O controle do substrato (CS) detém os mesmos valores de solução substrato e de tampão utilizados nos tubos de reação, para que se desconte qualquer interferência resultante dessa interação. Já o controle da amostra (CA) apresenta a amostra diluída na quantidade de tampão utilizada sem a presença do substrato da reação, com o intuito de excluir a coloração natural do extrato que possa comprometer a leitura no espectrofotômetro. Tais controles foram submetidos às mesmas condições reacionais de cada metodologia enzimática utilizada.

As atividades específicas das três enzimas estudadas foram determinadas a partir da determinação da concentração de proteínas totais (PT) por Bradford (1976). Para a determinação das PT as amostras foram pesadas (0,1 g) e a elas foram adicionadas 2 mL de tampão fosfato de potássio 0,2 M e pH 6,7, seguido de centrifugação a 2.130,5 x *g* por 10 min (centrífuga Q222T – Quimis). Alíquota de 50 µL do sobrenadante foi adicionado a 2,5 mL do produto filtrado do corante da metodologia e submetidos ao tempo de reação de 15 min. A curva de calibração por caseína foi feita para realizar os cálculos de determinação de PT expressos em U/mg.

1.3.5. Análises estatísticas

A análise de normalidade foi atestada por Shapiro-Wilk e homocedasticidade por Levene. Dessa forma, os testes paramétricos foram direcionados, quando três ou mais

grupos foram testados, a análises de variância por teste Tukey e, não paramétricos foram realizados por Anova-Kruskal-Wallis embasada na estatística Student-Newman-Keuls. Comparativos entre dois grupos independentes foram realizados por teste-t, quando paramétricos, ou Mann-Witney quando não paramétricos. Os dados foram computados pelo software GraphPadPrism® 7.0 e JMP 7.0 (SAS®, Cary, EUA) e os resultados foram representados pela média $\pm$ desvio padrão da média e apresentaram diferença estatística quando $p < 0,05$.

1.4. Resultados e Discussão

1.4.1. Caracterização bromatológica dos resíduos

A caracterização centesimal realizada das três frações de resíduos de laranja isolados ou fermentados, bem como dos resíduos de uva estão apresentados em base seca na Tabela 1.

Para os resíduos de uva somente foram constatados resultados para os resíduos isolados, uma vez que, o crescimento fúngico não se desenvolveu nas condições experimentais, o que provavelmente ocorreu devido aos compostos fenólicos presentes e que podem apresentar ação antifúngica principalmente. Estudos da literatura atestam que substâncias como resveratrol possuem ação contra *Botrytis cinerea*, composto comumente encontrado em videiras (ADRIAN et al., 1997). Outro trabalho contra o mesmo fitopatógeno atribuiu a atividade antifúngica de três resíduos de uvas de variedades diferentes (Cabernet Sauvignon, Carménère e Syrah) e duas vinhas (Misiones de Rengo e Miguel Torres) ao conteúdo de antocianinas quantificado, em maior expressão por malvidina-3-O-glucosídica que inibiu o crescimento dos micélios (MENDOZA et al., 2013; SCHAEFER et al., 2008).

Malaguetta (2016) também relatou o potencial dos resíduos de uva (Chenin Blanc e Petit Verdot) como inibidores de *Phomopsis* sp., *Fusarium pallidroseum*, *Colletotrichum dematium* e *Rhizoctonia solani*. Quantidades de estilbenos já foram correlacionadas aos efeitos antifúngicos de uvas Cabernet Sauvignon caracterizando-se como uma fitoalexina capaz de agir contra o fungo *Colletotrichum falcatum* (BAVARESCO et al., 2002). Sagdic et al. (2011) atestaram o impacto positivo na atuação de cinco variedades de uva da Turquia contra cepas de *Zygosaccharomyces* sp.

Especificamente para *Aspergillus niger* foi relatado que é necessário concentrações superiores a 10^6 conídios/mL para contaminar uvas de mesa da variedade Itália (DAMBROS et al., 2016). *A. carbonarius* foi inoculado em uvas a umidade de 100%, porém o

fungo conseguiu se desenvolver em taxas mais baixas de umidade demonstrando que a quantidade de água livre não é um fator determinante (BELLÍ et al., 2007). Pesquisas ainda indicam o quão difícil é a aplicação dos bagaços de vinho tinto sem processamento devido às baixas taxas de estabilidade química (GARCÍA-LOMILLO e GONZÁLEZ-SANJOSÉ, 2017). Alguns relatos são encontrados sobre a utilização desses resíduos frescos em amadurecimento de alguns queijos italianos (DI CAGNO et al., 2007).

Dessa forma, vê-se a necessidade de estabilizar os resíduos de vinhos tintos para diferentes aplicações, porém uma das premissas deste trabalho é reaproveitar os resíduos da produção do suco de laranja e vinhos tintos de maneira bruta se apresentando mais próxima à realidade industrial. Sendo assim, como etapas adicionais de *upstream* da FES não é o foco deste estudo decidiu-se continuar a pesquisa com os resíduos de uva isolados, os quais ainda são pouco explorados.

Em estudo relatado por Teles et al. (2019) utilizando resíduos de uva Alicante bouschet, a FES se desenvolveu utilizando cepa de *Aspergillus niger* para obtenção de enzimas hidrolíticas, porém com tamanho médio de partícula em 850 µm e mistura de resíduo com farelo de trigo 1:1 (m/m), além da adição de 0,91% de solução sulfato de amônio o que pode ter resultado no êxito do processo fermentativo.

A partir da análise comparativa de resíduos de laranja isolados e fermentados, de modo geral pode-se afirmar que os submetidos à FES obtiveram valores maiores de teores de matéria mineral, proteína bruta e fibra de detergente neutro e ácido em relação às suas frações isoladas (Tabela 1). O que é factível, já que o resíduo isolado favoreceu o crescimento do micro-organismo por possuírem fontes disponíveis de micronutrientes (fornecida pelo teor de matéria mineral), nitrogênio (pelas taxas de proteína bruta) e carbono (pelos carboidratos). Ao ser analisadas as parcelas isoladas separadamente, os resíduos de uva apresentaram grande destaque em relação ao teor de lipídeos, lignina e fibras comparado aos de laranja isolados (Tabela 1).

De maneira geral, no quesito umidade, as amostras fermentadas exibiram resultados menores devido ao aumento de calor gerado pela própria metabolização do micro-organismo no substrato empacotado constitutivo do processo fermentativo e ainda pela secagem do microambiente decorrente da percolação do ar (CASCIATORI et al., 2015). Esse sobreaquecimento reduziu consideravelmente a umidade do meio de cultivo ao fim da FES, sendo que as porcentagens foram gradativamente maiores do bagaço<casca<frit em torno de, respectivamente, 60,6; 68,8 e 88,7% de redução.

Tabela 1. Caracterização bromatológica, expressa em porcentagem (%), dos resíduos de laranja e uva, em base seca. As siglas MM – Matéria Mineral ou Cinzas; PB – Proteína Bruta; FDN - Fibra de Detergente Neutro; FDA – Fibra de Detergente Ácida; Sendo B – Bagaço de laranja, C - Casca de laranja, F – Frit de laranja, I – Isolado, F – Fermentado, UC - Resíduos de uva da variedade Cabernet Franc e UM - Resíduos mistos de uvas Isabel + Bordô.

Resíduo	Umidade	MM	PB	EE	FDN	FDA
UC	76,7±2,3 ^{ac*}	5,7±0,1 ^a	13,7±0,5 ^a	5,1±0,3 ^{abc}	49,5±0,4 ^{ab}	43,8±0,4 ^{ac}
UM	72,3±1,5 ^{abc}	5,2±0,1 ^{ab}	13,4±0,2 ^a	4,1±0,0 ^{abc}	51,8±01,6 ^a	46,8±1,7 ^a
BI	69,3±0,0 ^{abc/A}	2,5±0,1 ^{b/A}	7,5±0,1 ^{b/A}	1,1±0,0 ^{abc/A}	22,5±0,5 ^{ab/A}	19,5±0,4 ^{c/A}
BF	27,2±3,9 ^{ab/B}	4,1±0,1 ^{ab/B}	11,1±0,2 ^{ab/B}	0,6±0,0 ^{ac/B}	45,4±0,3 ^{ab/B}	35,7±0,1 ^{ac/B}
CI	73,1±1,0 ^{abc/A}	2,8±0,0 ^{b/A}	7,9±0,0 ^{ab/A}	5,4±0,0 ^{ab/A}	22,1±0,5 ^{b/A}	18,5±0,4 ^{bc/A}
CF	22,8±3,7 ^{ab/B}	5,4±0,0 ^{ab/B}	13,2±0,4 ^{ab/B}	0,4±0,0 ^{c/B}	42,6±0,7 ^{ab/B}	34,7±0,9 ^{ac/B}
FI	85,1±0,0 ^{c/A}	3,6±0,0 ^{ab/A}	7,9±0,0 ^{ab/A}	6,6±0,0 ^{b/A}	22,1±0,1 ^{b/A}	19,6±0,3 ^{ac/A}
FF	9,5±0,7 ^{b/B}	3,9±1,0 ^{ab/A}	13,5±0,3 ^{a/B}	5,0±0,0 ^{abc/B}	39,3±0,1 ^{ab/B}	31,8±0,2 ^{ac/B}

*Médias que apresentam letras iguais indicam diferenças estatísticas não significativas ($p>0,05$). Letras minúsculas representam os testes comparativos entre todos os resíduos, referente a cada coluna. Letras maiúsculas referem-se às diferenças estatísticas entre os extratos isolados (fonte direta) e suas respectivas frações fermentadas (fonte indireta).

Na literatura são reportadas concentrações de água nos resíduos de laranja isolados com valores médios de 82%, dependendo da variedade avaliada, condizente com os resultados encontrados neste trabalho para a frit isolado (FI – 85,1%), porém deve-se ressaltar que os resíduos de laranja foram lavados no processamento do suco (REZZADORI e BENEDETTI, 2009). Benelli (2010) observou taxas de 76,4% de umidade em bagaço de laranja para a variedade Valência, correspondendo aos valores aproximados observados para as frações de bagaço isolado (BI – 69,3%) e casca isolada (CI – 73%).

Como discutido por Alexandrino et al. (2007), altos teores de umidade dos resíduos de laranja são interessantes para o crescimento de micro-organismos produtores de enzimas. O grupo avaliou o teor de umidade de 50 a 90% no meio de cultivo para produção

de lacases e Mn peroxidases pelo fungo *P. ostreatus* CCB2, sustentando os efeitos positivos no uso de tais resíduos para a produção enzimática, uma vez que propiciou condições ideais de crescimento fúngico em maiores níveis de umidade sem necessidade de suplementação do substrato.

Já para os resíduos de uva, as porcentagens de umidade dos resíduos de Cabernet Franc (UC) e a combinação de Isabel+Bordô (UM) foram maiores 44,2% e 40,8% do que os valores relatados por Oliveira et al. (2015) em sementes de Cabernet Sauvignon (42,8%). Além da variedade da fruta, García-Lomillo e González-Sanjós (2017) afirmaram que a intensidade da prensagem do vinho é um dos fatores determinantes da umidade presente nos resíduos, dessa forma, como os mecanismo de prensagem para UC e UM foram similares, é plausível que apresentem taxas semelhantes de umidade, mesmo tratando-se de processos distintos de produção de vinho. González-Centeno et al. (2010) avaliaram os teores de umidade em resíduos de dez variedades de *Vitis vinifera* L., reportando valores entre 50 e 72% se aproximando aos resultados de UC (76,7%) e UM (72,3%), sendo que especificamente para o bagaço de Cabernet Sauvignon a porcentagem foi de 15 a 20% menor comparados à UC e UM.

A matéria inorgânica ou cinzas (MM) dobrou nos resíduos de laranja fermentados, mas especificamente nas frações: bagaço fermentado (BF) e casca fermentada (CF), se igualando estatisticamente aos resíduos de uva. Tal fato também é documentado por Pardo (2016), no qual o bagaço de laranja (3,0%) aumentou 12% de MM quando fermentado por *Paecilomyces variotii* CBMAI 1157. Entretanto, entre os valores do frit isolado (FI – 3,6%) e frit fermentado (FF – 3,9%) não obtiveram diferença estatística (Tab. 1).

Segundos dados de TACO (2011) os percentuais de cinzas das laranjas Valência ficam em torno de 0,4%, médias menores às relatadas neste trabalho, provavelmente pela diferença de variedades ou regiões cultivadas. Rivas et al. (2008) apresentaram valores de 3,5% em base seca para cascas de laranjas, 20% maior do que CI (casca isolada), porém 36,2% menor quando comparados aos valores de CF (casca fermentada).

A MM relatada nos extratos de uvas, UC – 5,7% e UM – 5,2%, corroboram com as observações de Binaschi et al. (2018) que afirmaram médias de porcentagem de cinzas em cascas de uvas entre 2 a 8%, e altos índices podem apontar para grandes proporções de cálcio, magnésio, potássio e sódio (CECCHI, 2003). Deng et al. (2011) relataram porcentagens de 7,5 e 7,1% para cascas de Cabernet Sauvignon e Merlot, já para González-Centeno et al. (2010), as maiores concentrações de MM (4,3%) foram de engaços de Tempranillo e Merlot, isso porque o conteúdo das cinzas podem sofrer alterações mais

expressivas de acordo com os processos de vinificação, mudanças climáticas, técnicas de esmagamento, dentre outros (LACHMAN et al., 2013).

As concentrações de proteínas brutas (PB) obtiveram aumento de aproximadamente 40% nos valores de resíduos de laranja fermentados comparados aos isolados. A casca e o frit fermentados (CF e FF) se sobressaíram, apresentando 13,2 e 13,5%, respectivamente, os quais não apresentaram diferença significativa comparados aos resíduos de uva (UC - 13,7% e UM - 13,4%). Rivas et al. (2008) apresentam valores de 6,5% de PB em cascas de laranjas, enquanto Santana (2005) relatou níveis proteicos maiores de 8,9%. Pardo (2016) também observou o aumento dos índices proteicos em resíduos de laranja fermentados, no entanto, com diferenças menos atenuantes, em torno de 10%. Tal aumento do conteúdo proteico é discutido como decorrente da influência do micro-organismo no conteúdo nutricional, uma vez que são contabilizadas também as estruturas celulares fúngicas, como a parede celular e proteínas constitutivas (PARDO, 2016).

Nos resíduos de uva, Deng et al. (2011) apresentaram valores para proteína bruta semelhantes aos obtidos neste trabalho em cascas de Sauvignon (12,3%), bem como os estudos de Goñi et al. (2005) e Rao (1994) relatando valores de PB entre 11 e 13% para resíduos de uva, já García-Lomillo e González-Sanjose (2017) atestaram faixa mais ampla de 6 a 15% de PB, atribuída às diferentes cultivares estudadas e as condições de plantio.

O teor de lipídeos (EE) apresentou resultados superiores nos resíduos de laranja isolados quando comparados às suas frações fermentadas, sendo que o bagaço isolado (BI) exibiu taxas lipídicas de 1,7 vezes maiores do que o bagaço fermentado (BF), para a casca a diferença foi ainda mais expressiva, CI apresentou valores 13 vezes superiores à CF, já para o frit, os valores de FI foram 1,3 vezes maiores do que FF. As taxas de lipídeos em cascas de laranjas foram apontadas em 1,9% (RIVAS et al., 2008), no entanto, as sementes de laranjas podem conter de 28 a 35% de óleos e seis principais classes de ácidos graxos são encontradas, a saber: esteárico, linoleico, linolênico, palmítico, palmitoleico e oleico (NAGY et al., 1977).

A diminuição da proporção de lipídeos nos resíduos de laranja fermentados contrasta com o trabalho de Pardo (2016), o qual obteve acréscimos de quase 50% nos produtos fermentados. Isso pode estar correlacionado ao desempenho fúngico, pois o micro-organismo pode ser capaz de degradar ácidos graxos presentes no resíduo pela ação enzimática, como é o caso do *A. niger* CBMAI 2084 utilizado neste trabalho já reportado como produtor de lipases (FLEURI, et al, 2014 a e b). Já o veículo de transformação

utilizado pelo outro estudo, o micro-organismo *P. variotii* CBMAI 1157, ao ser comparado com cepas de *Aspergillus* sp. em relação à produção de lipases obtiveram rendimentos menores e/ou até nulos (GOPINATH et al., 2005; RAPP e BACKHAUS, 1992; ROBERTS et al., 1987). Grandes diferenças são vistas entre as frações de laranja em relação aos valores de EE%, pois as frações de frit isolado e fermentado (FI e FF) detêm os maiores resultados devido à presença de óleos essenciais originários do metabolismo secundário dos vegetais (FERRONATO e ROSSI, 2018).

As maiores proporções de lipídeos nos resíduos de uvas se encontram nas sementes, exibindo taxas lipídicas entre 14 a 17% (MIRONEASA et al., 2016). Ácidos graxos poli-insaturados são encontrados em maiores proporções nos óleos das sementes, sendo os principais: ácido linoleico (70%), ácido oleico (15%) e ácido palmítico (7%) (FERNANDES et al., 2013). Entretanto, González-Centeno et al. (2010) relataram valores para o conteúdo lipídico em uvas frescas e seus bagaços entre 0,3 e 1%, especificamente para Cabernet Sauvignon, os valores foram de 0,8 e 0,6% e para Merlot de 0,7 e 0,5%, respectivamente, apresentando os valores de Sauvignon 9,6 vezes menor do que UC (resíduos de C. Franc) e para Merlot, 10,4 vezes abaixo do que UM (resíduos de Isabel + Bordô).

Os bagaços de Merlot apresentaram EE de 7,9% (ASTA et al., 2016) e em suas cascas teores de 3,3% foram verificados (DENG et al., 2011). Valores mais altos (12,2%) foram discutidos para sementes de Sauvignon (OLIVEIRA et al., 2015) e 6,3% para suas cascas (DENG et al., 2011), os quais se assemelham às porcentagens reportadas nesta pesquisa.

Os valores de FDN dobraram nos resíduos de laranja fermentados comparados aos resíduos isolados, BF - 45,4%, CF - 42,6% e FF - 39,3%, apresentando taxas semelhantes aos resíduos de uva (UC - 49,5%; UM - 43,8%). Os valores dos resíduos de laranja isolados corroboram com as taxas de FDN e FDA relatadas por Van Soest (1994) de 23 e 22%, porém resultados menos expressivos, 13 e 12,9%, também foram pontuados por Ítavo (2000). As polpas de Pêra e Valência foram avaliadas quanto aos níveis de fibras solúveis e insolúveis, respectivamente 20,7% e 47,9% (BORTOLUZZI e MARANGONI, 2006). Porcentagens de 13,6 e 24,2%, respectivamente, de fibras solúveis e insolúveis de laranja, também são descritos (GRIGELMO-MIGUEL e MARTIN-BELLOSO, 1999).

Os resíduos de uva apresentaram maiores teores de FDA dentre os resíduos isolados, aproximadamente 43,8% para a variedade Cabernet Franc (UC) e 46,8% para Isabel + Bordô (UM). Já para os resíduos de laranja (bagaço, casca e frit), os teores de FDA dos fermentados foram maiores que dos isolados, em torno de 45, 46 e 38%, respectivamente,

sem apresentar diferenças significativas entre as frações estudadas. Rosa et al. (2019) apresentaram valores maiores de FDN em Cabernet Sauvignon (60,8%) e Merlot (62,1%), todavia os bagaços de uva foram incorporados em silagem. Em relação a FDA, os valores (46,3 e 48,3%) foram similares a UC e UM. Entretanto, Asta et al. (2016) relataram valores maiores em bagaço de Merlot para FDN e FDA (68,5 e 51,8%, respectivamente).

A composição centesimal dos resíduos revelou conteúdo de fibras muito proeminente e alta capacidade de reter a umidade o que possibilita incremento nas formulações de ração, pois pode aumentar a suculência e textura dos alimentos. Devido aos níveis proteicos, muitos estudos envolvendo farinhas desses resíduos são encontrados na literatura, além disso, são utilizados como produtos para substituírem gorduras na fabricação de sorvetes decorrente de sua composição lipídica (OLIVEIRA et al., 2019; ZOPELLARO et al., 2019; BOFF et al., 2013; PIOVESANA et al., 2013; TOZZATI et al., 2013; CLEMENTE et al., 2012; BALESTRO et al., 2011).

Dessa forma, a investigação do perfil bromatológico dos resíduos apresentados permitiu aferir as fontes nutricionais disponíveis e compreender a interação do crescimento microbiano frente aos extratos. Esse entendimento possibilita direcionar com maior êxito às produções enzimáticas e aplicações subsequentes, além de colaborar com maior robustez de dados na literatura, visto que se trata de resíduos advindos diretamente do processo industrial.

1.4.2. Atividade de fitase dos resíduos de laranja e uva

As atividades de fitase foram superiores nos resíduos isolados. Como demonstrado na Figura 5, as maiores atividades de fitase foram estabelecidas nos resíduos isolados de BI (562,1 U/g.min⁻¹) e CI (593,8 U/g.min⁻¹). Os resíduos de laranja isolados apresentaram resultados de fitases vegetais até 30 vezes maiores do que os fermentados, além disso, foram melhores inclusive que os resíduos de uvas, sendo superiores as atividades enzimáticas em até 6 vezes. A água residual (H₂O) proveniente do processo de lavagens dos resíduos obteve valores ínfimos (1,8 U/g.min⁻¹). No entanto, ressalta-se que é um resíduo aquoso pouco explorado e que pode servir como fonte de umidade para FES, tornando o processo 100% limpo, ou ainda incorporado a métodos de extração de compostos bioativos.

Os valores de fitase dos resíduos fermentados por *A. niger* CBMAI 2084, em média de 23,4 U/g.min⁻¹, corroboraram com os resultados provenientes de *A. ficuum* NRRL 3135 em polpa cítrica (26 U/g.min⁻¹), com tempo da FES reduzido em 96h, contudo,

houve suplementação de citrato de amônia como fonte de nitrogênio a 60% de umidade (SPIER et al., 2008). Todavia, Madeira et al. (2012) analisando a casca de laranja fermentado por *P. variotii* CBMAI 1157 a 66% de umidade por 72h, e após uso de Planejamento Composto Central para avaliar produção simultânea de tanases e fitases, pela mesma metodologia de determinação de Stockmann et al. (2003), alcançaram resultados de 350 U/g.min⁻¹, superiores aos valores obtidos para os resíduos de laranja fermentados (Fig. 5B), mas inferiores aos apresentados pelos resíduos isolados (Fig. 5A). A diferença entre atividades de fitase no bagaço fermentado por *P. variotii* para o fermentado por *A. niger* está na adição de sais à FES, incluindo fosfato de potássio, que pode ter melhorado o desempenho do *Paecilomyces*. Além disso, o resíduo foi peneirado até atingir granulometria inferior a 1,8 mm e estudos já correlacionam o tamanho da partícula com o fluxo de ar e dissipação de calor produzido pelo metabolismo fúngico (DEL BIANCHI et al., 2001). Assim sendo, tamanhos de partículas maiores, como é o caso dos resíduos de laranja deste trabalho que utilizou os resíduos brutos para FES, permitem mais espaço interpartículas, limita à acessibilidade aos nutrientes pelos micro-organismos (ALCÂNTARA et al., 2007; SOUZA et al., 2007; SANTOS et al., 2005).

Para atividades de fitase em polpa cítrica são relatadas ainda fermentações utilizando 10 g de extrato (8 g de polpa com 2,0 mm de diâmetro e 2 g com 0,8 mm) em *Lichtheimia blakesleeana* URM 5604 por 48h a 34 °C e 50% de umidade, a partir de suplementação com sulfato de amônio, obtendo-se valores de 264,6 U/g.min⁻¹ (NEVES et al., 2011). Todavia, Bala et al. (2014) ao comparar as atividades de fitase em FES otimizadas por *Humicola nigrescens* BJ82 em farelo de trigo e casca cítrica acrescido de sais, alcançaram valores de 48,2 e 13 U/g, respectivamente.

As fitases vegetais dos resíduos isolados de laranja e uva não foram reportadas na literatura, sendo inéditas suas obtenções nesta pesquisa. Salienta-se, portanto, o rendimento obtido nesses resíduos (Fig. 5 A e B) em que os resíduos de uva apresentaram atividades maiores de até 11 vezes em média, UC 95,9 U/g.min⁻¹ e UM 51,9 U/g.min⁻¹, comparados aos resíduos de laranja fermentados. Resultados para a atividade de fitases foram relatados comparando diversos substratos (polpa de maçã, farelo de trigo, soja e arroz) com polpa de laranja fermentada com fungo isolado FS3, entretanto, a polpa obteve maior desempenho (32 U/g) em relação aos demais (SPIER et al., 2008). Outro estudo com substratos diversos fermentados por *P. variotii* CBMAI 1157 também foi reportado

para produção de fitase (mU/g): farelo de trigo (18,2), soja (7,5), arroz (11), torta de algodão (7,6) e tungue (9,4), considerando mU atividade multiplicada por mil (CORADI, 2017).

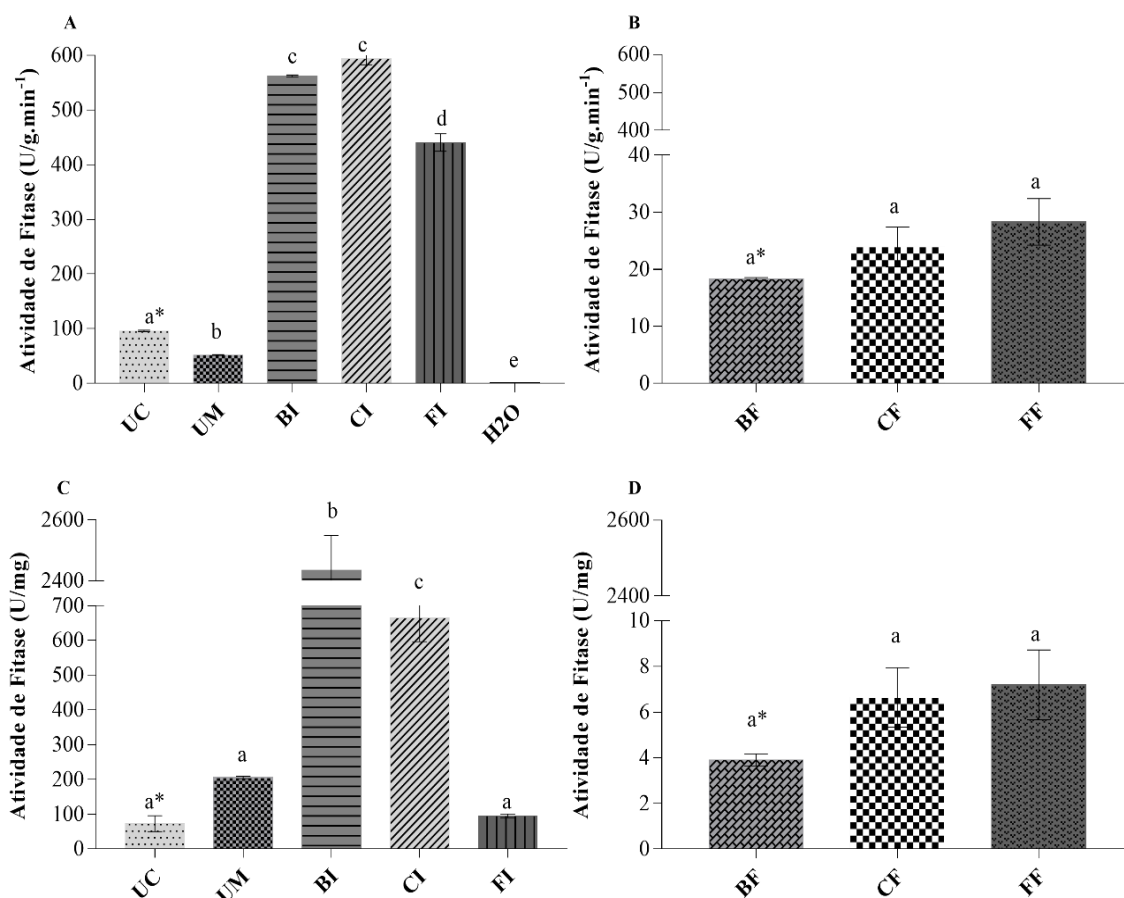


Figura 5. Atividades de fitases dos resíduos de laranja e uva, isolados e fermentados. Atividades enzimáticas, expressas em U/g.min⁻¹, dos resíduos de laranja e uva isolados (A) e fermentados (B). Atividades específicas de fitase, expressas em U/mg, dos resíduos isolados (C) e fermentados (D). Sendo B – Bagaço de laranja, C - Casca de laranja, F – Frit de laranja, H₂O – Água residual de lavagem dos resíduos de laranja, I – Isolado, F – Fermentado, UC - Resíduos de uva da variedade Cabernet Franc e UM - Resíduos mistos de uvas Isabel + Bordô. Os resultados são representados em *Médias ± DP da média e letras iguais inferem que não há diferenças significativas (p>0,05).

Diversos trabalhos discutem a produção de fitase por FES em diferentes cepas de *Aspergillus*. Sapna e Singh (2015) apresentaram 185,7 U/g para *A. oryzae* SBS50 em farelo de trigo a 30 °C por 48h e a partir de otimização do meio de cultivo com surfactante, sacarose, sulfato de magnésio e extrato de levedura. Novelli et al. (2016) obtiveram 8575 U/g de farelo de trigo em *A. niger* 40018. Apesar dos resíduos de laranja serem descritos com menores atividades de fitase frente ao farelo de trigo, a vantagem se estabelece no valor agregado dos subprodutos de trigo, uma vez que sua composição nutricional cada vez mais os direcionam à formulação de produtos a base de cereais e panificação (DE-ROOVER et al., 2019; EUROPEAN FLOUR MILLERS; 2016). Dessa forma, o valor

comercial atribuído ao farelo de trigo aumenta devido à sua incorporação na escala produtiva, que já arrecadou ao Brasil R\$ 1,1 milhão em exportações em 2014 (IBGE/PIA, 2016).

No que diz respeito às atividades específicas de fitase, representadas pelas letras (C) e (D) na Figura 5, a diferença estatística entre os resíduos de laranja isolados e fermentados aumenta drasticamente. Nota-se que a razão entre PT e atividade enzimática em BI (2436 U/mg) foi mais alta em relação a todos os demais extratos. Os valores de CI (664,2 U/mg) também merecem destaque dentre os resíduos obtidos de forma direta. Já os resíduos fermentados de laranja não apresentaram diferenças entre si ($p > 0,05$).

É relevante também pontuar que Spier et al. (2008) apontaram diferenças de rendimento da fitase de acordo com pré-tratamentos térmicos da polpa cítrica, comparando incubadora seca, vapor fluente e autoclavagem com ultravioleta (controle), concluindo que esterilizações térmicas diminuíram as atividades enzimáticas, o que pode ser explicado por maior liberação de fosfato inorgânico que poderia inibir a produção enzimática. A esterilização por UV, também empregada nesta pesquisa, aplicada em um período de 2 horas foi o método melhor empregado na pesquisa comparativa, suficiente para inibir o crescimento de outros microorganismos, sem afetar as taxas de atividades de fitase nesse processo.

1.4.3. Atividade de lipase dos resíduos de laranja e uva

As atividades de lipase quantificadas pelo método titulométrico (Fig. 6A) demonstraram a presença dessas enzimas em todos os resíduos estudados. As atividades de lipase dos resíduos de laranja isolados, no geral, foram 2,5 vezes maiores do que nos resíduos das uvas. As atividades de lipase entre os resíduos de laranja isolados não apresentaram diferenças estatísticas, porém ao que se diz sobre as atividades específicas, BI se destacou com 207,2 U/mg (Fig. 6B), valor 46 vezes maior do que relatado em polpa da variedade Natal (4,5 U/mg) (OKINO-DELGADO et al., 2018b).

Os resultados de BI foram 30% maiores do que os encontrados em bagaço da variedade Pêra (36,5 U/g) e FI obteve o dobro de atividade dos apresentados pelo frit da mesma variedade (22,9 U/g), porém as atividades de CI foram 15% menores (OKINO-DELGADO e FLEURI, 2014). As atividades enzimáticas (U/g) de BI, CI e FI foram similares ao bagaço (49), casca (53,5) e frit (52,2) em Hamlin (ATHANÁZIO-HELIODORO et al., 2018). Já Francisco et al. (2019) relatou atividades menores de 34,6, 35,2 e 38,7 U/g nas diferentes frações observadas na mesma variedade. Assim como, Pereira

(2017), em estudo comparativo entre as quatro variedades mais utilizadas para processamento de laranja, inferiu resultados menores (U/g), ordenados em 17,2, 16,1 e 19,1. Tais diferenças podem ser atribuídas a mudanças edafoclimáticas da safra e sistemas de plantio diferenciados (OKINO-DELGADO et al., 2018b). Além disso, a adição de água decorrente do processo de lavagem dos resíduos de laranja, singular nesta pesquisa, não interferiu negativamente nas atividades de lipase, o que possivelmente atesta a ligação dessas enzimas à parede celular do fruto ou a estruturas internas, sendo assim, esses resíduos com características distintas que aferiram altas taxas enzimáticas são reportados pela primeira vez com perfis mais próximos ao industrial até o presente estudo.

Quanto às atividades de lipases em substratos sintéticos não foram quantificadas atividades para p-NPL nas condições testadas, como já tem sido relatado em outros trabalhos com resíduos de laranja, nem tampouco para BI, CI e água residual (H₂O) em p-NPP, e a H₂O em p-NPB. Observou-se (Fig. 6 C e D) que a ação fúngica nos substratos de laranja foi primordial para liberar as lipases vegetais da parede ou interior da célula, ou mesmo, sintetizar enzimas microbianas resultantes dessa interação por meio de FES. Isso porque utilizando p-NPP foi verificado baixas atividades para FI (4,5 U/g.min⁻¹), no entanto, esses valores saltaram para 248,3, 293,9 e 173 U/g.min⁻¹, nessa ordem para BF, CF e FF após a fermentação. Atividades baixas de lipases de p-NPP vegetais também foram descritas em casca (1 U/g) e frit (3,5 U/g) de laranja Pêra (FRANCISCO, 2017), entretanto, resultados maiores de 45,2 U/g foram encontrados em Hamlin (OKINO-DELGADO et al., 2018).

Athanázio-Heliodoro et al. (2018) demonstraram atividades de hidrólise (U/g) maiores para p-NPP e p-NPB nos extratos vegetais (palmitato - frit 226,5 e casca 169,8; butirato - frit 289,8 e casca 359,5) do que nos extratos vegetais fermentados (palmitato - frit 73,8 em *A. niger* 01; butirato - frit 39,2 em *A. niger* INCQS 40015) contrastando com os valores obtidos tanto de p-NPP quanto p-NPB nesta pesquisa.

As atividades de lipases atuando sobre p-NPB (Fig. 6 E e F) foram superiores às p-NPP, tanto para os resíduos de laranja isolados quanto fermentados. Isso também foi relatado, em U/g, para o bagaço (71,9), casca (132,1) e frit (150,4) da variedade Natal (OKINO-DELGADO et al., 2018b), porém em menor escala aos resultados de BI, CI e FI. Francisco et al. (2019), reportou atividade de lipases (U/g) em laranjas da variedade Pêra: bagaço (7,2), casca (8,1) e frit (16), bem como Pereira (2017) relatou atividades de

lipases vegetais de laranja (U/g) com maiores valores para o bagaço (281,2) e casca (489,7), porém menores para o frit (397,6), comparados aos resíduos isolados BI, CI e FI.

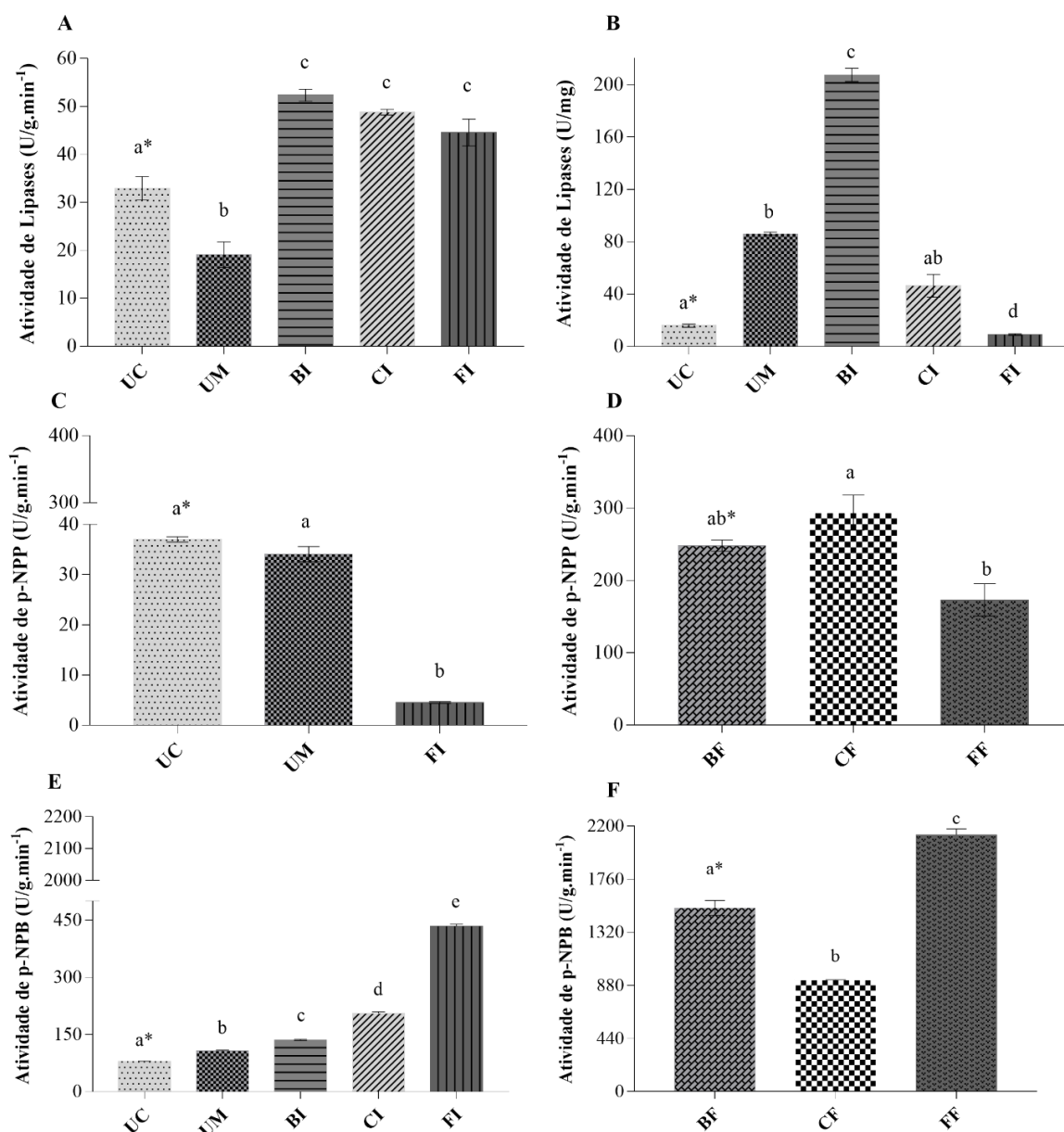


Figura 6. Atividades de lipases dos resíduos de laranja e uva, isolados e fermentados. (A) Atividades enzimáticas e (B) específicas, por titulação, nos resíduos isolados, expressos em U/g.min⁻¹ e U/mg. Atividades enzimáticas em p-NPP dos resíduos isolados (C) e fermentados (D). Atividades enzimáticas em p-NPB dos resíduos isolados (E) e fermentados (F). Sendo B – Bagaço de laranja, C - Casca de laranja, F – Frit de laranja, I – Isolado, F – Fermentado, UC - Resíduos de uva da variedade Cabernet Franc e UM - Resíduos mistos de uvas Isabel + Bordô. Os resultados são representados em *Médias ± DP da média e letras iguais inferem que não há diferenças significativas (p>0,05).

Dentre os resíduos fermentados, o frit alcançou maiores atividades enzimáticas de p-PNB, entorno de 2.127,6 U/g.min⁻¹, apresentando maiores resultados do que os encontrados por Athanázio-Heliodoro et al. (2018) em *A. niger* CBMAI 2084 (2,9) e *A. niger* INCQS 40015 (39,2).

As lipases com habilidades de hidrolisar ácidos graxos de cadeias curtas são muito notáveis. Segundo Ferreira-Dias et al. (2013) elas são empregadas na indústria alimentícia em modificação de aromas e sabores, motivando gosto picante, principalmente em laticínios. Além disso, muitos autores abordam a atuação de tais enzimas em relação a estudos na área médica. Altas atividades enzimáticas nesses substratos podem auxiliar na regulação do sistema imunológico, como diferenciação dos linfócitos T (leucócitos), manutenção de macrófagos e células dendríticas, o que está intimamente relacionado à resposta inflamatória no organismo (NICOLAOU et al., 2014; ARPAIA et al., 2013; VINOLO et al., 2011; LUHRS et al., 2002; MILLARD et al., 2002).

Ao que diz respeito aos resíduos de uva, há inúmeros estudos sobre a averiguação do comportamento deles como inibidor de lipases pancreáticas (MORENO et al., 2003). Pouco se discute sobre o uso desses resíduos como substratos isolados ou fermentados para produção de lipases. Análises em sementes de uvas indicam teores de óleos entre 10 e 20%, e os principais ácidos graxos disponíveis são os insaturados como o linoleico (72-76%, m/m) (MARTINELLO et al., 2007). Orsavova et al. (2015) quantificaram outros ácidos graxos de cadeia longa e insaturados como: esteárico (3,5%); oleico (14,3%); linolênico (0,1%) e arquedônico (0,1%).

Salgado et al. (2014) utilizaram resíduos de vinícola associados a resíduos de azeite para produzir lipases a partir de FES alcançando (U/g): 4,9 em *A. niger* MUM 03.58; 14,8, *A. ibericus* MUM 03.49; e 4,1 para *A. uvarum* MUM 08.01. Já Tacin et al. (2018) produziram lipases a partir de cultivo submerso por *Aspergillus* sp. utilizando como forma de obtenção de carbono e indutores de triglicerídeos em semente de uva, uma vez que lipases vegetais se concentram nessa porção do fruto para posterior catabolismo e liberação energética, apresentando resultados de 20,7 U/mL para atividade de lipase em 96h e 6,8 U/mg de atividade específica. Os resíduos de uva da presente pesquisa também apresentaram valores maiores para atividades de lipases que hidrolisam cadeias curtas de ácidos graxos, apesar de apresentar uma gama de ácidos graxos de cadeias longas na sua composição, o que pode ser explicado pela atividade lipolítica estar relacionada à saturação dos ácidos graxos e não ao comprimento de sua cadeia (TACIN et al., 2018).

As atividades específicas de lipase sobre p-NPP (Fig. 7 A e B) foram maiores em UM (110 U/mg) e CF (84,9 U/mg); e sobre p-NPB (Fig. 7 C e D), BI e FF se destacaram, apresentando 534 e 637,1 U/mg, respectivamente. Apesar de não haver diferenças estatísticas das atividades enzimáticas sobre p-NPP entre os resíduos de uva, a atividade específica foi maior em UM. O mesmo aconteceu entre BF e CF que não apresentaram diferenças significativas nas atividades enzimáticas, mas a taxa de atividade específica foi maior em CF. No entanto, em relação às atividade de lipases sobre o p-NPB, o melhor resultado entre os fermentados da laranja foi de FF, o que se repete observando a sua atividade específica. Já para os resíduos vegetais, FI obteve a maior atividade enzimática, porém CI apresentou correlação maior de lipase em relação ao conteúdo de proteínas totais.

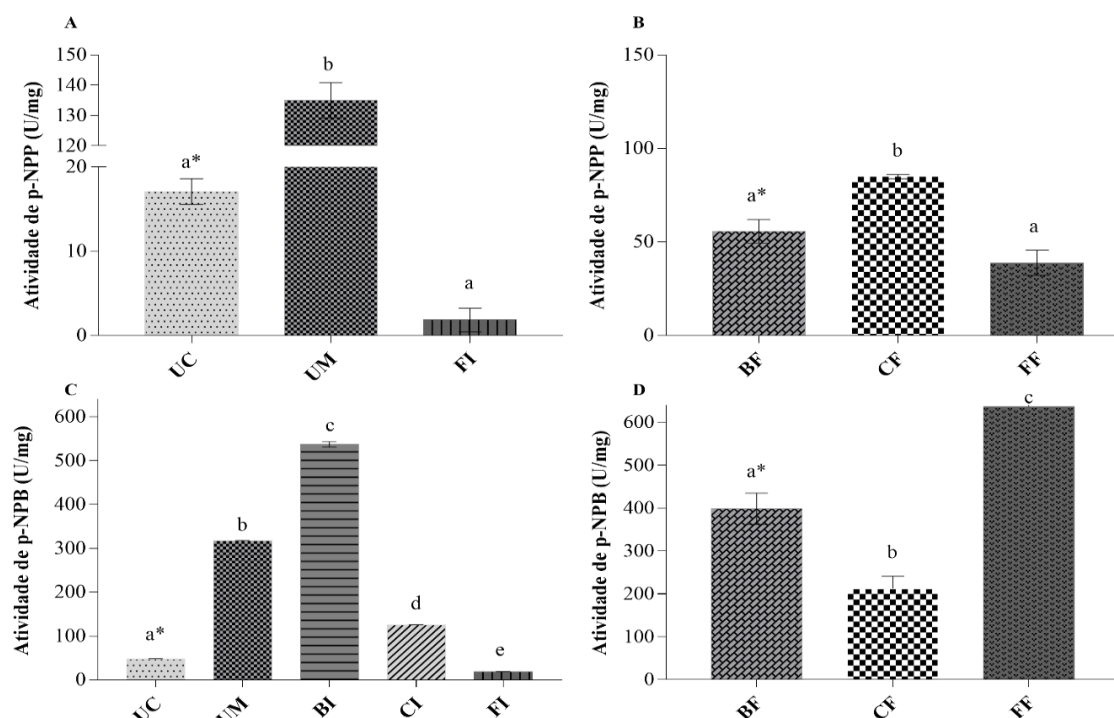


Figura 7. Atividades específicas de lipases dos resíduos de laranja e uva, isolados e fermentados, expressas em U/mg. Atividades específicas em p-NPP nos resíduos isolados (A) e fermentados (B). Atividades específicas em p-PNB das frações isoladas (C) e fermentadas (D). Sendo B – Bagaço de laranja, C – Casca de laranja, F – Frit de laranja, I – Isolado, F – Fermentado, UC – Resíduos de uva da variedade Cabernet Franc e UM – Resíduos mistos de uvas Isabel + Bordô. Os resultados são representados em *Médias $\pm$ DP da média e letras iguais inferem que não há diferenças significativas ($p > 0,05$).

1.4.4. Atividade de protease dos resíduos de laranja e uva

A Figura 8 mostra que a atuação fúngica não aumentou as atividades de proteases em relação aos resíduos isolados, o que também foi observado para as atividades de fitases. Os valores de UC foram maiores dentre os demais, porém não se manteve ao analisar as razões entre as atividades enzimáticas e PTs, que apontaram UM (174,9 U/mg) e BI (111,4 U/mg) com máximas proporções de proteases dentre o total de proteínas presentes

em seus extratos. As análises nos resíduos fermentados não apresentaram diferenças estatísticas tanto nos cálculos enzimáticos quanto nas atividades específicas de proteases.

Castro et al. (2015) discutiram a presença de proteases em substratos isolados e combinados de farelos de trigo, de soja, de algodão e cascas de laranja a partir de cepas de *A. niger*. Os maiores valores para os resíduos de laranja foram em 24h de FES, apresentando 40,6 U/g de atividade enzimática. O meio sinérgico com os quatro extratos (12,5; 62,5; 12,5; 12,5%, respectivamente) resultaram em valores altos quando comparados aos extratos isolados, exibindo as maiores atividades com 48h (202,9) e 72h (116,6) de FES. Além disso, resultados interessantes são vistos nas formulações de casca de laranja somados ao farelo de algodão que atingiram atividades de proteases de 179 U/g em 72h de fermentação.

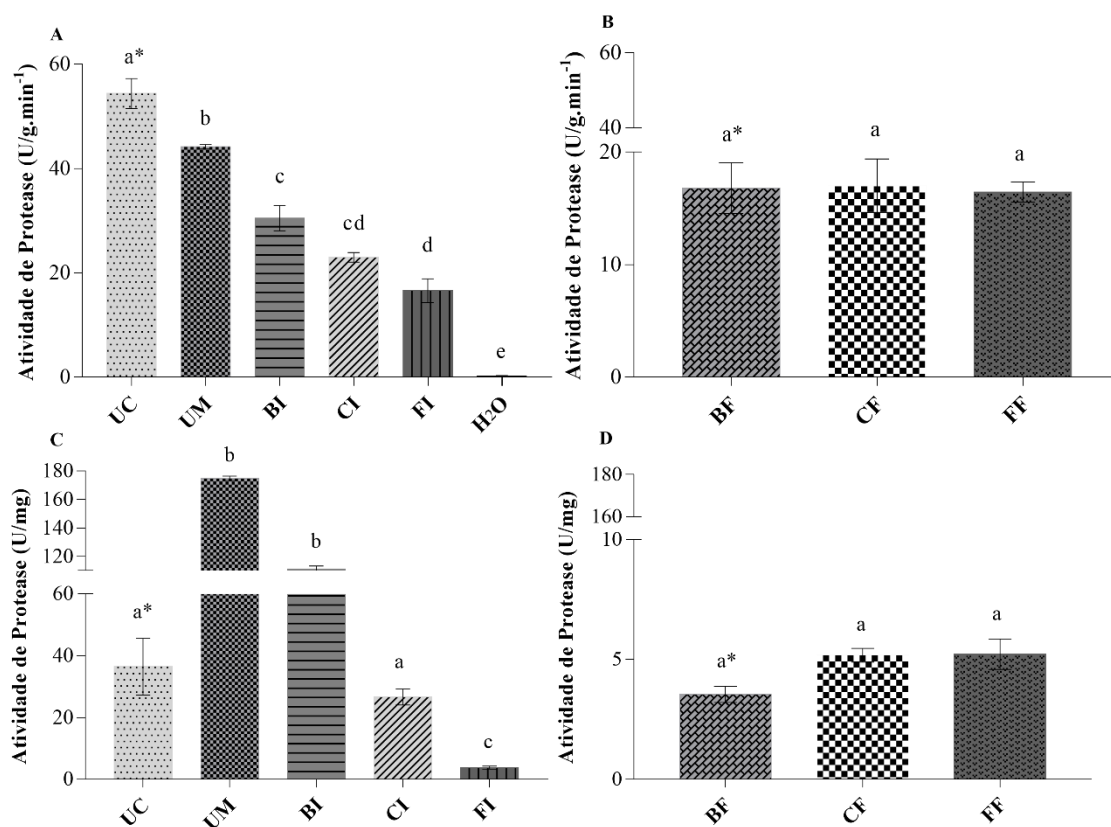


Figura 8. Atividades de proteases dos resíduos de laranja e uva, isolados e fermentados. Atividades enzimáticas, expressa em U/g.min⁻¹, nos resíduos vegetais isolados (A) e fermentados (B). Atividades específicas, expressa em U/mg, nos resíduos vegetais isolados (C) e fermentados (D). Sendo B – Bagaço de laranja, C – Casca de laranja, F – Frit de laranja, H₂O – Água residual de lavagem dos resíduos de laranja, I – Isolado, F – Fermentado, UC - Resíduos de uva da variedade Cabernet Franc e UM - Resíduos mistos de uvas Isabel + Bordô. Os resultados são representados em *Médias ± DP da média e letras iguais inferem que não há diferenças significativas (p>0,05).

Ensaio de cascas de laranja fermentados em *Bacillus* sp. demonstraram resultados de protease de 10,5 U/mL, sendo observado que mesmo com o meio suplementado os resultados foram menores do que CI (16,9 U/g) (JOHNVESLY et al., 2002). Chin et al.

(2018) reportaram atividades enzimáticas (U/mL) por metodologia diferenciada (SHIVANAND e JAYARAMAN, 2009) de cascas de laranjas fermentadas da ordem de 0,1 para proteases, 7,2 em amilases e 0,5 para celulares, apresentando maiores valores dentre outros resíduos domésticos de frutas testados (casca de banana e abacaxi).

Em relação aos resíduos de uva, não há relatos de produção de proteases em resíduos de vinícola das variedades estudadas. Koak et al. (2011) obtiveram 225,8 U de proteases quase 76% a mais do que UC, porém tais quantificações se estabeleceram em uvas maduras e não foram obtidas através de resíduos de vinícolas. Os resíduos de uva também foram utilizados como substrato para produção de tanases apresentando resultados de 84 U/g em FES por cepas incorporadas de *Penicillium chrysogenum* e *Trichoderma viride* (PARANTHAMAN et al., 2009). O bagaço de uva Alicante bouschet (casca, semente e caule) foi adicionado ao meio de cultivo com farelo de trigo para produzir enzimas hidrolíticas, favorecendo aumento catalítico em poligalacturonase, CMCase e tanases (TELES et al., 2019).

Botella et al. (2005) reportaram a produção de enzimas lignocelulósicas (celulase, xilanase e pectinase) em bagaço de uva branca (var *P. fino*) por *A. awamori*. A discussão dos resultados demonstrou que os resíduos não apresentavam as enzimas em seu arcabouço bioquímico, e sim que o desempenho microbiano proporcionou as atividades relacionadas (9,6, 40,4 e 25 U/g, em processos otimizados). Porém, os registros desta pesquisa mostram que proteases vegetais de resíduos de uva é um fato, tal contrariedade pode ser por se tratar de variedades distintas e processos de *upstream* específicos.

Dessa forma, os resíduos de uva despontam como eficientes produtores de proteases vegetais pouco explorados, seu rendimento enzimático associado ao baixo custo de obtenção pode se apresentar como alternativa promissora para produção comercial de proteases.

1.5. Conclusão

Os resíduos brutos de laranja Pêra originados da produção de suco de laranja e de uva Cabernet Franc e a mistura de Isabel e Bordô oriundos da produção vinícola por processos próximos à realidade industrial são promissores para a obtenção de enzimas como fitase, lipase e protease.

Os resíduos de laranja fermentados, de maneira geral, foram incrementados em seu teor nos parâmetros de matéria mineral, proteína bruta, fibras solúveis e insolúveis em comparação aos resíduos isolados. Os resíduos isolados apresentaram taxas de sais minerais (fonte de micronutrientes), proteínas (fonte de nitrogênio) e carboidratos (fonte de carbono) que permitiram o crescimento fúngico e produção de enzimas. Ademais, os resíduos de uva se destacaram, dentre os resíduos isolados, em todos os ensaios realizados.

A caracterização bromatológica revelou altos níveis de fibras e grande capacidade de reter umidade o que viabiliza a aplicação desses resíduos como incremento nas formulações de ração, pois garante a suculência e textura dos alimentos, complementando aos índices proteicos que, por sua vez, oferecem panorama adequado para produção de farinhas nutritivas.

Os resíduos de laranja citados possuem potencial como fontes de fitases, lipases e protease, de forma isolada ou fermentada pelo fungo *A. niger* CBMAI 2084. Os resíduos fermentados de laranja são as melhores fontes para a obtenção de lipases, enquanto que os resíduos isolados de laranja são as melhores fontes para a obtenção de fitases e os resíduos isolados de uva para proteases. Além disso, as fitases obtidas por resíduos de laranja e uva isolados não foram reportadas na literatura até o presente momento bem como lipases e proteases em resíduos de uvas isolados também são inéditas, o que justifica a necessidade de mais estudos exploratórios frente a esses resíduos.

Referências Bibliográficas

- ADRIAN, M.; JEANDET, P.; VENEAU, J.; WESTON, L. A.; BESSIS, R. Biological activity of resveratrol, a stilbenic compound from grapevines, against *Botrytis cinerea*, the causal agent for gray mold. **Journal of Chemical Ecology**, v. 23, n. 7, p. 1689-1702, 1997.
- ALCÂNTARA, S. R.; ALMEIDA, F. A. C.; SILVA, F. L. H. Emprego do bagaço seco do pedúnculo do caju para posterior utilização em um processo de fermentação semi-sólida. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 9, p. 137-142, 2007.
- ALEXANDRINO, A. M.; FARIA, H. G. D.; SOUZA, C. G. M. D.; PERALTA, R. M. Aproveitamento do resíduo de laranja para a produção de enzimas lignocelulolíticas por *Pleurotus ostreatus* (Jack: Fr). **Food Science and Technology**, v. 27, n. 2, p. 364-368, 2007.
- AGUIAR FILHO, J. M. M. **Análise enzimática de fungos lignocelulolíticos cultivados em vinhaça e bagaço de cana-de-açúcar**. Dissertação (Mestrado na área de Agronomia) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba-SP, 2008.
- AGUIAR, C. L.; MENEZES, T. J. B. Produção de celulasas e xilanase por *Aspergillus niger* IZ9 usando fermentação submersa sobre bagaço de cana-de-açúcar. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 18, n. 1, 2000.
- AGUIEIRAS, E. C. G.; CAVALCANTI-OLIVEIRA, E. D.; FREIRE, D. M. G. Current status and new developments of biodiesel production using fungal lipases. **Fuel**, v. 159, p. 52–67, 2015.
- AHMAD, R.; KHARE, S. K. Immobilization of *Aspergillus niger* cellulase on multiwall carbon nanotubes for cellulose hydrolysis. **Biorresource Technology**, v. 252, p. 72-75, 2018.
- ANDRIGUETTO, J. M.; PERLY, L.; MINARDI, I.; GEMAEL, A.; FLEMMING, J. S.; SOUZA, G. A. de; BONA FILHO, A. Nutrição animal: as bases e os fundamentos da nutrição animal. **Os alimentos**, v. 1, p. 4, 1981.
- ARPAIA, N.; CAMPBELL, C.; FAN, X.; DIKIY, S.; VAN DER VEEKEN, J.; DEROOS, P.; LIU, H.; CROSS, J. R.; PFEFFER, K.; COFFER, P. J.; RUDENSKY, A.Y. Metabolites produced by commensal bacteria promote peripheral regulatory T-cell generation. *Nature*, v. 504, n. 7480 p. 451-455, 2013.
- ASTA, F. S. D.; SEGABINAZZI, L. R., ASTA, M. F. S. D.; STRIDER, D. O., KLAHR, G. T.; DOS ANJOS, F. B. Bagaço de uva: Alternativa na dieta de ruminantes perfil bromatológico de silagens de diferentes cultivares. **Anais do Salão Internacional de Ensino, Pesquisa e Extensão**, v. 7, n. 2, 2016.
- ATHANÁZIO-HELIODORO, J. C.; OKINO-DELGADO, C. H.; FERNANDES, C. J. C.; ZANUTTO, M. R.; PRADO, D. Z.; SILVA, R. A.; FACANALI, R.; ZAMBUZZI, W. F.; MARQUES, M. O. M; FLEURI, L. F. Improvement of lipase obtaining system by orange waste-based solid-state fermentation: production, characterization and application. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v. 48, n. 7, p. 565-573, 2018. <https://doi.org/10.1080/10826068.2018.1476879>.

BALA, A.; JAIN, J.; KUMARI, A.; SINGH, B. Production of an extracellular phytase from a thermophilic mould *Humicola nigrescens* in solid state fermentation and its application in dephytinization. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 3, n. 4, p. 259-264, 2014.

BALESTRO, E. A.; SANDRI, I. G.; FONTANA, R. C. Utilização de bagaço de uva com atividade antioxidante na formulação de barra de cereais. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 13, n. 2, p. 195-201, 2011.

BAVARESCO, L.; FREGONI, M. A. R. I. O.; TREVISAN, M. A. R. C. O.; MATTIVI, F.; VRHOVSEK, U.; FALCHETTI, R. The occurrence of the stilbene piceatannol in grapes. **Vitis**, v. 41, n. 3, p. 133-136, 2002.

BELLÍ, N.; MARÍN, S.; CORONAS, I.; SANCHIS, V.; RAMOS, A. J. Skin damage, high temperature and relative humidity as detrimental factors for *Aspergillus carbonarius* infection and ochratoxin: A production in grapes. **Food Control**, v. 18, n. 11, p. 1343-1349, 2007.

BENELLI, P. Agregação de valor ao bagaço de laranja (*Citrus sinensis* L. Osbeck) mediante obtenção de extratos bioativos através de diferentes técnicas de extração. Dissertação (Mestrado na área de Engenharia de Alimentos) – Centro Tecnológico da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis-SC, 2010.

BCC RESEARCH. **Food enzymes: Global markets - 2018**. Disponível em: <<https://www.bccresearch.com/market-research/food-and-beverage/food-enzymes-global-markets.html>> Acessado em: Janeiro de 2020.

BINASCHI, M.; GARRIDO, G. D.; CIRELLI, C.; SPIGNO, G. Biotechnological strategies to valorise grape pomace for food applications. **Chemical Engineering Transactions**, v. 64, p. 367-372, 2018.

BOFF, C. C.; CRIZEL, T. D. M.; ARAUJO, R. R. D.; RIOS, A. D. O.; FLÔRES, S. H. Desenvolvimento de sorvete de chocolate utilizando fibra de casca de laranja como substituto de gordura. **Ciência Rural**, v. 43, n. 10, p. 1892-1897, 2013.

BOHN, L.; MEYER, A. S.; RASMUSSEN, S. K. Phytate: Impact on environment and human nutrition. A challenge for molecular breeding. **Journal of Zhejiang University Science B**, v. 9, n. 3, p. 165-191, 2008.

BORTOLUZZI, R. C.; MARANGONI, C. Caracterização da fibra dietética obtida da extração do suco de laranja. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 8, n. 1, p. 61-66, 2006.

BOTELLA, C.; DE ORY, I.; WEBB, C.; CANTERO, D.; BLANDINO, A. Hydrolytic enzyme production by *Aspergillus awamori* on grape pomace. **Biochemical Engineering Journal**, v. 26, n. 2-3, p. 100-106, 2005.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRASIL, Ministério Do Meio Ambiente. **Decreto lei n. 73/2011**, de 17 de junho de 2011. Altera o regime geral da gestão de resíduos e transpõe a Directiva n.º 2008/98/CE, do Parlamento Europeu e do Conselho, de 19 de Novembro. Disponível em: <www.mma.gov.br>. Acessado em: Janeiro de 2020.

- CALADO, C. R. C.; MONTEIRO, S. M. S.; CABRALI, J. M. S.; FONSECA, L. P. Effect of pre-fermentation on the production of cutinase by a recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 93, p. 354, 2002.
- CASCIATORI, F. P.; BÜCK, A.; TSOTSAS, E.; THOMÉO, J. C. Efeito de parâmetros estruturais do substrato sobre predições de temperatura e umidade em biorreatores de fermentação sólida. **Blucher Chemical Engineering Proceedings**, v. 2, n. 1, p. 312-319, 2015.
- CASTRO, R. J. S.; SATO, H. H. Synergistic effects of agroindustrial wastes on simultaneous production of protease and α -amylase under solid state fermentation using a simplex centroid mixture design. **Industrial Crops and Products**, v. 49, p. 813-821, 2013.
- CASTRO, R. J. S.; OHARA, A.; NISHIDE, T. G.; BAGAGLI, M. P.; DIAS, F. F. G.; SATO, H. H. A versatile system based on substrate formulation using agroindustrial wastes for protease production by *Aspergillus niger* under solid state fermentation. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 4, n. 4, p. 678-684, 2015.
- CAVALCANTE, P. A. W.; COÊLHO, D. F.; SILVA, C. F.; ABUD, A. K. S.; SOUZA, R. R. Utilização de resíduos lignocelulósicos na produção de celulases por *Aspergillus niger* em fermentação em estado sólido. **Scientia Plena**, n. 14, v. 6, 2018.
- CECCHI, H. M. **Fundamentos teóricos e práticos em análise de alimentos**. 2. ed. Campinas: UNICAMP, 2003.
- CHARNEY, J.; TOMARELLI, R. M. A colorimetric method for the determination of the proteolytic activity of duodenal juice. **Journal of Biological Chemistry**, v. 171, p. 501-505, 1947.
- CHIN, Y. Y.; GOETING, R.; BIN ALAS, Y.; SHIVANAND, P. From fruit waste to enzymes. **Scientia Bruneiana**, v. 17, n. 2, 2018.
- CITRUSBR – Associação Nacional dos Exportadores de Sucos Cítricos. **Exportações de suco de laranja cresceram 26,6% na safra 2019/20**. Disponível em: <<http://www.citrusbr.com/noticias/?id=312803>> Acessado em: Janeiro de 2020.
- CLEMENTE, E.; FLORES, A. C.; ROSA, C. I. L. F.; OLIVEIRA, D. M. Características da farinha de resíduos do processamento de laranja. **RECEN-Revista Ciências Exatas e Naturais**, v. 14, n. 2, p. 257-269, 2012.
- CORADI, G. V. **Produção, purificação e caracterização de fitases microbianas e potencial de produção de mioinositóis**. Tese (Doutorado na área de Ciência em Alimentos), Faculdade de Engenharia de Alimentos – Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP, 2017.
- DAMBROS, D.; MONTEIRO, A. L. R.; DE MELO, A. P.; DE OLIVEIRA LINS, S. R.; DE OLIVEIRA, S. M. A. Caracterização epidemiológica e fosfitos no manejo da podridão por *Aspergillus niger* em uva de mesa. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 11, n. 3, p. 171-177, 2016.

- DEL BIANCHI, V. L.; MORAES, I. O.; CAPALBO, D. M. F. Fermentação em estado sólido. *In*: SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotecnologia industrial: Engenharia bioquímica**. São Paulo: Edgard Blücher Ltda., 2001. cap. 13, v. 2.
- DENG, Q.; PENNER, M. H.; ZHAO, Y. Chemical composition of dietary fiber and polyphenols of five different varieties of wine grape pomace skins. **Food Research International**, v. 44, n. 9, p. 2712-2720, 2011.
- DEROOVER, L.; TIE, Y.; VERSPREET, J.; COURTIN, C. M.; VERBEKE, K. Modifying wheat bran to improve its health benefits. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, p. 1-19, 2019.
- DI CAGNO, R.; BUCHIN, S.; DE CANDIA, S.; DE ANGELIS, M.; FOX, P. F.; GOBBETTI, M. Characterization of Italian cheeses ripened under nonconventional conditions. **Journal of Dairy Science**, v. 90, n. 6, p. 2689-2704, 2007.
- EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Inteligência e Mercado de Uva e Vinho**. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/cim-inteligencia-e-mercado-uva-e-vinho/a-viticultura-no-brasil>> Acessado em: Janeiro de 2020.
- EUROPEAN FLOUR MILLERS. **European flour milling industry (2016)**. Disponível em: <<http://www.flourmillers.eu/>> Acessado em: Janeiro de 2020.
- FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Key facts on food loss and waste you should know!** Disponível em: <<http://www.fao.org/save-food/resources/keyfindings/en/>> Acessado em: Janeiro de 2020.
- FERNANDES, L.; CASAL, S.; CRUZ, R.; PEREIRA, J. A.; RAMALHOSA, E. Seed oils of ten traditional Portuguese grape varieties with interesting chemical and antioxidant properties. **Food Research International**, v. 50, n. 1, p.161-166, 2013.
- FERREIRA-DIAS, S.; SANDOVAL, G.; PLOU, F.; VALERO, F. he potential use of lipases in the production of fatty acid derivatives for the food and nutraceutical industries. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 16, n. 3, p. 12-12, 2013.
- FERRONATTO, A. N.; ROSSI, R.C. Extraction and application of orange peel essential oil as a natural ingredient. **Estudos Tecnológicos em Engenharia**, v. 12, n. 2, p. 78-93, 2018.
- FLEURI, L. F.; NOVELLI, P. K.; DELGADO C. H. O.; PIVETTA, M. R.; PEREIRA, M. S.; ARCURI, M. L.C.; CAPOVILLE, B. L. Biochemical characterization and application of lipases produced by *Aspergillus* sp. on solid-state fermentation using three substrates. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 49, p. 2585-2591, 2014a.
- FLEURI, L. F.; OLIVEIRA, M. C.; ARCURI, M. L. C.; CAPOVILLE, B. L.; PEREIRA, M. S.; OKINO-DELGADO, C. H.; NOVELLI, P. K. Production of fungal lipases using wheat bran and soybean bran incorporation of sugarcane bagasse as a co-substrate in solid-state fermentation. **Food Science and Biotechnology**, v. 23, n. 4, p. 1199–1205, 2014b.

- FORNBACKE, M.; CLARSUND, M. Cold-adapted proteases as an emerging class of therapeutics. **Infectious Diseases and Therapy**, v. 2, n. 1, p. 15-26, 2013.
- FRANCISCO V. C. B.; OKINO-DELGADO, C. H.; ZANUTTO- ELGUI, M. R.; FERNANDES, C. J. D. C.; FACANALI, R.; DA SILVA, R. A.; ZAMBUZZI, W. F.; MARQUES, M. O. M; FLEURI, L. F. Plant oil bioconversion into increase biological activity through lipases derived from wastes. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 54, n. 4, p. 1089-1099, 2019.
- FRANCISCO, V. C. B. **Resíduos de laranja como fonte direta de lipases: Obtenção, caracterização bioquímica e aplicações**. Dissertação (Mestrado na área de Biotecnologia) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho', Botucatu, 2017.
- GALVANI, F.; GAERTNER, E. Adequação da metodologia Kjeldahl para determinação de nitrogênio total e proteína bruta. **Embrapa Pantanal-Circular Técnica (INFOTECA-E)**, 2006. Disponível em: <<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/812198/1/CT63.pdf>> Acessado em: Janeiro de 2020.
- GARCÍA-LOMILLO, J.; GONZÁLEZ-SANJOSÉ, M. L. Applications of wine pomace in the food industry: Approaches and functions. **Comprehensive reviews in food science and food safety**, v. 16, n. 1, p. 3-22, 2017.
- GOLAKI, B. P.; AMINZADEH, S.; KARKHANE, A. A.; YAKHCHALI, B.; FARROKH, P.; KHALEGHINEJAD, S. H.; TEHRANI, A. A.; MEHRPOOYAN, S. Cloning, expression, purification, and characterization of lipase 3646 from thermophilic indigenous *Cohnella* sp. A01. **Protein Expression and Purification**, v. 109, p. 120–126, 2015.
- GOÑI, I.; MARTÍN, N.; SAURA-CALIXTO, F. In vitro digestibility and intestinal fermentation of grape seed and peel. **Food Chemistry**, v. 90, p. 281–286, 2005.
- GONZÁLEZ-CENTENO, M. R.; ROSSELLÓ, C.; SIMAL, S.; GARAU, M. C.; LÓPEZ, F.; FEMENIA, A. Physico-chemical properties of cell wall materials obtained from ten grape varieties and their byproducts: Grape pomaces and stems. **LWT-Food Science and Technology**, v. 43, n. 10, p. 1580-1586, 2010.
- GOPINATH, S. C. B.; ANBU, P.; HILDA, A. Extracellular enzymatic activity profiles in fungi isolated from oil-rich environments. **Mycoscience**, v. 46, n. 2, p. 119-126, 2005.
- GRIGELMO-MIGUEL, N.; MARTÍN-BELLOSO, O. Comparison of dietary fibre from by-products of processing fruits and greens and from cereals. **LWT-Food Science and Technology**, v. 32, n. 8, p. 503-508, 1999.
- GUTARRA M. L. E.; GODOY M. G.; MAUGERI F.; RODRIGUES M. I.; FREIRE D. M. G.; CASTILHO L. R. Production of an acidic and thermostable lipase of the mesophilic fungus *Penicillium simplicissimum* by solid-state fermentation. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 21, p. 5249-5254, 2009.
- HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 2, p. 235-251, 2006.

IAL - INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. Métodos químicos e físicos para análise de alimentos. 3. ed. São Paulo: IMESP, 1985. v. 1, p. 21-22.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **PIA: Pesquisa Industrial Anual** (2016). Disponível em < <http://cnae.ibge.gov.br/?view=divisao&tipo=cnae&versao=9&divisao=86> >. Acesso em: Janeiro de 2020.

ÍTAVO, L. C. V.; SANTOS, G. T. D.; JOBIM, C. C.; VOLTOLINI, T. V.; BORTOLASSI, J. R.; FERREIRA, C. C. B. Aditivos na conservação do bagaço de laranja in natura na forma de silagem. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 29, n. 5, p. 1474-1484, 2000.

ÍTAVO, L. C. V.; SANTOS, G. T.; JOBIM, C. C. Consumo e digestibilidade aparente da silagem de bagaço de laranja. **Reunião Anual Da Sociedade Brasileira De Zootecnia**, v. 35, p. 388-390, 1998.

JOHNVESLY, B.; MANJUNATH, B. R.; NAIK, G. R. Pigeon pea waste as a novel, inexpensive, substrate for production of a thermostable alkaline protease from thermoalkalophilic *Bacillus* sp. JB-99. **Bioresource Technology**, v. 82, n. 1, p. 61-64, 2002.

JOSHI, S.; SATYANARAYANA, T. Heterologous expression of yeast and fungal phytases: Developments and future perspectives. **Indian Journal of Biotechnology**, v. 14, p. 293–311, 2015.

JOSHI, S.; SATYANARAYANA, T. Biotechnology of cold-active proteases. **Biology**, v. 2, n. 2, p. 755-783, 2013.

KOAK, J. H.; KIM, H. S.; CHOI, Y. J.; BAIK, M. Y.; KIM, B. Y. Characterization of a protease from over-matured fruits and development of a tenderizer using an optimization technique. **Food Science and Biotechnology**, v. 20, n. 2, p. 485, 2011.

LACHMAN, J.; HEJTMÁNKOVÁ, A.; HEJTMÁNKOVÁ, K.; HORNÍČKOVÁ, Š.; PIVEC, V.; SKALA, O.; DĚDINA, M.; PŘIBYL, J. Towards complex utilisation of winemaking residues: Characterisation of grape seeds by total phenols, tocols and essential elements content as a by-product of winemaking. **Industrial Crops and Products**, v. 49, p.445-453, 2013.

LÜHRS, H.; GERKE, T.; MÜLLER, J. G.; MELCHER, R.; SCHAUBER, J. ; BOXBERGER, F.; SCHEPPACH, W.; MENZEL, T. Butyrate inhibits NF- κ B activation in lamina propria macrophages of patients with ulcerative colitis. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, v. 37, n. 4, p. 458-466, 2002.

MADEIRA, J. V.; MACEDO, J. A.; MACEDO, G. A. A new process for simultaneous production of tannase and phytase by *Paecilomyces variotii* in solid-state fermentation of orange pomace. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 35, n. 3, p. 477-482, 2012.

MACEDO, G. A.; PASTORE, G. M.; PARK, Y. K. Partial purification and characterization of an extracellular lipase from a newly isolated strain of *Geotrichum* sp. **Revista Brasileira de Microbiologia**, v. 28, p. 90-95, 1997.

- MAHADIK, N. D.; PUNTAMBEKAR, U. S.; BASTAWDE, K. B.; KHIRE, J. M.; GOKHADE, D. V. Production of acidic lipase by *Aspergillus niger* in solid state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 715-721, 2002.
- MALAGUETTA, H. **Extratos de resíduos agroindustriais para o controle de fungos fitopatogênicos**. Dissertação (Mestrado na área de Química na Agricultura e Meio Ambiente) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba-SP, 2016.
- MARTINELLO, M.; HECKER, G.; DEL CARMEN PRAMPARO, M. Grape seed oil deacidification by molecular distillation: Analysis of operative variables influence using the response surface methodology. **Journal of Food Engineering**, v. 81, n. 1, p. 60-64, 2007.
- MENDOZA, L.; COTORAS, M.; VIVANCO, M.; MATSUHIRO, B.; AGUIRRE, M. Evaluation of anti-fungal properties against the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea* anthocyanin rich-extracts obtained from grape pomaces. **Journal of the Chilean Chemical Society**, v. 58, n. 2, p. 1725-1727, 2013.
- MESSIAS, J. M.; COSTA, B. Z.; LIMA, V. M. G.; GIESE, E. C.; DEKKER, R. F. H.; BARBOSA, A. M. Lipases microbianas: produção propriedades e aplicações biotecnológicas. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, vol. 32, n. 2, p. 213-234, 2011.
- MILLARD, A.L.; MERTES, P. M.; ITTELET, D.; VILLARD, F.; JEANNESSON, P.; BERNARD, J. Butyrate affects differentiation, maturation and function of human monocyte-derived dendritic cells and macrophages. **Clinical e Experimental Immunology**, v. 130, n. 2, p. 245-255, 2002.
- MIRONEASA, S.; CODINĂ, G. G.; MIRONEASA, C. Otimização da farinha composta de sementes de uva e trigo para melhorar a atividade da alfa-amilase e o comportamento reológico da massa. **Revista Internacional de Propriedades Alimentares**, v. 19, n. 4, p.859-872, 2016.
- MOREIRA, L. R.; DE, S.; FERREIRA, G. V.; SANTOS, S. S. T.; RIBEIRO, A. P. S.; SIQUEIRA, F. G.; FILHO, E. X. F. The hydrolysis of agro-industrial residues by holocellulose degrading enzymes. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.43, n.2, p.498-505, 2012.
- MORENO, D. A.; ILIC, N.; POULEV, A.; BRASAEMLE, D. L.; FRIED, S. K.; RASKIN, I. Inhibitory effects of grape seed extract on lipases. **Nutrition**, v. 19, n. 10, p. 876-879, 2003.
- NAGY, S.; SHAW, P. E.; VELDHUS, M. K. **Citrus science and technology**. Westport: Avi, 1977. v. 1.
- NEVES, M. L. C.; SILVA, M. F. D.; SOUZA-MOTTA, C. M.; SPIER, M. R.; SOCCOL, C. R.; PORTO, T. S.; MOREIRA, K. A.; PORTO, A. L. F. *Lichtheimia blakesleeana* as a new potential producer of phytase and xylanase. **Molecules**, v. 16, n. 6, p. 4807-4817, 2011.
- NICOLAOU, A.; MAURO, C.; URQUHART, P.; MARELLI-BERG, F. Polyunsaturated fatty acid-derived lipid mediators and T cell function. **Frontiers in Immunology**, v. 5, p. 75, 2014.
- NONGQWENGA N.; MODI A.T. Phosphorus and potassium quantity/intensity properties of selected south african soils (kwazulu-natal) and their correlation with selected soil parameters. **Applied Ecology and Environmental Research**, v. 15, n. 3, p. 1-14, 2017.

- NOVELLI, P. K.; BARROS, M. M.; FLEURI, L. F. Novel inexpensive fungi proteases: Production by solid state fermentation and characterization. **Food Chemistry**, v. 198, p. 119-124, 2016.
- OKINO-DELGADO, C. H.; PEREIRA, M. S.; DA SILVA, J. V. I.; KHARFAN, D.; DO PRADO, D. Z.; FLEURI, L. F. Lipases obtained from orange wastes: Commercialization potential and biochemical properties of different varieties and fractions. **Biotechnology Progress**, v. 35, n. 1, p. e2734, 2018a.
- OKINO-DELGADO, C. H.; DO PRADO, D. Z.; FLEURI, L. F. Brazilian fruit processing, wastes as a source of lipase and other biotechnological products: A review. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 90, n. 3, p. 2927-2943, 2018b.
- OKINO-DELGADO, C.H.; DO PRADO, D.Z.; FACANALI, R.; MARQUES, M.M.O.; NASCIMENTO, A.S.; DA COSTA FERNANDES, C.J.; ZAMBUZZI, W.F.; FLEURI, L.F. Bioremediation of cooking oil waste using lipases from wastes. **PloS one**, v. 12, n. 10, 2017.
- OKINO-DELGADO, C. H.; FLEURI, L. F. Obtaining lipases from byproducts of orange juice processing. **Food Chemistry**, v. 163, p. 103–107, 2014.
- OLIVEIRA, F.; BRUNI, G.; MORAIS, M.; SANTOS, R.; CREXI, V. Caracterização físico-química da semente de uva da variedade Cabernet Sauvignon. **Blucher Chemical Engineering Proceedings**, v. 1, n. 2, p. 3867-3874, 2015.
- OLIVEIRA, N. A. S.; WINKELMANN, D.O.V.; TOBAL, T.M. Farinhas e subprodutos da laranja sanguínea-de-mombuca: caracterização química e aplicação em sorvete. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 22, 2019.
- ORSAVOVA, J.; MISURCOVA, L.; VAVRA AMBROZOVA, J.; VICHA, R.; MLCEK, J. Fatty acids composition of vegetable oils and its contribution to dietary energy intake and dependence of cardiovascular mortality on dietary intake of fatty acids. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 6, p. 12871-12890, 2015.
- PARANTHAMAN, R.; VIDYALAKSHMI, R.; MURUGESH, S.; SINGARAVADIVEL, K. Effects of fungal co-culture for the biosynthesis of tannase and gallic acid from grape wastes under Solid State Fermentation. **Global Journal Biotechnology Biochemistry**, v. 4, p. 29-36, 2009.
- PARDO, F. A. S. Extração de compostos fenólicos com potencial bioativo a partir de bagaço industrial de laranja seco e biotransformado usando CO₂ supercrítico. Dissertação (Mestrado na área de Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP, 2016.
- PAQUES, F. W.; MACEDO, G. Lipases de látex vegetais: Propriedades e aplicações industriais. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 93-99, 2006.
- PAWAR, R.; ZAMBARE, V.; BARVE, S.; PARATKAR, G. Application of protease isolated from *Bacillus* sp. 158 in enzymatic cleansing of contact lenses. **Biotechnology**, v. 8, n. 2, p. 276-280, 2009.

- PRADO, D. Z.; CAPOVILLE, B. L.; DELGADO, C. H.; HELIODORO, J. C.; PIVETTA, M. R.; PEREIRA, M. S.; ZANUTTO, M. R.; NOVELLI, P. K.; FRANCISCO, V. C. B.; FLEURI, L. F. Nutraceutical food: Composition, biosynthesis, therapeutic properties, and applications. In: **Alternative and Replacement Academic Food**, Academic Press, 2018. p. 95-140.
- PEREIRA, M. S. **Resíduos de laranja como fonte de enzimas e compostos bioativos**. Dissertação (Mestrado na área de Biotecnologia) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista ‘Júlio de Mesquita Filho’, Botucatu-SP, 2017.
- PIOVESANA, A.; BUENO, M. M.; KLAJN, V. M. Elaboração e aceitabilidade de biscoitos enriquecidos com aveia e farinha de bagaço de uva/Elaboration and acceptability of cookies enhanced with oat and flour grape pomace. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 16, n. 1, p. 68, 2013.
- RANI, R.; GHOSH, S. Production of phytase under solid-state fermentation using *Rhizopus oryzae*: Novel strain improvement approach and studies on purification and characterization. **Bioresource technology**, v. 102, n. 22, p. 10641-10649, 2011.
- RAO, P. U. Nutrient composition of some less-familiar oil seeds. **Food Chemistry**, v. 50, p. 378–382, 1994.
- RAPP, P.; BACKHAUS, S. Formation of extracellular lipases by filamentous fungi, yeasts, and bacteria. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 14, n. 11, p. 938-943, 1992.
- REZZADORI, K.; BENEDETTI, S. Proposições para valorização de resíduos do processamento do suco de laranja. In: **International Workshop Advances in Cleaner Production**. São Paulo: UNIP, 2009. p. 1-11.
- RIVAS, B.; TORRADO, A.; TORRE, P.; CONVERTI, A.; DOMÍNGUEZ, J. M. Submerged citric acid fermentation on orange peel autohydrolysate. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 56, p. 2380-2387, 2008.
- ROBERTS, R. G.; MORRISON, W. H.; ROBERTSON, J. A.; HANLIN, R. T. Extracellular lipase production by fungi from sunflower seed. **Mycologia**, v. 79, n. 2, p. 265-273, 1987.
- ROSA, P. P.; XAVIER, A. A. S.; CHESINI, R. C.; OLIVEIRA, A. P. T.; CAMACHO, J. S.; FARIA, M. R.; NUNES, L. P. Caracterização físico-química de silagens de bagaço de uvas tintas e brancas. **Boletim de Indústria Animal**, v. 76, p. 1-7, 2019.
- SAGDIC, O.; OZTURK, I.; OZKAN, G.; YETIM, H.; EKICI, L. YILMAZ, M. T. RP-HPLC–DAD analysis of phenolic compounds in pomace extracts from five grape cultivars: Evaluation of their antioxidant, antiradical and antifungal activities in orange and apple juices. **Food Chemistry**, v. 126, n. 4, p. 1749-1758, 2011.
- SALGADO, J. M.; ABRUNHOSA, L.; VENÂNCIO, A.; DOMÍNGUEZ, J. M.; BELO, I. Integrated use of residues from olive mill and winery for lipase production by solid state fermentation with *Aspergillus* sp. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 172, n. 4, p. 1832-1845, 2014.

- SANGSURASAK, P.; MITCHELL, D. A. Validation of a model describing two-dimensional heat transfer during solid-state fermentation in packed bed bioreactors. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 60, n. 6, p. 739-749, 1998.
- SANTANA, M. D. F. S. D. Caracterização físico-química de fibra alimentar de laranja e maracujá. Tese (Doutorado na área Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP, 2005.
- SANTOS, S. F. M.; NÓBREGA, J. E.; PINTO, G. A. S.; MACEDO, G. R.; SILVA, F. D. Caracterização do resíduo seco do pedúnculo de caju visando sua utilização como substrato para fermentação semi-sólida. **Simpósio Brasileiro de Bioprocessos**, v. 15, 2005.
- SAPNA, J.J.; SINGH, B. Characteristics and biotechnological applications of bacterial phytases. **Process Biochemistry**, v. 51, p. 159–169, 2016.
- SAPNA, J.J.; SINGH, B. Biocatalytic potential of protease-resistant phytase of *Aspergillus oryzae* SBS50 in ameliorating food nutrition. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 33, n. 3, p. 167-174, 2015.
- SCHAEFER, H. M.; RENTZSCH, M.; BREUER, M. Anthocyanins reduce fungal growth in fruits. **Natural Product Communications**, v. 3, n. 8, p. 1267-1272, 2008.
- SCHEUFELE, F. B. **Bioconversion of agro-industrial residues by microorganisms from the Amazon biome producers of lignocellulolytic enzymes**. Dissertação (Mestrado na área de Desenvolvimento de Processos) - Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Toledo-PR, 2012.
- SHEN, P.; FAN, X. R.; LI, G.W. **Microbiology Experiment**. Beijing: Higher Education Press, 1999. p. 214-215.
- SHIVANAND, P.; JAYARAMAN, G. Production of extracellular protease from halotolerant bacterium, *Bacillus aquimaris* strain VITP4 isolated from Kumta coast. **Process Biochemistry**, v. 44, n. 10, p. 1088-1094, 2009.
- SILVA, D. J.; QUEIROZ, A. C. **Análise de alimentos: Métodos químicos e biológicos**. 3. ed. Viçosa: Editora UFV –Universidade Federal de Viçosa, 2005.
- SILVA, C. E. F.; DA GAMA, B. M. V.; OLIVEIRA, L. D. M.; DE ARAUJO, L.T.; DE ARAUJO, M. L.; DE OLIVEIRA JUNIOR, A. M.; ABUD, A.D.S. O uso da laranja lima e seus resíduos no desenvolvimento de novos produtos/Use of 'lime'orange and their wastes in the development of new products. **Revista Brasileira de Engenharia de Biosistemas**, v. 10, n. 1, p. 69-96, 2016.
- SOUZA, R. L. A.; AMORIM, B. C.; SILVA, F. D.; CONRADO, L. S. Caracterização do resíduo seco do maracujá para utilização em fermentação semi-sólida. **Simpósio Nacional de Bioprocessos**, v. 16, p. 1-8, 2007.
- SPIER, M. R.; GREINER, R.; RODRIGUEZ-LEÓN, J. A.; WOICIECHOWSKI, A. L.; PANDEY, A.; SOCCOL, V. T.; SOCCOL, C. R. Phytase production using citric pulp and other residues of the agroindustry in SSF by fungal isolates. **Food Technology and Biotechnology**, v. 46, n. 2, p. 178-182, 2008.

STOCKMANN, C.; LOSEN, M.; DAHLEMS, U.; KNOCKE, C.; GELLISSEN, G.; BÜCHS, J. Effect of oxygen supply on passing, stabilizing and screening of recombinant *Hansenula polymorpha* production strains in test tubes cultures. **FEMS Yeast Research**, v. 4, p. 195-205, 2003.

TACIN, M. V. Cultivo submerso de *Aspergillus* empregando óleos vegetais visando a síntese de lipases para aplicação industrial. Tese (Doutrado na área de Alimentos e Nutrição) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista ‘Júlio de Mesquita Filho’, Araraquara-SP, 2018.

TACO. **Tabela Brasileira de Composição de Alimentos**. 4. ed. Campinas: NEPA-UNICAMP- NEPA- Universidade Estadual de Campinas, 2011. Disponível em:< <http://www.nepa.unicamp.br/taco/tabela.php?ativo=tabela>> Acesso em: Janeiro de 2020.

TELES, A. S.; CHÁVEZ, D. W.; OLIVEIRA, R. A.; BON, E. P.; TERZI, S. C.; SOUZA, E. F.; GOTTSCHALK, L. M. F.; TONON, R.V. Use of grape pomace for the production of hydrolytic enzymes by solid-state fermentation and recovery of its bioactive compounds. **Food Research International**, v. 120, p. 441-448, 2019.

TOSTO, M. S. L.; OLIVEIRA, R. L.; BAGALDO, A. R.; DANTAS, F. R.; MENEZES, D. R.; CHAGAS, E. C. D. O. Composição química e estimativa de energia da palma forrageira e do resíduo desidratado de vitivinícolas. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 8, n. 3, 2007.

TOZATTI, P.; RIGO, M.; BEZERRA, J. R. M. V.; CÓRDOVA, K. R. V.; TEIXEIRA, Â. M. Utilização de resíduo de laranja na elaboração de biscoitos tipo cracker. **RECEN-Revista Ciências Exatas e Naturais**, v. 15, n. 1, p. 135-150, 2013.

TREICHEL, H.; OLIVEIRA, D.; MAZUTTI, M. A.; DI LUCCIO, M.; OLIVEIRA, V. J. A review on microbial lipases production. **Food Bioprocess Technology**, vol. 3, n. 2, p. 182-196, 2010.

VAN SOEST, P. J. **Nutritional ecology of the ruminant**. Ithaca: Comstock Publ. Assoc, 1994, p. 476.

VAN SOEST, P. J. Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. A rapid method for the determination of fiber and lignin. **Journal of the Association Official Agricultural Chemists**, v. 46, n. 5, p. 829-835, 1963.

VERVERIS, C.; GEORGHIOU, K.; DANIELIDIS, D.; HATZINIKOLAOU, D. G.; SANTAS, P.; SANTAS, R.; CORLETI, V. Cellulose, hemicelluloses, lignin and ash content of some organic materials and their suitability for use as paper pulp supplements. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 2, p. 296-301, 2007.

VINOLO, M. A.; RODRIGUES, H. G.; NACHBAR, R. T.; CURI, R. Regulation of inflammation by short chain fatty acids. **Nutrients**, v. 3, n. 10, p. 858-876, 2011.

ZAMBARE, V.; NILEGAONKAR, S.; KANEKAR, P. A novel extracellular protease from *Pseudomonas aeruginosa* MCM B-327: Enzyme production and its partial characterization. **New Biotechnology**, v. 28, n. 2, p. 173-181, 2011.

ZOPELLARO, S. R.; DA SILVA, S. Z.; LOVATO, F. R. Compostos fenólicos totais e atividade antioxidante da farinha do resíduo da uva. **FJH-Fag Journal of Health**, v. 1, n. 2, p. 154-163, 2019.

Capítulo 3: Resíduos de laranja e uva, isolados e fermentados: fontes de antioxidantes, antimicrobianos, antidiabéticos, moduladores celulares e anti-inflamatórios

Resumo

O interesse em tecnologias limpas abre perspectivas ao reaproveitamento de resíduos agroindustriais como os derivados do processamento da laranja e de produção vinícola, que podem ser aplicados em indústrias farmacêuticas e cosméticas como fontes promissoras de compostos bioativos. Objetivou-se investigar os resíduos de laranja e uva, isolados e fermentados, como agentes antioxidantes, antimicrobianos, antidiabéticos, moduladores celulares e anti-inflamatórios. Os experimentos foram realizados a partir de extração dos resíduos a 99,8% de etanol. As análises de DPPH demonstraram que os extratos isolados de uva e fermentados de laranja foram os mais promissores apresentando em média, respectivamente, de 2 a 5 vezes comparados com isolados de laranja. Os extratos apresentaram ação contra bactérias gram-positivas e gram-negativas durante cinco dias de observação, menos para bagaço de laranja isolado e frit de laranja isolado sobre *E. coli* e os resíduos de uva Cabernet Franc sobre *S. aureus*, e resíduos de laranja isolados: casca e frit, frit fermentado e resíduos de uva Cabernet Franc em *S. enteritidis*, em 24h. A atividade antidiabética foi determinada pela inibição da α -amilase, sendo que os extratos apresentaram até 88% de inibição enzimática. Para os ensaios de viabilidade celular, os extratos de casca de laranja isolados e fermentados, em volumes de 10 μ l, foram bem sucedidos em estimular o crescimento de células endoteliais, o que permitiu indicar bioatividade frente aos processos de inflamação *in vitro*. Dessa forma, os extratos obtidos próximo à realidade industrial de forma simples, ecológica e barata, apresentaram pluralidade de atividades biológicas, divergindo em magnitude de rendimento quando isolado ou fermentado, frações residuais e variedades, com grande potencial em diferentes segmentos de aplicação.

Palavras-chave: Atividades biológicas, extratos de laranja, extratos de uva, fontes isoladas e fermentadas.

Abstract

The interest in clean technologies opens up perspectives for agro-industrial residues reuse such as those derived from orange processing and wine production, which can be applied in pharmaceutical and cosmetic industries such as promising sources of bioactive compounds. The objective was to investigate the orange and grape residues, isolated and fermented, as antioxidants, antimicrobials, antidiabetics, cellular modulators, and anti-inflammatory agents. The experiments were carried out from the extraction of residues to 99.8% ethanol. DPPH analysis showed that the isolated grape and orange fermented extracts were the most promising showing on average, from 2 to 5 times respectively, compared to orange isolated. The extracts showed action against gram-positive bacteria and gram-negative during five days of observation, less in for isolated orange bagasse and isolated frit orange on *E. coli* and the Cabernet Franc grape residues on *S. aureus* and isolated orange residues: peel and frit; fermented frit and Cabernet Franc grape residues on *S. enteritidis*, in 24h. The antidiabetic activity was determined by inhibition of α -amylase, and the extracts presented 88% of enzymatic inhibition. For cell viability tests, isolated and fermented orange peel extracts, in volumes of 10 μ l, were successful in stimulating the growth of endothelial cells, which allowed to indicate bioactivity in the face of *in vitro* inflammation processes. Thus, the extracts obtained close to industrial reality by the simple way, ecologic and cheap, showed a plurality of biological activities diverged in yield magnitude when isolated or fermented, residual fractions and varieties, with big potential in different applications segments.

Key Words: biological activities, orange extract, grape extract, isolated and fermented sources.

1.1.Introdução

A procura por tecnologias sustentáveis e economicamente módicas viabiliza o reaproveitamento de resíduos agroindustriais nas mais diversas áreas de atuação. Fundamentada ainda nos atuais Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS) da Organização das Nações Unidas (ONU) que elencaram metas acerca da redução de desperdícios de alimentos (ODS 12.3) e fortalecimento da pesquisa científica e incentivo à inovação (ODS 9.5) (IPEA, 2019), auxiliando no cumprimento de políticas públicas internacionais sobre os avanços científicos e investimento em processos diferenciados de recuperação/reuso de resíduos.

Neste quesito, o Brasil possui grande potencial de crescimento, visto que em 2019, o setor do agronegócio representou 21,4% do PIB nacional (CEPEA, 2020). Além disso, é o 3º maior produtor mundial de frutas, com 45 milhões de toneladas/ano (EMBRAPA, 2019), com destaque para os cultivos de laranja, 17 milhões de toneladas, e de uva, 1,5 milhão de toneladas/ano (EMBRAPA, 2020; CITRUSBR, 2019).

Os resíduos provenientes da cadeia produtiva de sucos de laranja e vinhos tornam-se muito atrativos como recursos disponíveis de compostos bioativos. Inúmeros estudos discutem a utilização desses resíduos como promotores de substâncias que exerçam ação antioxidante, antimicrobiana, antidiabética, antineoplásica e anti-inflamatória (FERNANDES et al., 2020; SALEEM e SAEED, 2020; HASSAN et al., 2019; HUANG et al., 2019; KONG et al., 2019; SHAHRAM et al., 2019; ATHANÁZIO-HELIODO et al., 2018; CÁDIZ-GURREA et al., 2017; PEREIRA, 2017; PEREIRA et al., 2017; SHARMA et al., 2017; XU et al., 2014; CLIFTON, 2004).

Os antioxidantes são capazes de atenuar possíveis danos relacionados ao estresse oxidativo através de reações com radicais livres (SHAHIDI e ZHONG, 2015). Tal desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e sua neutralização pelos antioxidantes no organismo podem resultar em patologias degenerativas como câncer, processos inflamatórios e diabetes mellitus (AMES et al., 1993). A relevância de substâncias antioxidantes para a promoção e cuidados da saúde é muito abordada na literatura, seja por aplicações em uso farmacêutico e/ou alimentício. Os citros são reportados com altas propriedades antioxidantes (BARBOSA et al., 2018), incluindo os resíduos brutos de laranja (FERNANDES et al., 2020), bem como suas frações: bagaço e casca, isolados e fermentados (BIER et al., 2019). Além disso, é sabido que as uvas apresentam atividades antioxidantes devido aos conteúdos fenólicos de sua constituição (LINGUA et

al., 2016), com achados interessantes em extratos, obtidos por tratamento químico, de bagaços (cascas e sementes) de uvas vermelhas e brancas (SPIGNO et al., 2007); e extratos, obtidos de ação enzimática, de bagaço de uvas vermelhas e brancas de outras variedades (MARTINS et al., 2016).

Os resíduos vegetais podem também apresentar atividade antimicrobiana, cuja utilização a partir deles tem sido incentivada por se tratar de compostos naturais com capacidade de aplicação em produtos nutracêuticos e alimentícios (YANG et al., 2014). Sementes e polpas de laranja apresentaram ação antagônica à *Escherichia coli* (MTCC 118), *Pseudomonas fluorescens* (MTCC 103) e *Staphylococcus aureus* (MTCC 1349) (ARORA e KAUR, 2013); enquanto que cascas de laranja atuaram contra *Aspergillus niger*, *Candida albicans*, *Penicillium citrinum* e *Saccharomyces cerevisiae* (SALEEM e SAEED, 2020). Resíduos de uvas vermelhas e brancas foram eficazes contra nove cepas bacterianas, obtendo melhores efeitos inibitórios sobre *S. aureus* (ATCC 49444) e cinco estirpes fúngicas, apresentando maior ação contra *A. flavus* (ATCC 9643) (VODNAR, et al., 2017).

Além das atividades biológicas relatadas, os resíduos em questão podem ser explorados quanto à ação antidiabética. O diabetes acomete 463 milhões de pessoas (9,3% da população mundial), sendo classificada como uma doença crônica multifatorial que pode acarretar diversas complicações na qualidade de vida do indivíduo (IDF, 2019).

As denominações de diabetes tipo 1 e 2 se diferenciam em relação à produção de insulina pelo pâncreas. Tratamentos para a diabetes 2 são mediados pela redução dos níveis glicêmicos pós-prandiais que ocorre através da inibição nas atividades de α -amilase e α -glucosidase, e decorrente diminuição de absorção de polissacarídeos consumidos na dieta pelo trato gastro-intestinal. Consequentemente, ao se inibir a ação dessas enzimas os níveis de glicose sanguínea são regulados, à vista disso, resíduos vegetais com ação inibitória da α -amilase podem ser avaliados com potencial antidiabético (CONFORTI et al., 2008; SANCHETI et al., 2013).

Estudos com bagaços de laranjas (*Citrus sinensis* L. Liucheng) inibindo a α -amilase (HUANG et al., 2019), bem como a exploração da capacidade hipoglicêmica de diferentes variedades de cascas e polpas de laranjas (ERNAWITA et al., 2017) têm sido reportados recentemente, evidenciando o potencial desses resíduos. Essa aptidão pode ser estendida para as sementes de uva de Cabernet Sauvignon (KONG et al., 2019) e bagaço de uva das variedades Cabernet Franc e Chardonnay (HOGAN et al., 2010).

Os resíduos e, por consequência, suas biomoléculas podem também modular a resposta de células, dessa forma, os provenientes das laranjas de variedades Valência e Natal demonstraram ação citotóxica para células cancerígenas (SCC9), no entanto, os da variedade Pêra estimularam o crescimento das referidas células (PEREIRA, 2017). Pesquisas relatam efeitos anticancerígenos dos resíduos de uva (NASSIRI e HOSSEINZADEDEH, 2016), incluindo morte celular de linhagens de câncer de cólon submetidas a extratos de uva Italia e Palieri (DINICOLA et al., 2012).

Por fim, os resíduos também podem constituir potentes anti-inflamatórios, cujas ações ocorrem por investigação de mecanismos de ação em vias de sinalização celular. Dessa forma, as células endoteliais são atuantes fulcrais para a integridade e manutenção dos sinais na parede vascular (BECHARA e SZABÓ, 2006), sendo as células endoteliais da veia umbilical humana (HUVEC) modelo de estudo muito utilizado para avaliar tratamentos com agentes bioativos naturais (PARK et al., 2006).

Os processos inflamatórios desenfreados em pacientes com doenças autoimunes e respostas alérgicas precisam ser regulados a partir do uso de compostos anti-inflamatórios que irão controlar a expressão de genes pró-inflamatórios. Para resíduos de laranjas, por exemplo, são reportadas que as altas concentrações de flavonoides presentes em grandes quantidades nas cascas de citros apresentam esses efeito (RUDRA et al., 2015), uma vez que os flavonoides podem reprimir a síntese de óxido nítrico (NO), molécula relacionada aos processos de inflamação e apoptose, pelas isoformas enzimáticas: nNOS, iNOS, eNOS, em macrófagos (MATSUDA et al., 2003; KIM et al., 1999). Cascas de laranja (*Citrus reticulata* variedade Chenpi) foram validadas como agentes inibitórios contra substâncias e enzimas associadas a doenças inflamatórias (CHEN et al., 2017), bem como exerceram ação moduladora de genes relacionados à resposta inflamatória (GOSSLAU et al., 2014).

Resíduos de uva foram capazes de inibir quinases e fator de crescimento epidérmico (RUDRA et al., 2015), outros extratos de bagaços de uva da variedade Petit Verdot demonstraram a diminuição do fator de necrose tumoral (TNF- α) e da interleucina-1 (IL-1 β) no fluído peritoneal de camundongos Balb/c (DENNY et al., 2014) e extratos de uvas nos estudos de Rodríguez-Morgado et al. (2015) indicaram propriedades anti-inflamatórias em células inflamatórias protetoras do sistema nervoso central. Ademais, experimentos com vinhos tintos indicaram modulação do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) pela ação de polifenóis que inibiram a geração de ERO e, por consequência, reduziram a expressão desse potente mediador da angiogênese (OAK et al., 2005). Os

fatores induzidos de hipóxia ($HIF1\alpha$ e $HIF1\beta$) podem ser ativados pelas proteínas quinasas (MAPK's) pelo acréscimo da formação de ERO, e assim, promover o aumento de VEGF nas células musculares lisas dos vasos (SÉFORA-SOUSA e ANGELIS-PEREIRA, 2013).

Embora, muitos estudos estejam sendo conduzidos com resíduos de laranja e uva para as diferentes atividades biológicas, no presente trabalho utilizam-se resíduos processados próximo à realidade industrial diferindo dos demais, de forma isolada e ou fermentada, com *up* e *downstream* simplificado, o que implica em novidade e justifica a pesquisa.

1.2.Objetivos

- Obter os resíduos de laranja e uva, isolados e fermentados, processados mais próximos à realidade industrial;
- Avaliar a bioatividade dos resíduos de laranja e uva, isolados e fermentados, extraído com álcool 99,8%;
- Examinar potencial de ação antioxidante, antimicrobiana, antidiabética dos extratos de laranja e uva;
- Investigar o comportamento dos extratos sob a proliferação de células endoteliais da veia do cordão umbilical (HUVEC);
- Analisar a ação anti-inflamatória dos extratos da casca de laranja na expressão dos genes *HIF1 α* , *HIF1 β* , *VEGF*, *nNOS*, *iNOS*, *eNOS* e *INF- γ* .

1.3.Material e Métodos

1.3.1. Obtenção e preparo dos resíduos

As etapas de obtenção e preparo dos resíduos utilizados em sua forma bruta, mais próxima a realidade industrial, seguiu o protocolo descrito no item 1.3.1. do capítulo 2 (OKINO-DELGADO e FLEURI, 2014 - com modificações).

1.3.2. Cultivo microbiano e processo fermentativo

Os micro-organismos e resíduos que foram utilizados seguiram a regularização sob Patrimônio Genético conforme descrito no item 1.3.2. do capítulo 2, bem como o crescimento, manutenção e fermentação em estado sólido dessa mesma unidade.

Adicionadas as linhagens microbianas trabalhadas neste capítulo diferenciadas ao capítulo 2 e sua conservação; *Escherichia coli* (ATCC 8739), *Listeria monocytogenes* (ATCC 7644), *Salmonella enteritidis* (ATCC 13076) e *Staphylococcus aureus* (ATCC

1901) foram repicadas em *slants* contendo ágar Müller-Hinton (Kasvi[®], São José dos Pinhais, Brasil) e incubados por 24h, após crescimento foi adicionada vaselina esterilizada (Prolab[®], São Paulo, Brasil) e as bactérias foram armazenadas a 4 °C para preservação das cepas. A cada 3 meses, as estirpes foram trocadas de meio para sua manutenção. Já as linhagens fúngicas de *Aspergillus fumigatus* (IOC 0081), *Aspergillus niger* (CBMAI 2084) e *Candida albicans* (IOC 2508) foram incubados por 120h em Ágar Batata Dextrose (BDA) (Kasvi[®], São José dos Pinhais, Brasil). A conservação das cepas ocorreu-se seguida os procedimentos das linhagens bacterianas.

1.3.3. Extração dos resíduos de laranja e uva

Para as atividades biológicas foram realizadas extrações utilizando etanol absoluto. Os resíduos de laranja e uva, isolados e fermentados de acordo com os itens 1.3.1 e 1.3.2. foram pesados (0,1 g) e dispersos em 5,0 mL de etanol 99,8%, em seguida, foram submetidas a banho ultrassônico na frequência de 42 kHz (Cristófoli – CRI170-2) por 16 min e centrifugação a 2.130,5 x *g* por 10 min (centrífuga Q222T – Quimis). Os sobrenadantes foram congelados a -20 °C para análises posteriores (ROSSETTO et al., 2009 - com modificações).

1.3.4. Atividade antioxidante dos extratos de laranja e uva

O perfil antioxidante foi quantificado de acordo com Zhu et al. (2002) com modificações. Foram retiradas alíquotas dos extratos obtidos no item 1.3.3. de 500 µL da solução sobrenadante que foi adicionada a 3,0 mL de etanol 99,8% e 300 µL de DPPH (2,2 difenil-1-picrilhidrazila) em concentração 2.10^{-4} g/mL homogeneizado com etanol 99,8%. A reação ocorreu por 60 min no escuro e em temperatura ambiente.

Para aferir a capacidade de sequestro de radicais livres de DPPH, dois controles submetidos às mesmas condições de preparo foram realizados: controle do substrato (CS) apresentando valores de 3,5 mL de etanol 99,8% e 0,3 mL de DPPH, mensurado para subtrair qualquer interferência resultante dos substratos na reação; controle da amostra (CA) contendo 500 µL da solução sobrenadante da respectiva amostra e 3,3 mL de etanol 99,8%, medido para que se possa excluir a coloração natural do extrato que venha influenciar a medição. A leitura foi mensurada a 517 nm (espectrofotômetro UV-M51 - Bel Photonics) e, para expressar os resultados em µmol de trolox/g de extrato (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-ácido carboxílico) foi feita curva padrão de concentração inicial de 2 mM de trolox e suas diluições. Para os cálculos expressos em porcentagens,

utilizou-se a Equação 1, na qual “Abs. Real” é a absorbância da amostra já descontada o valor de CA.

$$\% \text{ DPPH reduzido} = (CS - \text{Abs. real}) / CS * 100 \quad (1)$$

1.3.5. Atividade antimicrobiana dos extratos de laranja e uva

A atividade antimicrobiana foi realizada segundo a metodologia de difusão em discos (MOTTA E BRANDELLI, 2002) modificada por Athanázio-Heliodoro et al. (2018) e os ensaios foram realizados com os extratos das amostras obtidas no item 1.3.3. As cepas bacterianas utilizadas foram: *Escherichia coli* (ATCC 8739), *Listeria monocytogenes* (ATCC 7644), *Salmonella enteritidis* (ATCC 13076) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 1901). As cepas fúngicas investigadas foram: *Aspergillus fumigatus* (IOC 0081) e *Candida albicans* (IOC 2508).

Os *slants* de bactérias conservados foram transferidos, com o auxílio de alças de Kole, para solução *Brain Heart Infusion* (BHI) (Kasvi®, São José dos Pinhais, Brasil) por 24h em estufa a 35 °C. Transcorrido esse período, foram adicionadas alíquotas do caldo de BHI em solução salina (0,85% de NaCl m/v) ajustando as concentrações dos inóculos bacterianos para 10⁸ UFC/mL⁻¹ a partir de escala 0,5 McFarland. Estabelecida a concentração, as cepas foram espreiadas em placas ágar Müller-Hinton (Kasvi®, São José dos Pinhais, Brasil) e os discos foram distribuídos de maneira uniforme sobre o meio, em seguida, os extratos de resíduos de laranja e uva foram pipetados em volumes de 20 µL repetidos 3 vezes até atingir 60 µL. O crescimento bacteriano foi acompanhado durante 120h para se verificar a eficiência da inibição por maior espaço de tempo, e o indicador de atividade antimicrobiana foi estabelecido como a presença de halos de inibição nas placas expressos em mm (Fig. 1). O controle negativo foi estabelecido pela solução utilizada como extratora dos resíduos, o etanol 99,8%, enquanto que para os controles positivos foram utilizados 10 µg gentamicina para as estirpes gram-negativas e 30 µg vancomicina para as gram-positivas.

As atividades antifúngicas foram investigadas contra *Aspergillus fumigatus* (IOC 0081) e *Candida albicans* (IOC 2508). Os micro-organismos foram incubados por 120h a 30 °C em *slant* contendo BDA (Kasvi®, São José dos Pinhais, Brasil), e foi adicionado 6 mL de água destilada esterilizada para homogeneização. Em seguida, o conteúdo dos *slants* foi espreiado em placas com mesmo meio de cultivo e os discos foram distribuídos de forma equidistante. A pipetagem dos extratos foi similar à determinação antibacteriana, porém a incubação fúngica foi de 72h a 30 °C (MOTTA E BRANDELLI, 2002)

modificada por Athanázio-Heliodoro et al. (2018). O controle negativo foi realizado com etanol 99,8% e o controle positivo com anfotericina B (1 µg/mL). Os resultados foram aferidos de acordo com a presença de halos inibitórios apresentados na placa subtraído o halo do controle negativo observado em cada tratamento e expressos em mm (Fig. 1).

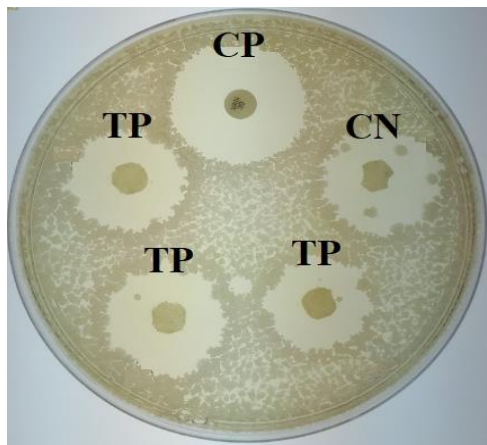


Figura 1. Representação da leitura de avaliação qualitativa da atividade antimicrobiana por difusão em discos, na qual CP – controle positivo dado pela adição dos antibióticos; CN – controle negativo realizado pela solução etanol 99,8%; TP – triplicatas do extrato dos resíduos testados.

1.3.6. Atividade antidiabética dos resíduos de laranja e uva

A atividade antidiabética foi investigada *in vitro* a partir da concentração de inibição dos resíduos sobre a α -amilase (KIM et al., 2014; SANCHETI et al., 2013; CONFORTI et al., 2005 adaptados). Os resíduos liofilizados foram pesados (0,02 g) e homogeneizados com 100 µL de amido gelatinizado 0,5% (m/v em tampão fosfato 0,02 M pH 6,9), 100 µL de α -amilase sérica (4,8 U/mL), obtida através de ratos Wistar (machos e fêmeas), foi adicionado ao meio reacionário que, em seguida, foi incubado a 37 °C por 7 min. O volume de 100 µL do reagente DNS (3,5-ácido dinitrosalicílico), preparado por meio de solução A (5 g de DNS diluído em 100 mL de hidróxido de sódio 2M) e solução B (150 g de tartarato duplo de sódio potássio e 250 mL de água destilada) (MILLER, 1959), foi incorporado e as misturas reacionais foram ebulidas por 5 min. Após, 900 µL de água destilada foram inseridos e transcorreu-se centrifugação a 2.130,5 x *g* por 10 min (centrífuga Q222T – Quimis). A leitura foi realizada a 540 nm (espectrofotômetro UV-M51 - Bel Photonics) e a atividade inibitória foi expressa em IC (Porcentagem de inibição da enzima), calculada segundo a Eq. 2.

$$\% IC = (CS - \text{Abs. real}) / CS * 100 \quad (2)$$

Subsequentemente, dois controles foram realizados como descrito no item 1.4.1. para atividade antioxidante. O controle do substrato - “CS” (100 µL de amido, 50 µL de água destilada e 100 µL de α -amilase sérica) realizado para eliminar a interferências dos

reagentes na medição da leitura; e o controle da amostra - “CA” (100 µL de amido, 0,02 g de amostra e 100 µL de tampão fosfato) subtraído da contabilização devido a própria influência da coloração do extrato enzimático. O valor de “Abs. Real” trata-se da absorbância da amostra subtraída ao seu respectivo CA e multiplicado pelo FD (fator de diluição), quando necessário.

1.3.7. Modulação celular - ênfase em citotoxicidade

As análises de citotoxicidade celular foram realizadas em colaboração com o Laboratório de Bioensaios e Dinâmica Celular (LaBio), UNESP, campos de Botucatu-SP. O protocolo adotado seguiu o descrito por Brackett et al. (2012) e Farquharson et al. (1993) com modificações (ATHANÁZIO-HELIODORO et al., 2018; PEREIRA, 2017). As células endoteliais de veias do cordão umbilical humano (HUVEC) foram cultivadas em meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) nutrido com 10% de soro fetal bovino, 100 µg/mL de sulfato de estreptomicina e 1% de antibiótico, e mantidas em estufa úmida a 37 °C, 5% de CO₂. Quando as células atingiram semi-confluência (80% da área do frasco de cultura), foram tripsinizadas, contadas e plaqueadas em placas de 96 poços em densidade 5.000 células/poço.

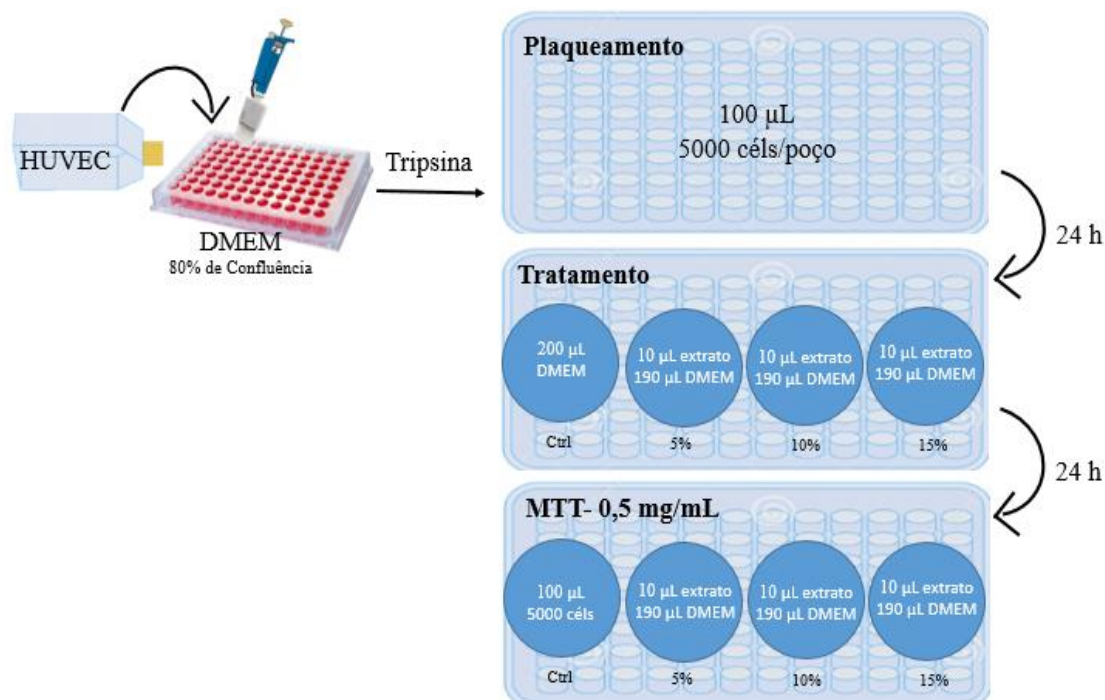


Figura 2. Esquema ilustrativo do processo de atividade mitocondrial (MTT) aplicado em células endoteliais (HUVEC) cultivadas em DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*), utilizando-se três concentrações dos extratos: 5, 10 e 15%.

Nessas condições, as células foram submetidas por 24h aos extratos dos resíduos (item 1.3.3.) em diferentes concentração dos extratos (Fig. 2): (1) 10 µl extrato + 190 µl meio; (2) 20 µl extrato + 180 µl meio; (3) 30 µl extrato + 170 µl meio. O controle das amostras (álcool 99,8%) testados nas três concentrações e o controle positivo (Ctrl), o qual é constituído das células e meio de cultivo convencional não submetido aos tratamentos, também foi submetido às diferentes concentrações de tratamento. O controle foi estabelecido a partir das células em meio convencional sem a adição dos tratamentos com os extraídos dos resíduos.

Posteriormente, o meio foi substituído por MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) e incubado em estufa por 3h, quando finalmente o meio foi retirado e o tapete celular solubilizado em DMSO (Dimetilsulfóxido) solução criopreservante, para remoção do formazan formado, subsequentemente, as amostras foram lidas a 570 nm com o auxílio de leitor de microplacas (leitor multi-modo Synergy-HTX, Biotek®). Os resultados são expressos em porcentagem em relação ao controle positivo.

1.3.8. Atividade anti-inflamatória dos extratos de laranja

Os ensaios para mensurar ação anti-inflamatória dos extratos foram analisados a partir de expressão gênica por reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-qPCR). Após as análises de MTT, foram determinadas as concentrações e selecionadas as amostras promissoras, dessa forma, as células receberam os extratos quando atingiram 80% de confluência em placa de 6 poços. Permaneceram sobre efeito do tratamento por 24h e após esse período o meio foi retirado, os poços lavados com PBS e as células lisadas com TriZOL (Life Sciences – Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) seguida para o processo de isolamento de RNA. Após isolado, a quantidade e pureza do RNA extraído foi estimada em espectrofotômetro, utilizando as razões OD 260/280 ($\geq 1,8$) e OD 260/230 ($\geq 1,0$) (NanoDrop 2000, Thermo Scientific, Uniscience). A transcrição reversa dos RNAs extraídos, foi submetida ao kit SuperScript™ First Strand (Applied - Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA), para a obtenção do cDNA. Para investigar a expressão gênica foi utilizado o reagente SYBR Green Master Mix (q-PCR®, Promega) e ensaios contendo oligonucleotídeos iniciadores (Primers) segundo recomendações do fabricante, utilizando o equipamento QuantStudio™ 3 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA). A amplificação seguiu os parâmetros do fabricante: 95 °C – 3s para desnaturação, temperatura específica do primer (Tab. 1) e 72 °C – 20s para anelamento submetidos a 40 ciclos. Os genes alvo foram *HIF1 α* , *HIF1 β* , *VEGF*, *nNOS*, *iNOS*, *eNOS* e *INF-*

γ e o gene referência foi 18s (controle endógeno). As amostras e o negativo foram feitos em duplicatas e calculado a quantidade relativa pelo método limiar crítico comparativo $\Delta\Delta C_t$.

Tabela 1. Sequências de genes envolvidos na resposta inflamatória e parâmetros da RT-PCR.

Gene	Iniciadores	5'-3' Sequência	Parâmetros
HIF1α	Forward	CATAAAGTCTGCAACATGGAAGGT	60 °C - 8s
	Reverse	ATTTGATGGGTGAGGAATGGGTT	
HIF1β	Forward	CAAGCCCCTTGAGAAGTCAG	60 °C - 8s
	Reverse	GAGGGGCTAGGCCACTATTC	
VEGF	Forward	TGCAGATTATGCGGATCAAACC	60 °C - 8s
	Reverse	TGCATTCACATTTGTTGTGCTGTAG	
nNOS	Forward	GGATCACATGTTCTGGTGTTCAG	60 °C - 8s
	Reverse	CCCAACTTTGCGCTTGAAGA	
iNOS	Forward	TGGATGCAACCCCATTTGTC	60 °C - 8s
	Reverse	CCCGCTGCCCCAGTTT	
eNOS	Forward	TATTTGATGCTCGGGACTGC	60 °C - 8s
	Reverse	AAGATTGCCTCGGTTTGTG	
INF-γ	Forward	CTGTTACTGCCAGGACCCAT	60 °C - 8s
	Reverse	TTCTGTCACTCTCCTCTTTCCAA	
18s	Forward	CGGACAGGATTGACAGATTGATAGC	60 °C - 8s
	Reverse	TGCCAGAGTCTCGTTCGTTATCG	

1.3.9. Análises estatísticas

Os testes das atividades antioxidantes, antimicrobianas e antidiabéticas foram realizados em triplicatas e submetidos às análises estatísticas computadas para comparar diferenças entre grupos. Os ensaios de citotoxicidade celular foram executados com seis réplicas biológicas. A análise de normalidade foi atestada por Shapiro-Wilk e homocedasticidade por Levene. Sendo assim, ao se analisar para três ou mais grupos, para testes paramétricos foram realizados Anova-Tukey, e para não paramétricos foram submetidos à Anova-Kruskal-Wallis. Análises de dois grupos independentes foram realizados mediante teste-t, quando paramétricos, ou Mann-Witney quando não paramétricos. Os dados foram computados pelo software GraphPadPrism® 7.0 e JMP 7.0 (SAS®, Cary, EUA), os resultados foram representados pela média $\pm$ desvio padrão da média e apresentaram diferença estatística quando $p < 0,05$.

1.4.Resultados e Discussão

1.4.1. Atividade antioxidante dos extratos de laranja e uva

Os resultados das atividades antioxidantes constam na Figura 3. Os extratos fermentados de laranja apresentaram maiores atividades antioxidantes do que os isolados de laranja. Dentre os fermentados, o bagaço foi 45 e 52,4% menor do que a casca e o frit. Os extratos de resíduos de uva (UC e UM) não apresentaram diferença estatística entre si e quando comparados ao bagaço fermentado (BF). Avaliando o grupo dos extratos isolados de laranja, FI apresentou capacidade antioxidante quase 40% maior do que BI e CI. A água residual de laranja obteve valores mais baixos de atividade (45,2 $\mu\text{mol TE/mL}$), ainda sim é interessante para demais aplicações (REZZADORI e BENEDETTI, 2009).

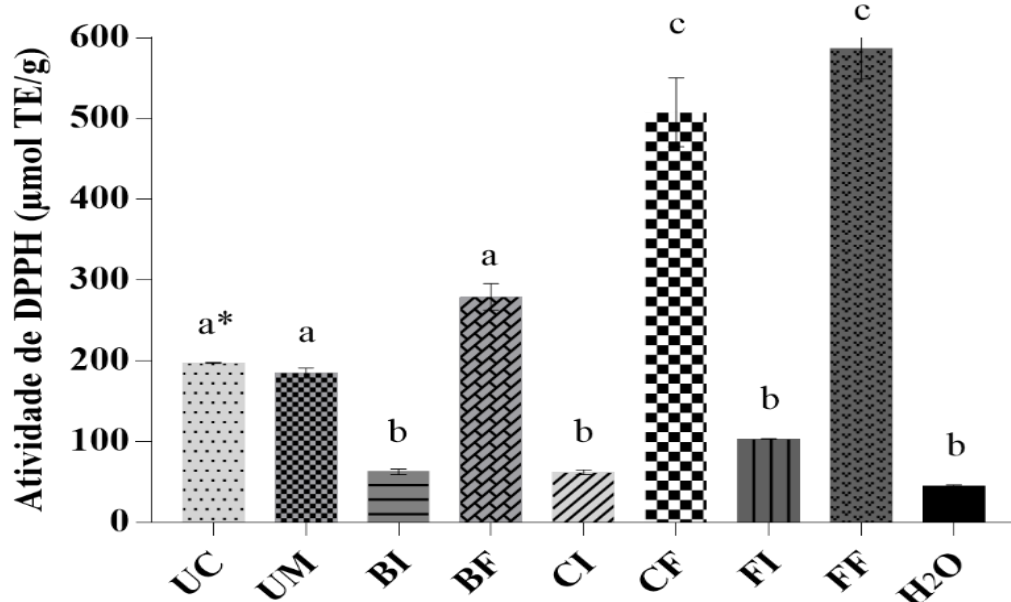


Figura 3. Atividades antioxidantes dos extratos dos resíduos de laranja e uva, isolados e fermentados. Sendo B – Bagaço de laranja, C - Casca de laranja, F – Frit de laranja, H₂O – Água residual de lavagem dos resíduos de laranja, I – Isolado, F – Fermentado, UC - Resíduos de uva da variedade Cabernet Franc e UM - Resíduos mistos de uvas Isabel + Bordô. Os resultados são representados em *Médias $\pm$ DP da média, e letras iguais inferem que não há diferenças significativas ($p>0,05$).

Fernandes et al. (2020) relataram resultados de 40,4 $\mu\text{mol TE/mg}$ em bagaço de laranja seco sem pectina, e 125,5 $\mu\text{mol TE/mg}$ em bagaço de laranja seco com pectina, os quais foram extraídos com solução 50% etanol (v/v) e analisados por DPPH, demonstrando que os resíduos de laranja isolados (BI, CI e FI) comparados aos resíduos sem pectina, foram maiores 1,5 vezes para o bagaço e casca, e 2,5 para o frit, todavia, quando comparados aos resíduos com pectina 2,0 vezes menor para o bagaço e casca, e 1,2 vezes para frit.

Cascas isoladas extraídas em etanol 99,8% foram mais eficientes quanto à atividade antioxidante (62,4 $\mu\text{mol TE/mg}$) do que as cascas cítricas de diferentes variedades

típicas da Indonésia (*C. aurantifolia* – jeruk mentui, jeruk nipis, e kruet mameh; *C. hystrix* - jeruk purut e kaffir lime) que variaram de 18,8 a 42,7 μmol de $\alpha\text{-TE}/100\text{ g}$. Porém, o método de extração (com éter de petróleo e hexano) e quantificação (ABTS) utilizados pelos autores foram diferentes do presente estudo (ERNAWITA et al., 2017). Outros solventes também são discutindo para aumentar as porcentagens de antioxidantes em cascas cítricas, como em estudos de Arora e Kaur (2013) que utilizaram extrações por acetona, metanol, hexano e água, e atingiram níveis de 90% de atividade por DPPH. Já Ghosh et al. (2019) avaliaram água 100%, etanol 100% e metanol 80%, alcançando valores respectivos de 23,3, 17,4, 28,9 $\mu\text{mol Fe (II)}/\text{mg}$ em cascas de laranja pelo método FRAP. Percebe-se, portanto, que os métodos de extração dos compostos antioxidantes, associados à presença de flavonoides em citros, é de grande importância para se obter altos níveis de antioxidantes (BANERJEE et al., 2017). Além disso, o DPPH é uma técnica muito difundida para aferir a capacidade de doação de hidrogênio pelo extrato, porém observa-se algumas ressalvas frente aos compostos hidrofílicos (GIL et al., 2000).

As porcentagens de atividades antioxidantes dos extratos isolados de laranjas foram calculadas segundo Eq. 1 (item 1.3.4.), apresentaram valores de BI-23,3%, CI-23,2% e FI-42,8%, no qual os valores do frit isolado se assemelham aos resultados obtidos em estudos de cascas *C. sinensis* L. Osbeck var. Navel com extração por metanol, éter de petróleo e solução alcalina, em resumo, 48,5, 41,6 e 35,1% (AL-ASHAAL e EL-SHELTAWY, 2011).

Os extratos de laranja, bagaço, casca e frit quando fermentados apresentaram maiores valores de antioxidantes 77, 87 e 44%, respectivamente. Esse perfil também foi relatado por Pardo (2016) com extratos etanólicos de bagaço de laranja sem fermentação - DPPH 28 $\mu\text{mol TE}/\text{mgE}$ e ORAC 370 $\mu\text{mol TE}/\text{Ge}$ – e após fermentação com *P. variotii* - DPPH 70 $\mu\text{mol TE}/\text{mgE}$ e ORAC 520 $\mu\text{mol TE}/\text{Ge}$. Bier et al. (2019) corroboram com as mesmas percepções quanto a resíduos (casca+bagaço) de laranja isolados e fermentados por *Diaporthe* sp. testados por DPPH, ORAC e CUPRAC, exibindo acréscimos de 41,5; 78,2; e 68,7%, nessa ordem.

Chamorro et al. (2012) abordaram o mecanismo da biotransformação dos resíduos realizados pela FES, potencializando o caráter antioxidante pela atuação fúngica, o que acontece devido às hidrólises de polifenóis nas ligações ésteres, acarretando a exposição dos grupos hidroxilas presentes nos anéis fenólicos.

Os extratos de uva apresentaram porcentagens semelhantes de atividade antioxidantes (UC-87,8% e UM-80,7%) aos valores encontrados em diferentes resíduos de uvas

(Grenache, Thompson, Red Romy e Carmesin) extraídas em etanol 80% relatado por Gengaihi et al. (2014), respectivamente, 91,4; 89; 81,9; e 74,3% de redução de DPPH.

Alguns trabalhos avaliam a capacidade antioxidante de resíduos frente à tratamentos enzimáticos, como Chamorro et al. (2012) que analisaram a atividade antioxidante ($\mu\text{mol TE/g}$) em bagaços de uvas (caules, cascas e sementes), sem passar por tratamento enzimático (16,5) e após o uso de enzimas comerciais em duas concentrações: celulase (17,4-17,5), pectinase (17,8-18,5) e tanase (18,2-19,8), obtendo resultados menores aos comparados neste trabalho para resíduos de uva (UC - 197,6 e UM - 182,8 $\mu\text{mol TE/g}$). Entretanto, resultados contrários foram apontados por Martins et al. (2016) em bagaço de uvas vermelhas e brancas provenientes de vinícolas (Syrah+Seibel e Moscato) com ação de enzimas celulolíticas apresentando altos índices de redução de DPPH variando entre 400 e 1200 $\mu\text{mol TE/g}$ massa seca.

Em sementes de uvas foram observados valores similares aos resultados documentados neste trabalho através do uso de água 100% para quantificação de antioxidantes por DPPH (198,6 $\mu\text{mol TE/g}$), porém os resíduos extraídos com 100% de etanol indicaram valores maiores de 2,5 e 2,7 vezes em relação à UC e UM. Além disso, outros solventes utilizados como metanol, acetona e clorofórmio apresentaram maiores rendimentos nas atividades antioxidantes, alcançando 702,3 $\mu\text{mol TE/g}$ com 70% metanol e 30% água (HASSAN et al., 2019).

A compilação de dados realizada em 30 variedades de resíduos de uvas (casca e semente) localizadas na China e EUA permitiu vislumbrar a magnitude de distinção do perfil antioxidante, visto que a variação utilizando FRAP foi de 18,3 a 252,9 $\mu\text{mol Fe(II)/g}$ peso fresco (TANG et al., 2018), concluindo que os índices podem variar por causa da variedade, métodos de extração, concentração e tipos de solventes utilizados.

1.4.2. Atividade antimicrobiana dos extratos de laranja e uva

Halos de inibição antimicrobiana foram constatados em alguns dos extratos nas diferentes cepas microbianas (Fig. 4, 5 e 6). De acordo com a Tabela 2, os diferentes extratos dos resíduos de laranja e uva, isolados e fermentados inibiram o crescimento de bactérias ao longo dos cinco dias avaliados. Todavia, observa-se que o bagaço de laranja isolado (BI) em 24 e 120h, e o frit de laranja isolado (FI) em 120h não apresentaram ação contra *E. coli*. Em relação à *S. aureus*, os extratos de uva Cabernet Franc (UC) em 24 e 120h, BI em 120h e a casca de laranja isolada (CI) em 120h não obtiveram êxito em inibir o crescimento da cepa. Já para *L. monocytogenes*, BI não conseguiu inibir a bactéria após

120h. Os extratos de UC, CI, FI e FF (frit de laranja fermentado) também foram ineficientes contra *S. enteritidis* no período de 24h e, transcorrido os cinco dias, somado a esses extratos, os resíduos de uva mista (UM) também não foi capaz de barrar o metabolismo bacteriano (Tab. 2).

Os extratos dos resíduos de laranja e uva isolados e fermentados não foram eficazes em prevenir o crescimento de *C. albicans*, o que também não foram observados em outros trabalhos com resíduos de laranjas (PEREIRA, 2017; SOUSA, 2013).

Cascas cítricas foram solubilizadas em metanol, hexano e acetona e apresentaram ação contra *E. coli* (MTCC 118), *Pseudomonas fluorescens* (MTCC 103) e *S. aureus* (MTCC 1349), de acordo com o método de difusão em poço (ARORA e KAUR, 2013). Resíduos de casca e polpa de laranja (*Citrus aurantifolia* e *Citrus hystrix*) também exerceram inibição de *S. aureus* (ATCC 6538) e *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 4352), em nefelômetro a laser de microplacas, com destaque para ação da polpa que apresentou a mais rápida ação. (ERNAWITA et al., 2017).

Saleem e Saeed (2020) utilizaram cascas de laranja processada de forma doméstica e extraídas em metanol, acetato de etila e água a partir de concentrações de 0,1 g/mL, para inibir o crescimento de gram (-) (*E. coli*, *K. pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, *P. aeruginosa*, *Salmonella typhimurium* e *Serratia marcescens*), gram (+) (*A. hydrophila*, *E. faecalis*, *L. casei*, *L. monocytogenes*, *S. aureus* e *S. pyogenes*), fungos e leveduras (*A. niger*, *C. albicans*, *P. citrinum* e *S. cerevisiae*). Em geral, as bactérias gram (-) foram mais sensíveis aos tratamentos do que as gram (+). Os extratos também não demonstraram atividades inibitórias para *P. citrinum* e *S. cerevisiae* e efeito modesto contra *A. niger* e *C. albicans*.

Resíduos de laranja e uva (C. Sauvignon) foram complexados em nanopartículas de prata e avaliados frente à inibição do desenvolvimento de *E. coli* (ATCC 25922) e *L. monocytogenes* (ATCC 35152). Os resultados das nanopartículas em diferentes concentrações foram maiores do que os extratos aquosos de laranja+uva (SOTO et al., 2019), porém, tais extratos corroboram com achados neste trabalho em ambas bactérias, que apresentaram melhores resultados inibitórios utilizando extratos de UM (6,5 mm-24h; 6,0 mm 120h) para *E. coli* e BF, bagaço de laranja fermentado, (5,0 mm-24h; 4,0 mm-120h) para *L. Monocytogenes* (Fig. 5A₈ e 6C₂).

Resíduos secos de uvas brancas e vermelhas foram reportados com propriedades antimicrobianas por Vodnar et al (2017) em: *B. cereus* (ATCC 11778), *E. coli* (ATCC 25922), *E. faecalis* (ATCC 29212), *F. nucleatum* (ATCC 25586), *L. monocytogenes*

(ATCC 19114), *P. aeruginosa* (ATCC 27853), *P. anaerobius* (ATCC 27337), *S. aureus* (ATCC 49444), *S. typhimurium* (ATCC 14028), *A. flavus* (ATCC 9643), *A. niger* (ATCC 6275), *C. albicans* (ATCC 10231), *C. parapsilosis* (ATCC 22019), e *P. funiculosus* (ATCC 56755). Os ensaios foram realizados por MIC (*Minimum Inhibitory Concentration*) e MFC (*Minimum Fungicidal Concentration*). As cepas gram (+) foram mais sensíveis aos extratos, principalmente *S. aureus*, o que não é observado neste trabalho, nas quais os extratos apresentaram melhor desenvoltura combatendo *E. coli* e *L. monocytogenes*, do que *S. aureus* e *S. enteritidis*.

A. flavus foi inibido por resíduos de uvas vermelhas com tratamento térmico (10 min a 80 °C). As diferenças entre as porcentagens de inibição podem ser correlacionadas aos métodos de extração, diferenças nas variedades de uvas, e conteúdo polifenólico, uma vez que, houve acréscimos significativos quanto à atividade antimicrobiana simultâneos aos níveis de antocianinas das amostras investigadas (VODNAR et al., 2017).



Figura 4. Avaliação da formação de halos inibitórios em 72h a partir de análises de difusão em discos com extratos dos resíduos de laranja e uva, isolados e fermentados. (E) Linhagens de *A. fumigatus* IOC 0081. Imagens do verso de cada placas numeradas de 1 a 8, sendo que os extratos de resíduos foram ordenados em (1-2) Bagaço de laranja isolado e fermentado, (3-4) Casca de laranja isolada e fermentada, (5-6) Frit de laranja isolado e fermentado, (7) UC - Resíduos de uva da variedade Cabernet Franc e (8) UM - Resíduos mistos de uvas Isabel + Bordô.

Tabela 2. Atividades antimicrobianas dos extratos dos resíduos de laranja e uva, isolados e fermentados. Sendo B – Bagaço de laranja, C - Casca de laranja, F – Frit de laranja, I – Isolado, F – Fermentado, UC - Resíduos de uva de Cabernet Franc e UM - Resíduos mistos de uvas Isabel + Bordô. As atividades antibacterianas foram analisadas em 24 e 120h, já as fúngicas foram analisadas em 72h. A presença dos halos de inibição nas triplicatas foi subtraída dos seus respectivos controles negativos e foi expressa em mm.

<i>Atividade Antimicrobiana</i>									
Resíduos	<i>E. coli</i>		<i>S. aureus</i>		<i>L. monocytogenes</i>		<i>S. enteritidis</i>		<i>A. fumigatus</i>
	24h	120h	24h	120h	24h	120h	24h	120h	72h
UC	1,6±1,4 ^{a*}	0,3±1,2 ^{ab*}	0,0 ^{a*}	0,0 ^{a*}	1,6±0,3 ^{a*}	1,0±0,5 ^a	0,0 ^{a*}	0,0 ^{a*}	5,3±0,6 ^{a*}
UM	6,5±2,1 ^a	6,0±0,5 ^a	2,2±0,7 ^a	2,3±1,2 ^a	0,6±0,3 ^a	1,0±0,5 ^a	0,6±0,8 ^{ab}	0,0 ^{ab}	0,6±0,6 ^a
BI	0,0 ^a	0,0 ^b	0,6±0,4 ^a	0,0 ^a	1,6±0,3 ^a	0,0 ^a	2,0±0,5 ^b	0,6±0,3 ^{ab}	1,0±0,5 ^a
BF	0,1±2,0 ^a	0,0 ^{ab}	2,3±0,6 ^a	0,6±0,8 ^a	5,0±1,5 ^a	4,0±1,7 ^a	0,3±0,8 ^{ab}	1,3±0,3 ^b	5,3±0,6 ^a
CI	4,0±1,0 ^a	2,3±0,8 ^{ab}	0,0 ^a	0,0 ^a	0,3±0,3 ^a	0,3±0,3 ^a	0,0 ^{ab}	0,0 ^{ab}	2,3±0,6 ^a
CF	2,0±0,5 ^a	0,6±0,3 ^{ab}	2,0±0,4 ^a	0,6±0,8 ^a	1,0±0,5 ^a	0,3±0,8 ^a	0,6±0,3 ^{ab}	0,3±0,3 ^{ab}	2,3±0,3 ^a
FI	1,3±0,3 ^a	0,0 ^{ab}	1,0±1,0 ^a	0,3±1,7 ^a	1,3±0,8 ^a	1,3±0,8 ^a	0,0 ^{ab}	0,0 ^{ab}	0,6±0,3 ^a
FF	2,0±1,0 ^a	2,0±1,1 ^{ab}	2,0±0,4 ^a	1,3±0,3 ^a	0,3±0,6 ^a	0,6±0,3 ^a	0,0 ^{ab}	0,0 ^{ab}	0,6±0,3 ^a

*Médias ± DP da média, e letras iguais inferem que não há diferenças significativas (p>0,05).

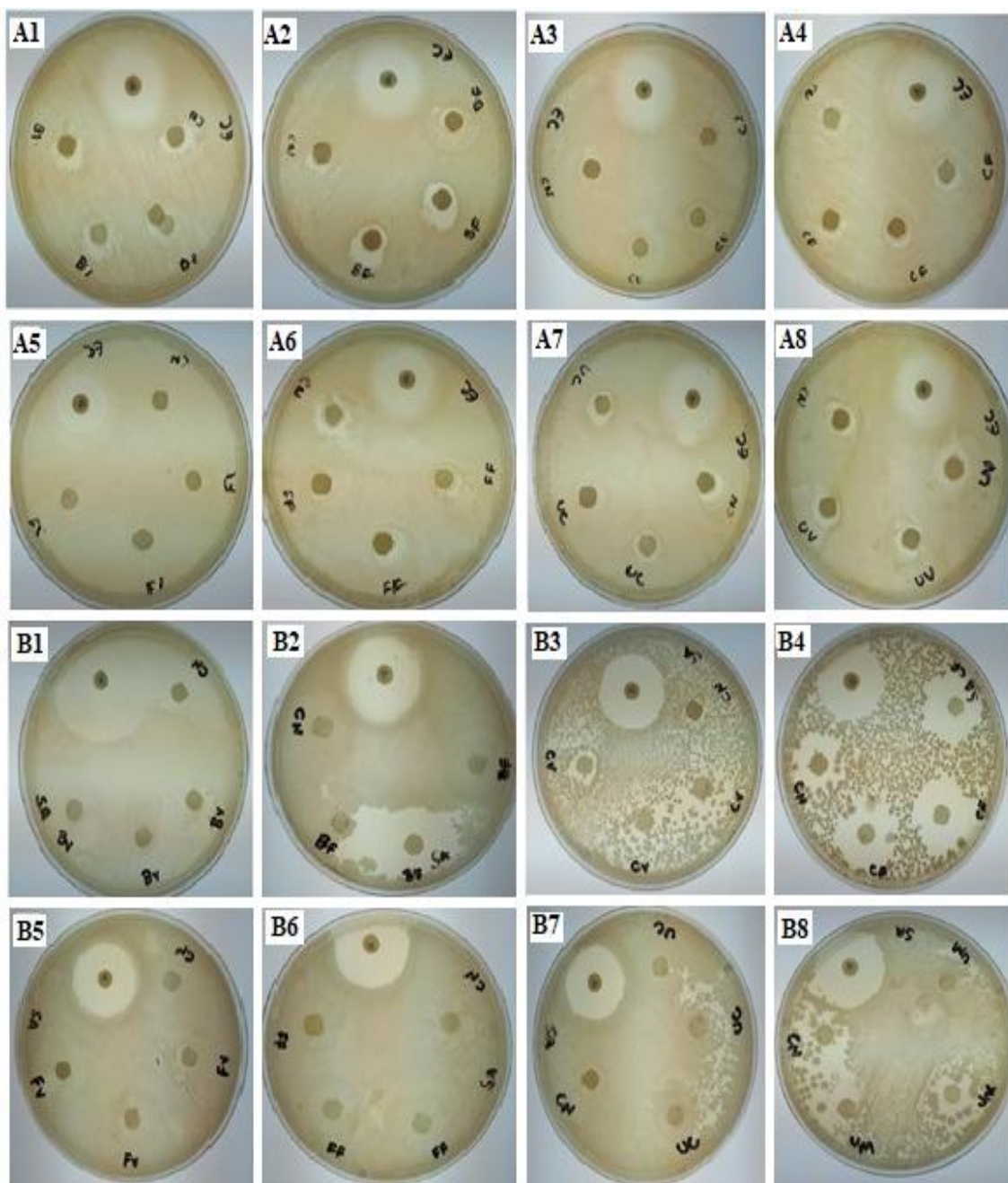


Figura 5. Avaliação da formação de halos inibitórios em 24h a partir de análises de difusão em discos com extratos dos resíduos de laranja e uva, isolados e fermentados. (A) Linhagens de *E. coli* ATCC 8739, (B) Linhagens de *S. aureus* ATCC 1901. (1-8) Extratos de resíduos ordenados em (1-2) Bagaço de laranja isolado e fermentado, (3-4) Casca de laranja isolada e fermentada, (5-6) Frit de laranja isolado e fermentado, (7) UC - Resíduos de uva da variedade Cabernet Franc e (8) UM - Resíduos mistos de uvas Isabel + Bordô.

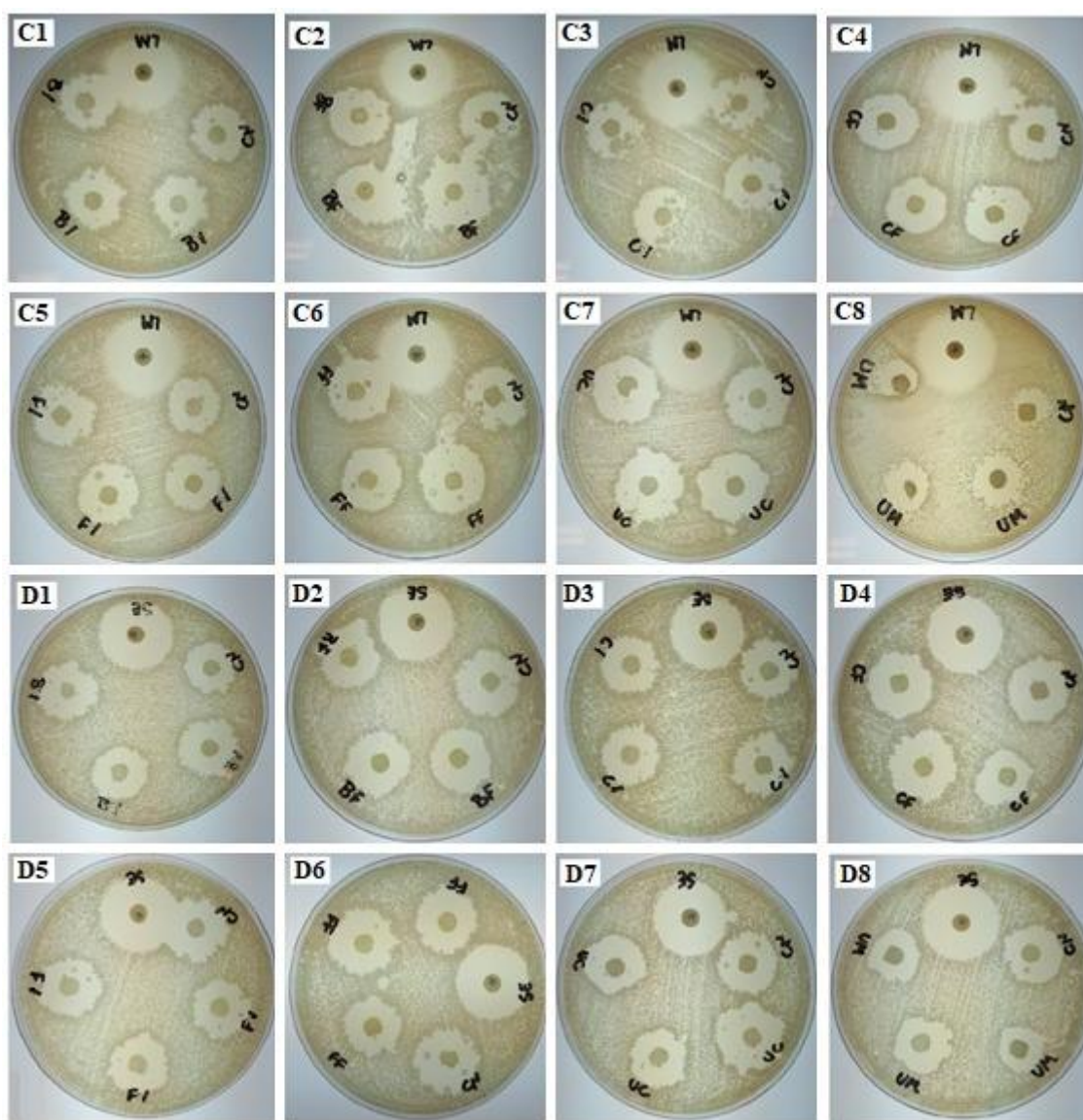


Figura 6. Avaliação da formação de halos inibitórios em 24h a partir de análises de difusão em discos com extratos dos resíduos de laranja e uva, isolados e fermentados. (C) Linhagens de *L. monocytogenes* (ATCC 7644), (D) *S. enteritidis* (ATCC 13076). (1-8) Extratos de resíduos ordenados em (1-2) Bagaço de laranja isolado e fermentado, (3-4) Casca de laranja isolada e fermentada, (5-6) Frit de laranja isolado e fermentado, (7) UC - Resíduos de uva da variedade Cabernet Franc e (8) UM - Resíduos mistos de uvas Isabel + Bordô.

1.4.3. Atividade antidiabética dos resíduos de laranja e uva

Os valores de IC demonstraram que todos os resíduos de laranja e uva, isolados e fermentados, foram hábeis em inibir 50% da atividade de α -amilase presente no meio reacional, exceto o bagaço fermentado que atingiu 7,4% de inibição. Os menores resultados foram verificados no FF e CI, sendo estatisticamente iguais a UM. Os demais extratos isolados de laranja e uva (UC, UM, BI e FI) obtiveram porcentagens estatísticas iguais à casca fermentada (Fig. 7).

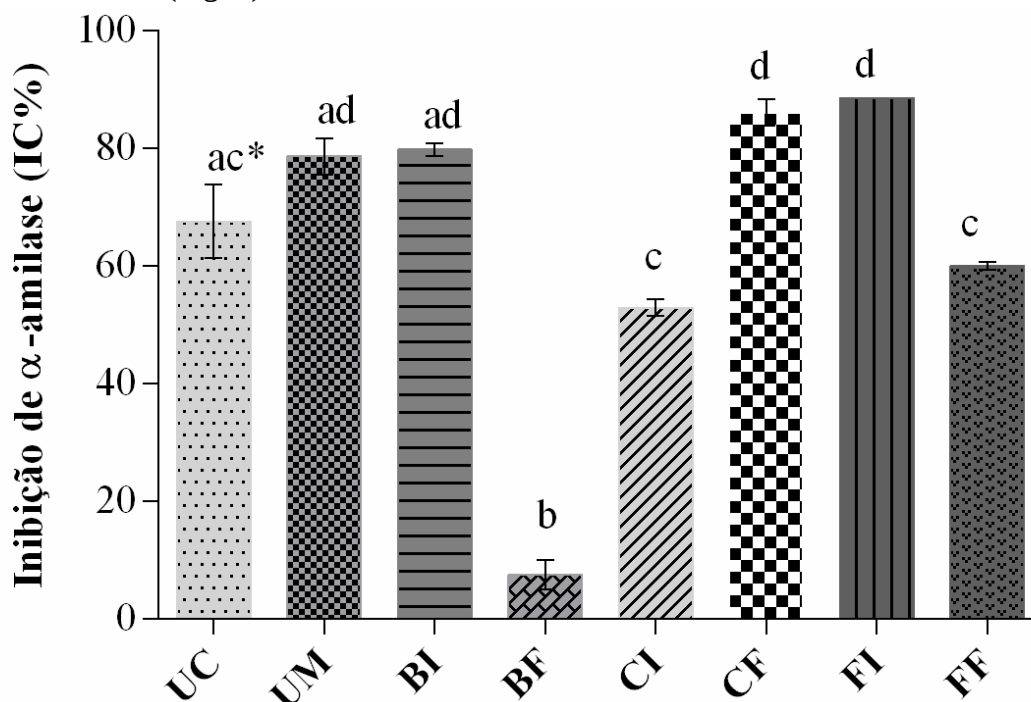


Figura 7. Atividades de inibição de α -amilase dos resíduos de laranja e uva, isolados e fermentados. Sendo B – Bagaço de laranja, C - Casca de laranja, F – Frit de laranja, I – Isolado, F – Fermentado, UC - Resíduos de uva da variedade Cabernet Franc e UM - Resíduos mistos de uvas Isabel + Bordô. Os resultados são representados em *Médias $\pm$ DP da média, e letras iguais inferem que não há diferenças significativas ($p>0,05$).

Os resultados demonstrados sobre a capacidade de inibição de α -amilase em resíduos de laranja foram superiores aos trabalhos realizados com cascas brutas, com e sem pectina, solubilizadas em 50% etanol que apresentam atividade menor do que 50% (FERNANDES et al., 2020). Por outro lado, cascas e polpas extraídos a 50% metanol conseguiram obter porcentagens similares a CI (52,84) e FF (60,0%), apresentando valores de 56,2, 54,6 e 55,2% de IC para polpa e casca da variedade Calung, e casca de Kruet Mameh, respectivamente (ERNAWITA et al., 2017).

As taxas de inibição documentadas neste trabalho foram mais promissoras também sobre bagaços (*C. sinensis* var Liwcheng) brutos e extrusados modificados por fermentação anaeróbica, os quais reportaram atividades entre 20 e 40% (HUANG et al., 2019). Além disso, três doses diárias de 500, 250 e 125 mg de cascas cítricas (*C. sinensis*)

extraídas em etanol foram ministradas (por kg do peso do animal) em ratos induzidos a diabetes analisados por Muhtadi et al. (2015), observando taxas de inibição de diabetes de 39,4; 46,1 e 61,3%.

As atividades antidiabéticas de resíduos de vinificação (folhas de videira) foram investigadas por Hayta e Işçimen (2018) e extraídos por três diferentes métodos (ultrassom, solvente e micro-ondas) obtendo como resultados (%) 65,7-66,5; 77,8-83; e 64,4-70,4, nessa ordem em soluções de metanol e água. Porcentagens de inibição enzimática também foi reportada por Hogan et al. (2010) a partir de bagaços de Cabernet Franc e Chardonnay extraído em etanol 80%. O estudo comparou o potencial antidiabético dos resíduos de uva *in vitro*, atingindo 63,9% para resíduos de vinho Franc e 42,4% para Chardonnay e *in vivo*, esses valores foram de 47 e 39%, respectivamente.

Kong et al. (2019) observaram a diminuição da atividade α -amilase após encapsulamento de sementes de uva de Cabernet Sauvignon complexadas a um sistema com éter sulfobutílico- β -ciclodextrina, o qual apresentou valores de IC 0,5 mg/mL maiores do que o controle positivo testado, atingindo entre 80 e 90% de inibição, resultados similares aos discutidos neste trabalho.

As variações observadas na inibição de α -amilase foram correlacionadas com as concentrações de antocianinas, polifenóis e taninos, segundo Ernawita et al. (2017). Além disso, os mecanismos de atuação do resíduo adotado podem estar relacionados à inibição por competição enzimática, conformação estrutural e sítio ativo específico (TUNDIS et al., 2010).

1.4.4. Atividade de citotoxicidade celular por MTT

De acordo com o apresentado na Figura 8, a viabilidade da linhagem de Células Endoteliais de Veias do cordão Umbilical Humano (HUVEC) foi avaliada nos extratos dos resíduos (item 1.3.3) em três concentrações diferentes (5, 10 e 15%), porém observamos que apenas os extratos de casca de laranja na sua forma isolada e fermentada, CI e CF (Fig. 8 E e F), na menor concentração testada, obtiveram valores estatisticamente melhores (62,5 e 74,5%) que o veículo correspondente (álcool) no mesmo volume analisado (28,3 e 24,7%). Esses dados sugerem que mesmo havendo um resultado de viabilidade inferior ao controle experimental (apenas meio de cultivo), esse aumento em relação ao controle positivo, indica um mecanismo protetor que poderá ser estudado posteriormente em células hepáticas.

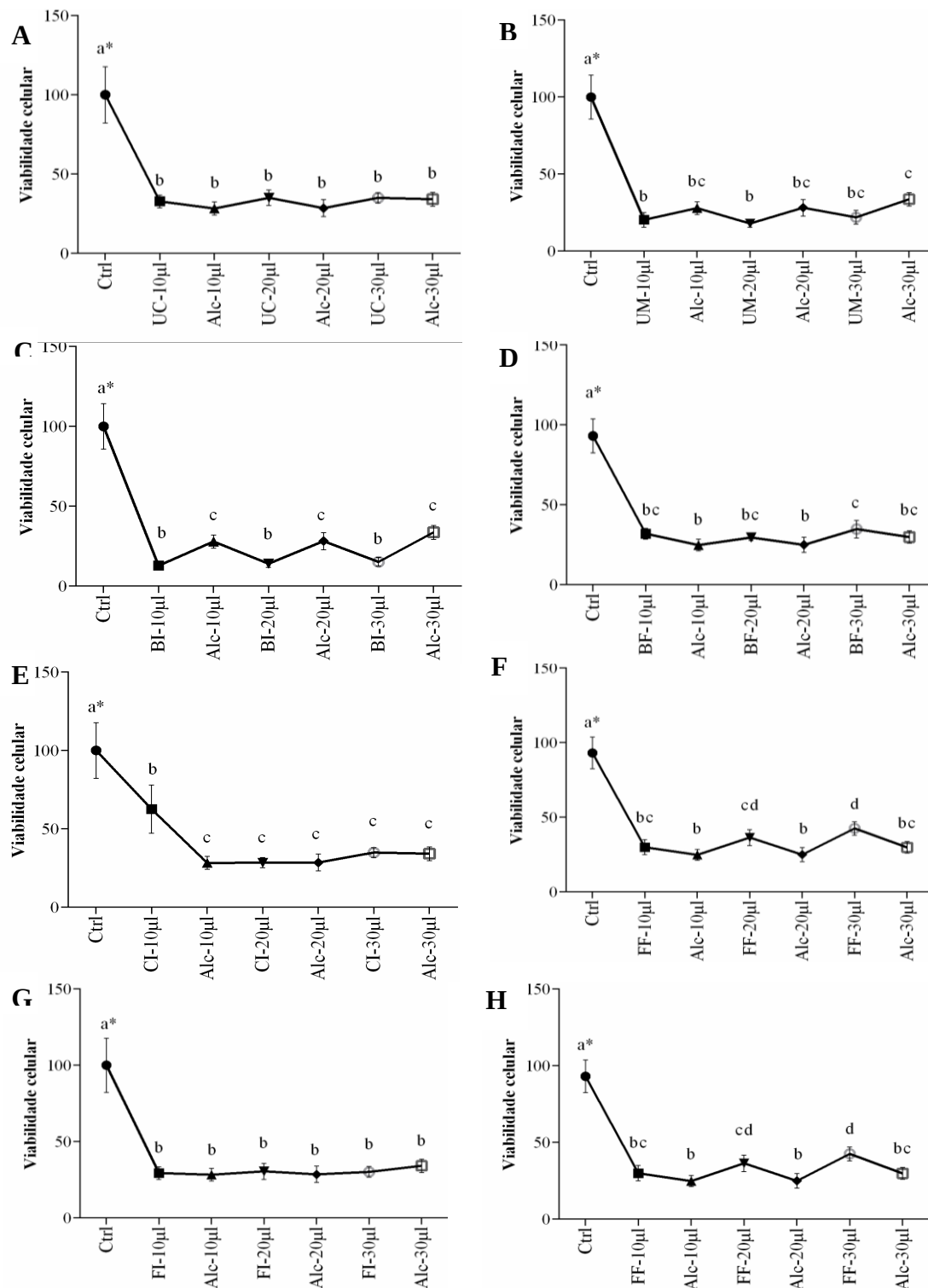


Figura 8: Extratos de laranja e uva afetam viabilidade de células endoteliais de veias do cordão umbilical humano (HUVEC). Após o período de tratamento, com os diferentes extratos, as células foram avaliadas quanto a citotoxicidade por incorporação de sal MTT e a citotoxicidade foi comparada à porcentagem do controle. B – Bagaço de laranja, C - Casca de laranja, F – Frit de laranja, I – Isolado, F – Fermentado, UC - Resíduos de uva da variedade Cabernet Franc e UM - Resíduos mistos de uvas Isabel + Bordô. Os resultados são representados em *Médias $\pm$ DP da média, e letras iguais inferem que não há diferenças significativas ($p > 0,05$).

A atividade mitocondrial revelada por ensaio de MTT aponta que os demais compostos modularam negativamente a viabilidade das células, os quais apresentam valores entre 14 e 42,5%, o que pode ter ocorrido pela solução extratora utilizada. Pesquisas com bagaço de uva da variedade Cagnulari proveniente de vinícolas (POSADINO et al., 2018) avaliaram técnicas de extração para obtenção de antioxidantes e avaliação da viabilidade de células endoteliais humanas primárias (HUVEC), propondo metodologia de extração sólido-líquido que diminuísse o consumo de solventes, sendo assim, testaram os extratos nas concentrações 0,1, 1 e 10 µg/mL observando efeitos positivos na atividade mitocondrial.

Um outro importante estudo, liderado por Posadino (POSADINO et al., 2015) mostra que polifenóis naturais, como o resveratrol, presente em altas concentrações na uva, podem propiciar despolarização da membrana plasmática de células endoteliais devido ao seu poder oxidativo que atua de forma intracelular quando em doses aumentadas, podendo levar à morte celular. Como também foi observado neste trabalho para os resíduos de uva que reduziram a atividade mitocondrial entre 17,9% e 33,7%. Toaldo (2016) observou que em co-culturas de células intestinais (Caco-2) e linhagem de células da veia umbilical humana (EA.hy926) tratadas com trans-resveratrol, os níveis do Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF), espécies reativas de oxigênio (ERO), Interleucina 8 (IL-8) foram reduzidos a partir de mecanismo dose-dependente.

Nosso grupo tem demonstrado os efeitos de toxicidade avaliados em queratinócitos humanos (HaCaT), Fibroblastos de camundongo (NHI-3t3) e carcinoma epidermóide bucal (SCC9) a partir de resíduos de laranja, especificamente da casca, da cultivar Hamlin com extração aquosa atestaram ações positivas ao inibir o crescimento de SCC9 em altos níveis (10 e 20%), mantendo-se para o resíduo frit nas frações de Hamlin, Valência e Natal (PEREIRA, 2017). Além disso, a viabilidade das células NHI-3t3 foi reduzida quando testada o desempenho da casca Hamlin, Valência e Natal, o que também foi notado para a HaCaT com o tratamento de casca da estirpe Pera. Athanázio-Heliodoro et al. (2018) avaliando as mesmas linhagens frente a hidrolisados de óleos (milho e girassol) por resíduos de laranja fermentado apresentaram resultados interessantes a medida que estimularam o crescimento da HaCaT e NHI-3t3, e em sistema de hidrolisado de óleo de milho por frit fermentado em *Penicillium* sp. 02 houve impactos negativos para as células NHI-3t3 e SCC9 na concentração de 20%. Em hidrolisados de óleos de girassol por frit fermentado em *A. niger* CBMAI 2084 observou-se menores índices de proliferação celular em SCC9 e NHI-3t3.

1.4.5. Atividades anti-inflamatórias dos extratos de laranja e uva

A Fig. 9 traz os resultados observados a partir dos ensaios de expressão gênica. As análises da bioatividade dos extratos sobre a ação anti-inflamatória foram realizadas apenas com as amostras de casca de laranja isolada e fermentada por apresentarem maior viabilidade quando comparado aos outros tratamentos, exceto controle, no ensaio de MTT (Fig. 8). O VEGF, proteína sinalizadora que promove a angiogênese, Fig. 9 A, foi estudada como um dos fatores envolvidos em patogenicidades do diabetes, como a retinopatia diabética, desordem vascular que pode causar cegueira, apresentando receptores com alta seletividade (VALIATTI et al., 2011). No gráfico, o tratamento com a casca de laranja isolada (CI) foi 49,5 vezes maior do que a casca fermentada (CF), associando-se, portanto, à ação anti-inflamatória devido à maior expressão do gene que está correlacionado à degeneração de moléculas da matriz e regulação da angiogênese. Toaldo (2016) exibiu nos resultados, redução de VEGF quando as células em co-culturas EA.hy926 (células intestinais, Caco-2, e linhagem de células da veia umbilical humana, HUVEC) foram tratadas com trans-resveratrol.

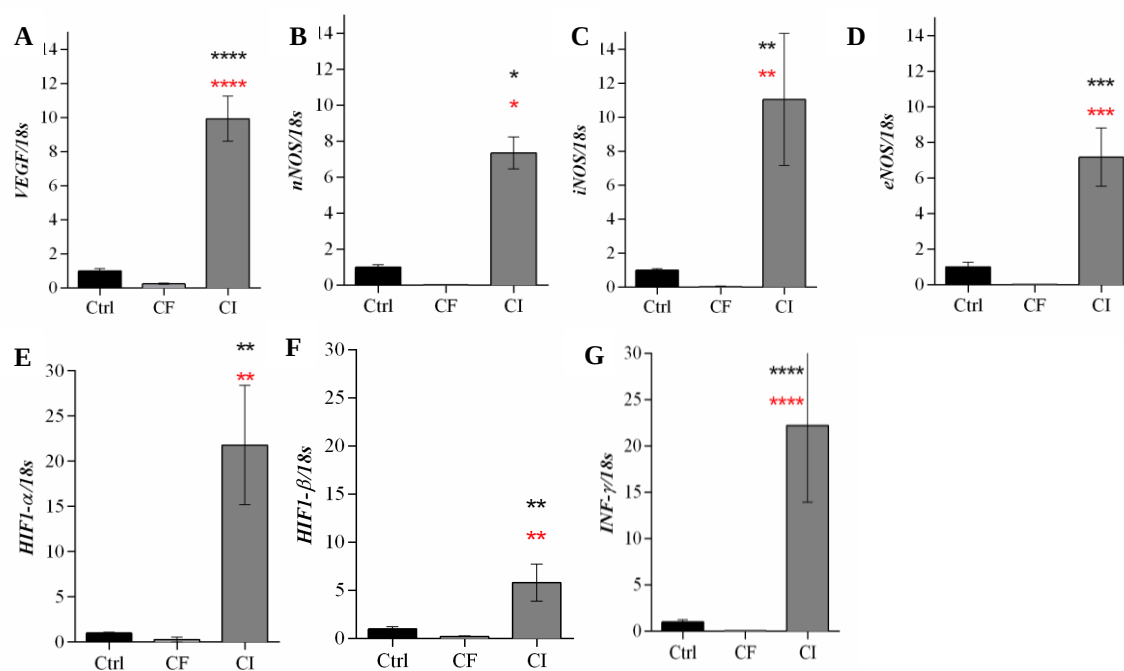


Figura 9: Efeitos de extratos de laranja em marcadores de angiogênese. As células tratadas com os diferentes extratos, foram coletadas em TriZOL para extração de RNA. A expressão relativa (mRNA) foi normalizada pelo controle. O cDNA sintetizado foi utilizado para investigar a expressão gênica: A) VEGF, B) *nNOS*, C) *iNOS*, D) *eNOS*, E) *HIF1-α*, F) *HIF1-β* e G) *INF-γ*. Os valores foram normalizados por valores de expressão do 18s e os gráficos representam n = 3. *p<0.05; **p<0.0063; ***p<0.0002; ****p<0.0001: Diferença estatística quando comparado ao grupo controle. *p<0.05; **p<0.0063; ***p<0.0002; ****p<0.0001: Diferença estatística quando comparado ao grupo CF.

A expressão das enzimas representadas na Fig. 9 B-D são isoformas endoteliais e neuronais da óxido nítrico sintase (NOS) que produz, por oxidorredução, óxido nítrico (NO) em resposta a agentes infecciosos ativado pelas vias de sinalização das MAP-Kinasas, por exemplo. NO é um neurotransmissor importante que age rapidamente sem a necessidade de receptores de intramembranas, porém pode ser produzido por longo período induzido por *iNOS* (isoforma II), o que pode ser tóxico para células saudáveis (HEGAZY et al., 2015). Dessa forma, ao avaliar os efeitos dos extratos de CF sob as isoformas da NOS (Fig. 9 B-D) na concentração 5% seguindo o teste de MTT, observou-se uma diminuição de 70, 96,2 e 95,6% da expressão gênica em relação ao controle para *nNOS*, *iNOS* e *eNOS* respectivamente, o que corrobora com os dados observados na Fig. 3, em que os extratos de CF (508 $\mu\text{mol TE/g}$) apresentaram um dos mais altos níveis de atividade antioxidante, implicando em compostos bioativos capazes de neutralizar radicais livres, podendo desse modo, inibir a expressão das NOS, se caracterizando como benéfico no tratamento de doenças inflamatórias (HÄMÄLÄINEN et al., 2008; AKTAN et al., 2003). Esses dados também foram constatados por Livisaca (2013) em que a redução da expressão gênica de *iNOS* foi de 46,47% ao controle positivo pelo tratamento com Nopal (espécie de cacto) e 65,77% quando combinados Pera e Nopal analisados em HUVEC. Por outro lado, os resultados para CI na modulação de expressão das espécies de NOS, aumentaram consideravelmente em relação ao controle, aproximadamente 7,3, 11 e 7,1 vezes para *nNOS*, *iNOS* e *eNOS*, apresentando atividade antioxidante até 87% menor do que CF. Toaldo (2016) apresentou resultados em diferentes concentrações de trans-resveratrol, advindos de sucos e sementes de uva em co-cultura de (EA.hy926) e adenocarcinoma de pulmão (A549), e observou que em concentrações mais altas de trans-resveratrol (20 μM), nas células submetidas a condições de inflamação por $\text{TNF-}\alpha$ e não-inflamação, a produção de NO foi maior do que em 5 μM . Neste trabalho, as concentrações dos ensaios se mantiveram em 5%, porém a atividade antioxidante sugere maior potencial de ação em CF do que CI.

Cascas de laranja de outra espécie (*Citrus reticulata*) também foram reportadas como promotoras de agentes anti-inflamatórios devido à presença de flavonas polimetoxiladas (PMFs), potentes inibidores de $\text{TNF-}\alpha$, classe de citocinas assim como os interferons (INF) produzidos em resposta à invasão de patógenos ou estímulos inflamatórios (Fig. 9 G) (CHEN et al., 2017). Outros polifenóis como hesperidina, nobiletina e tangeretina encontradas também em *Citrus* podem aumentar significativamente a expressão

das propriedades anti-inflamatórias (HO e KUO, 2014; LONDOÑO-LONDOÑO et al., 2010).

Murakami et al. (2000) demonstram esses efeitos analisando 30 frutas cítricas e medindo a taxa de inibição de NO e superóxido, ressaltando redução da expressão gênica e atribuindo às PMF's seus efeitos anti-inflamatórios. Dessa forma, verifica-se que os extratos de casca de laranja apresentam compostos capazes de regular as expressões de determinados genes correlacionado com a angiogênese e, portanto, exibir ação anti-inflamatória.

1.5.Conclusão

Os extratos de laranja e uva, isolados e fermentados, exibiram propriedades bioativas interessantes, atingindo os objetivos inicialmente propostos. Capacidades antioxidantes foram potencializadas através da fermentação com *A. niger* CBMAI 2084 em extratos de resíduos de laranjas. Além disso, os efeitos antimicrobianos foram expressivos frente às cepas testadas, observando que o caráter antibacteriano dos extratos foi preservado durante o período de cinco dias e não apresentou diferenças entre a ação sobre bactérias gram (+) e gram (-), no entanto, testes quantitativos e *in vivo* devem ser realizados. Os extratos demonstraram excelentes perfis antidiabéticos mensurados por inibição de α -amilase que despontaram em comparação as mesmas condições de estudos em resíduos similares, no entanto, testes adicionais e *in vivo* devem ser executados. O tratamento com os extratos dos resíduos de laranja e uva no geral diminuiu a atividade mitocondrial das células HUVEC, porém apresentou efeito positivo com os extratos das cascas de laranja isoladas e fermentadas, o que possibilitou os estudos das taxas anti-inflamatórias posteriores. Por fim, a utilização dos resíduos de laranja e uva obtidos de forma mais fidedignas à realidade industrial, isolados e fermentados, foi promissora na produção de compostos bioativos por metodologias simples, ecológicas e baratas.

1.6. Perspectivas Futuras

Este trabalho obteve êxito em produzir enzimas e compostos bioativos, quantificando a composição centesimal dos resíduos de laranja e uva e averiguando que tais resíduos apresentaram atividades biológicas relevantes, podendo agir como agentes antioxidantes, antimicrobianos, antidiabéticos e anti-inflamatórios. Posto o sucesso da obtenção de fitase, lipase e protease (Capítulo 2) a partir dos resíduos na sua forma bruta, digno de patentes, vale-se ainda analisar as alternativas de processos fermentativos utilizando o substrato dos resíduos de uva, mantendo os padrões mais próxima à realidade industrial tanto quanto possíveis para o crescimento fúngico.

Ademais, devido às aplicações perscrutadas, análises *in vitro* ainda são necessárias para validar os dados acerca das ações antidiabéticas e anti-inflamatórias. Especificamente para citotoxicidade e atividade anti-inflamatória (Capítulo 3), a extração poderá se transformar em um tópico de estudos mais aprofundado, para abranger maior gama de possibilidades de soluções-veículo e garantir maior eficácia na utilização desses resíduos para estas finalidades. Por complementação, estudos para avaliar a bioatividade dos resíduos frente a proteção contra o álcool em células hepáticas também poderia seguir caminhos interessantes na área farmacêutica.

Além disso, estudos econômicos aplicados incrementaram indubitavelmente as discussões circundantes à utilização da forma bruta dos resíduos e uma ampla investigação das possibilidades de reaproveitamento da água residual advinda do processamento do suco de laranja também poderia expandir a sustentabilidade do processo global.

Referências Bibliográficas

- AGUIEIRAS, E. C. G.; CAVALCANTI-OLIVEIRA, E. D.; FREIRE, D. M. G. Current status and new developments of biodiesel production using fungal lipases. **Fuel**, v. 159, p. 52–67, 2015.
- AKTAN, F.; HENNESS, S.; ROUFOGALIS, B. D.; AMMIT, A. J. Gypenosides derived from *Gynostemma pentaphyllum* suppress NO synthesis in murine macrophages by inhibiting iNOS enzymatic activity and attenuating NF- κ B-mediated iNOS protein expression. **Nitric oxide**, v. 8, n. 4, p. 235-242, 2003.
- AL-ASHAAL, H. A.; EL-SHELTAWY, S.T. Antioxidant capacity of hesperidin from citrus peel using electron spin resonance and cytotoxic activity against human carcinoma cell lines. **Pharmaceutical Biology**, v. 49, n. 3, p. 276-282, 2011.
- AMES, B. N.; SHIGENAGA, M. K.; HAGEN, T. M. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 90, n. 17, p. 7915-7922, 1993.
- ARORA, M.; KAUR, P. Antimicrobial & antioxidant activity of orange pulp and peel. **International Journal of Science and Research**, v. 2, p. 412-415, 2013.
- ATHANÁZIO-HELIODORO, J. C.; OKINO-DELGADO, C. H.; FERNANDES, C. J. C.; ZANUTTO, M. R.; PRADO, D. Z.; SILVA, R. A.; FACANALI, R.; ZAMBUZZI, W. F.; MARQUES, M. O. M; FLEURI, L. F. Improvement of lipase obtaining system by orange waste-based solid-state fermentation: production, characterization and application. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v. 48, n. 7, p. 565-573, 2018. <https://doi.org/10.1080/10826068.2018.1476879>.
- BANERJEE, J.; SINGH, R.; VIJAYARAGHAVAN, R.; MACFARLANE, D.; PATTI, A. F.; ARORA, A. Bioactives from fruit processing wastes: Green approaches to valuable chemicals. **Food chemistry**, v. 225, p. 10-22, 2017.
- BARBOSA, P.P. M.; RUVIARO, A. R.; MACEDO, G. A. Comparison of different Brazilian *citrus* by-products as source of natural antioxidants. **Food Science and Biotechnology**, v. 27, n. 5, p. 1301-1309, 2018.
- BECHARA, G. H.; SZABÓ, M. P. J. Processo inflamatório. **Jaboticabal, SPUNESP-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias**, 2006.
- BIER, M. C. J.; MEDEIROS, A. B. P.; DE KIMPE, N.; SOCCOL, C. R. Evaluation of antioxidant activity of the fermented product from the biotransformation of R-(+)-limonene in solid-state fermentation of orange waste by *Diaporthe* sp. **Biotechnology Research and Innovation**, v. 3, n. 1, p. 168-176, 2019.
- BRACKETT, M. G.; LEWIS, J. B.; KIOUS, A. R.; MESSER, R. L.; LOCKWOOD, P. E.; BRACKETT, W. W.; WATAHA, J. C. Cytotoxicity of endodontic sealers after one year of aging in vitro. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, v. 100, n. 7, p. 1729-1735, 2012.
- CÁDIZ-GURREA, M. D. L. L.; BORRÁS-LINARES, I.; LOZANO-SÁNCHEZ, J.; JOVEN, J.; FERNÁNDEZ-ARROYO, S.; SEGURA-CARRETERO, A. Cocoa and grape seed byproducts as a source of

antioxidant and anti-inflammatory proanthocyanidins. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 2, p. 376, 2017.

CAVALCANTE, P. A. W.; COÊLHO, D. F.; SILVA, C. F.; ABUD, A. K. S.; SOUZA, R. R. Utilização de resíduos lignocelulósicos na produção de celulases por *Aspergillus niger* em fermentação em estado sólido. **Scientia Plena**, n. 14, v. 6, 2018.

CEPEA – Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada. **PIB do agronegócio brasileiro (2020)**. Disponível em: <<https://www.cepea.esalq.usp.br/br/pib-do-agronegocio-brasileiro.aspx>> Acessado em: Janeiro de 2020.

CHAMORRO, S.; VIVEROS, A.; ALVAREZ, I.; VEGA, E.; BRENES, A. Changes in polyphenol and polysaccharide content of grape seed extract and grape pomace after enzymatic treatment. **Food Chemistry**, v. 133, n. 2, p. 308-314, 2012.

CHEN, X.-M.; TAIT, A. R.; KITTS, D. D. Flavonoid composition of orange peel and its association with antioxidant and anti-inflammatory activities. **Food Chemistry**, v. 218, p. 15-21, 2017.

CITRUSBR – Associação Nacional dos Exportadores de Sucos Cítricos. **Exportações de suco de laranja cresceram 26,6% na safra 2019/20**. Disponível em: <<http://www.citrusbr.com/noticias/?id=312803>> Acessado em: Janeiro de 2020.

CLIFTON, P. M. Effect of grape seed extract and quercetin on cardiovascular and endothelial parameters in high-risk subjects. **BioMed Research International**, v. 2004, n. 5, p. 272-278, 2004.

CONFORTI, F.; STATTI, G.; LOIZZO, M. R.; SACCHETTI, G.; POLI, F.; MENICHINI, F. In vitro antioxidant effect and inhibition of α -amylase of two varieties of *Amaranthus caudatus* seeds. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 28, n. 6, p. 1098-1102, 2005.

DENNY, C.; LAZARINI, J. G.; FRANCHIN, M.; MELO, P. S.; PEREIRA, G. E.; MASSARIOLI, A. P.; MORENO, I. A. M.; PASCOAL, J. A. R.; ALENCAR, S. M.; ROSALEN, P. L. Bioprospection of Petit Verdot grape pomace as a source of anti-inflammatory compounds. **Journal of Functional Foods**, v. 8, p. 292-300, 2014.

DINICOLA, S.; CUCINA, A.; PASQUALATO, A.; D'ANSELM, F.; PROIETTI, S.; LISI, E.; BIZZARRI, M. Antiproliferative and apoptotic effects triggered by grape seed extract (GSE) versus epigallocatechin and procyanidins on colon cancer cell lines. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, n. 1, p. 651-664, 2012.

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Frutas e hortaliças (2019)**. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/grandes-contribuicoes-para-a-agricultura-brasileira/frutas-e-hortaliças>> Acessado em: Janeiro de 2020.

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Inteligência e Mercado de Uva e Vinho**. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/cim-inteligencia-e-mercado-uva-e-vinho/a-viticultura-no-brasil>> Acessado em: Janeiro de 2020.

- ERNAWITA, R. A. W.; HESSE, J.; HIPLER, U. C.; ELSNER, P.; BÖHM, V. In vitro lipophilic antioxidant capacity, antidiabetic and antibacterial activity of citrus fruits extracts from Aceh, Indonesia. **Antioxidants**, v. 6, n. 1, 2017.
- FARQUHARSON, C.; WHITEHEAD, C. C.; RENNIE, J. S.; LOVERIDGE, N. In vivo effect of 1, 25-dihydroxycholecalciferol on the proliferation and differentiation of avian chondrocytes. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 8, n. 9, p. 1081-1088, 1993.
- FERNANDES, A. C.; SANTANA, Á. L.; MARTINS, I. M.; MOREIRA, D. K.; MACEDO, J. A.; MACEDO, G. A. Anti-glycation effect and the α -amylase, lipase, and α -glycosidase inhibition properties of a polyphenolic fraction derived from citrus wastes. **Preparative Biochemistry & Biotechnology**, p. 1-9, 2020.
- FLEURI, L. F.; OLIVEIRA, M. C.; ARCURI, M. L. C.; CAPOVILLE, B. L.; PEREIRA, M. S.; OKINO-DELGADO, C. H.; NOVELLI, P. K. Production of fungal lipases using wheat bran and soybean bran incorporation of sugarcane bagasse as a co-substrate in solid-state fermentation. **Food Science and Biotechnology**, v. 23, n. 4, p. 1199–1205, 2014.
- GIL, M. I.; TOMAS-BARBERAN, F. A.; HESS-PIERCE, B.; HOLCROFT, D. M.; KADER, A. A. Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing. **Journal of Agricultural and Food chemistry**, v. 48, n. 10, p. 4581-4589, 2000.
- GENGAIHI, S. G.; ELLA, F. M. A.; EMAD, M. H.; EMAD, S.; DOHA, H. Antioxidant activity of phenolic compounds from different grape wastes. **Food Processing and Technology**, v. 5, n. 296, p. 329-334, 2014.
- GOSSLAU, A.; CHEN, K. Y.; HO, C. T.; LI, S. Anti-inflammatory effects of characterized orange peel extracts enriched with bioactive polymethoxyflavones. **Food Science and Human Wellness**, v. 3, n. 1, p. 26-35, 2014.
- HÄMÄLÄINEN, M.; LILJA, R.; KANKAANRANTA, H.; MOILANEN, E. Inhibition of iNOS expression and NO production by anti-inflammatory steroids: Reversal by histone deacetylase inhibitors. **Pulmonary pharmacology e therapeutics**, v. 21, n. 2, p. 331-339, 2008.
- HASSAN, Z. M.; OSHEBA, A. S.; KHALLAF, M. F.; ABDEL-FATTAH, A. A. Assessment of grape seeds as a source of antioxidant compounds. **Arab Universities Journal of Agricultural Sciences**, v. 27, n. 1, p. 501-509, 2019.
- HAYTA, M.; İŞÇİMEN, E. M. Antidiabetic, antihypertensive and antioxidant properties of grapevine leaf extracts obtained by ultrasound, microwave assisted, and classical solvent extraction. **Erwerbs-Obstbau**, v. 60, n. 1, p. 79-85, 2018.
- HEGAZY, M. E. F.; HAMED, A. R.; MOHAMED, T. A.; DEBBAB, A.; NAKAMURA, S.; MATSUDA, H.; PARÉ, P. W. Anti-inflammatory sesquiterpenes from the medicinal herb *Tanacetum sinaicum*. **RSC Advances**, v. 5, n. 56, p. 44895-44901, 2015.

- HOGAN, S.; ZHANG, L.; LI, J.; SUN, S.; CANNING, C.; ZHOU, K. Antioxidant rich grape pomace extract suppresses postprandial hyperglycemia in diabetic mice by specifically inhibiting alpha-glucosidase. **Nutrition & Metabolism**, v. 7, n. 1, p. 71, 2010.
- HUANG, Y. L.; MA, Y. S.; TSAI, Y. H.; CHANG, S. K. In vitro hypoglycemic, cholesterol-lowering and fermentation capacities of fiber-rich orange pomace as affected by extrusion. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 124, p. 796-801, 2019.
- HO, S.-C.; KUO, C.-T. Hesperidin, nobiletin, and tangeretin are collectively responsible for the anti-neuroinflammatory capacity of tangerine peel (*Citri reticulatae pericarpium*). **Food and Chemical Toxicology**, v. 71, p. 176-182, 2014.
- IDF – International Diabetes Federation. **Atas de diabetes da IDF – 9 Edição**. Disponível em: <<https://www.diabetesatlas.org/en/>> Acessado em: Janeiro de 2020.
- IPEA – Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada. Objetivos de Desenvolvimento Sustentáveis. Disponível em: <<https://www.ipea.gov.br/ods/ods9.html>> Acessado em: Junho de 2020.
- KIM, H. K.; CHEON, B. S.; KIM, Y. H.; KIM, S.Y.; KIM, H. P. Effects of naturally occurring flavonoids on nitric oxide production in the macrophage cell line RAW 264.7 and their structure–activity relationships. **Biochemical Pharmacology**, v.58, n.5, p.759-765, 1999.
- KIM, K.-T.; RIOUX, L.-E.; TURGEON, S. L. Alpha-amylase and alpha-glucosidase inhibition is differentially modulated by fucoidan obtained from *Fucus vesiculosus* and *Ascophyllum nodosum*. **Phytochemistry**, v. 98, p. 27-33, 2014.
- KONG, F., SU, Z., ZHANG, L., QIN, Y., ZHANG, K. Inclusion complex of grape seeds extracts with sulfobutyl ether β -cyclodextrin: Preparation, characterization, stability and evaluation of α -glucosidase and α -amylase inhibitory effects in vitro. **LWT**, v. 101, p. 819-826, 2019.
- LINGUA, M. S.; FABANI, M. P.; WUNDERLIN, D. A.; BARONI, M. V. In vivo antioxidant activity of grape, pomace and wine from three red varieties grown in Argentina: Its relationship to phenolic profile. *Journal of Functional Foods*, v. 20, p. 332-345, 2016.
- LIVISACA, A.G. A. **Actividades antiinflamatorias del nopal y la tuna en el crecimiento de células endoteliales (HUVEC)**. Tese (Licenciatura na área de Engenharia em Agroindustrial de Alimentos) - Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano, Honduras, 2013.
- LONDOÑO-LONDOÑO, J.; DE LIMA, V. R.; LARA, O.; GIL, A.; PASA, T. B. C.; ARANGO, G. J.; PINEDA, J. R. R. Clean recovery of antioxidant flavonoids from citrus peel: Optimizing an aqueous ultrasound-assisted extraction method. **Food Chemistry**, v. 119, n. 1, p. 81-87, 2010.
- MARTINS, I. M.; ROBERTO, B. S.; BLUMBERG, J. B.; CHEN, C. Y. O.; MACEDO, G. A. Enzymatic biotransformation of polyphenolics increases antioxidant activity of red and white grape pomace. **Food Research International**, v. 89, p. 533-539, 2016.

- MATSUDA, H.; MORIKAWA, T.; ANDO, S.; TOQUCHIDA, I.; YOSHIKAWA, M. Structural requirements of flavonoids for nitric oxide production inhibitory activity and mechanism of action. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.11, n.9, p.1995-2000, 2003.
- MILLER, G. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.
- MOTTA, A. S.; BRANDELLI, A. Characterization of an Antibacterial Peptide Produced by *Brevibacterium Linens*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 92 n. 1, p. 63–70, 2002.
- MUHTADI, H.; AZIZAH, T.; SUHENDI, A.; YEN, K. H. Antidiabetic and antihypercholesterolemic activities of *Citrus sinensis* peel: In vivo study. **National Journal of Physiology, Pharmacy and Pharmacology**, v. 5, n. 5, p. 382-385, 2015.
- MURAKAMI, A.; NAKAMURA, Y.; OHTO, Y.; YANO, M.; KOSHIBA, T.; KOSHIMIZU, K.; TOKUDA, H.; NISHINO, H.; OHIGASHI, H. Suppressive effects of citrus fruits on free radical generation and nobilentin, an anti-inflammatory polymethoxyflavonoid. **Biofactors**, v. 12, n. 1-4, p. 187-192, 2000.
- NASSIRI-ASL, M.; HOSSEINZADEH, H. Review of the pharmacological effects of *Vitis vinifera* (grape) and its bioactive constituents: An update. **Phytotherapy Research**, v. 30, n. 9, p. 1392-1403, 2016.
- OAK, M.; BEDOUIA, J.; SCHINI-KERTH, V.B. Antiangiogenic properties of natural polyphenols from red wine and green tea. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v.16, p.1-8, 2005.
- OKINO-DELGADO, C. H.; FLEURI, L. F. Obtaining lipases from byproducts of orange juice processing. **Food Chemistry**, v. 163, p. 103–107, 2014.
- PARDO, F. A. S. Extração de compostos fenólicos com potencial bioativo a partir de bagaço industrial de laranja seco e biotransformado usando CO₂ supercrítico. Dissertação (Mestrado na área de Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP, 2016.
- PARK, H. J.; ZHANG, Y.; GEORGESCU, S. P.; JOHNSON, K. L.; KONG, D.; GALPER, J. B. Human umbilical vein endothelial cells and human dermal microvascular endothelial cells offer new insights into the relationship between lipid metabolism and angiogenesis. **Stem cell reviews**, v. 2, n. 2, p. 93-101, 2006.
- PEREIRA, M. S. **Resíduos de laranja como fonte de enzimas e compostos bioativos**. Dissertação (Mestrado na área de Biotecnologia) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista ‘Júlio de Mesquita Filho’, Botucatu-SP, 2017.
- PEREIRA, R. M.; LÓPEZ, B.G.C.; DINIZ, S. N.; ANTUNES, A. A.; GARCIA, D. M.; OLIVEIRA, C. R.; MARCUCCI, M. C. Quantification of flavonoids in Brazilian orange peels and industrial orange juice processing wastes. **Agricultural Sciences**, v. 8, n. 07, p. 631, 2017.

POSADINO, A. M.; COSSU, A.; GIORDO, R.; ZINELLU, A.; SOTGIA, S.; VARDEU, A.; HOA, P. T.; NGUYEN, L. V. H.; CARRU, C.; PINTUS, G. Resveratrol alters human endothelial cells redox state and causes mitochondrial-dependent cell death. **Food and chemical toxicology**, v. 78, p. 10-16, 2015.

POSADINO, A. M.; BIOSA, G.; ZAYED, H.; ABOU-SALEH, H.; COSSU, A.; NASRALLAH, G. K.; GIORDO, R.; PAGNOZZI, D.; PORCU, M. C.; PRETTI, L.; PINTUS, G. Protective effect of cyclically pressurized solid–liquid extraction polyphenols from Cagnulari grape pomace on oxidative endothelial cell death. **Molecules**, v. 23, n. 9, p. 2105, 2018.

RANI, R.; GHOSH, S. Production of phytase under solid-state fermentation using *Rhizopus oryzae*: Novel strain improvement approach and studies on purification and characterization. **Bioresource technology**, v. 102, n. 22, p. 10641-10649, 2011.

REZZADORI, K.; BENEDETTI, S. Proposições para valorização de resíduos do processamento do suco de laranja. In: **International Workshop Advances in Cleaner Production**. São Paulo: UNIP, 2009. p. 1-11.

RODRÍGUEZ-MORGADO, B.; CANDIRACCI, M.; SANTA-MARÍA, C.; REVILLA, E.; GORDILLO, B.; PARRADO, J.; CASTAÑO, A. Obtaining from grape pomace an enzymatic extract with anti-inflammatory properties. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 70, n. 1, p. 42-49, 2015.

ROSSETTO, M. R. M.; VIANELLO, F.; ROCHA, S. D.; LIMA, G. P. P. Antioxidant substances and pesticide in parts of beet organic and conventional manure. **African Journal of Plant Science**, v. 3, n. 11, p. 245-253, 2009.

RUDRA, S. G.; NISHAD, J.; JAKHAR, N.; KAUR, C. Food industry waste: mine of nutraceuticals. **International Journal of Science, Environment and Technology**, v. 4, n. 1, p. 205-229, 2015.

SALEEM, M.; SAEED, M. T. Potential application of waste fruit peels (orange, yellow lemon and banana) as wide range natural antimicrobial agent. **Journal of King Saud University-Science**, v. 32, n. 1, p. 805-810, 2020.

SANCHETI, S.; SANCHETI, S.; SEO, S.-Y. Antidiabetic and antiacetylcholinesterase effects of ethyl acetate fraction of *Chaenomeles sinensis* (Thouin) Koehne fruits in streptozotocin-induced diabetic rats. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 65, n. 1-2, p. 55-60, 2013.

SÉFORA-SOUSA, M.; ANGELIS-PEREIRA, M. C. Mecanismos moleculares de ação anti-inflamatória e antioxidante de polifenóis de uvas e vinho tinto na aterosclerose. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 15, n. 4, p. 617-626, 2013.

SHAHRAM, H.; DINANI, S. T.; AMOUHEYDARI, M. Effects of pectinase concentration, ultrasonic time, and pH of an ultrasonic-assisted enzymatic process on extraction of phenolic compounds from orange processing waste. **Journal of Food Measurement and Characterization**, v. 13, n. 1, p. 487-498, 2019.

SHAHIDI, F.; ZHONG, Y. Measurement of antioxidant activity. **Journal of Functional Foods**, v. 18, p. 757–781, 2015.

- SHARMA, G.; GUPTA, A. K.; GANJEWALA, D.; GUPTA, C.; PRAKASH, D. Phytochemical composition, antioxidant and antibacterial potential of underutilized parts of some fruits. **International Food Research Journal**, v. 24, n. 3, p. 1167, 2017.
- SPIER, M. R.; GREINER, R.; RODRIGUEZ-LEÓN, J. A.; WOICIECHOWSKI, A. L.; PANDEY, A.; SOCCOL, V. T.; SOCCOL, C. R. Phytase production using citric pulp and other residues of the agroindustry in SSF by fungal isolates. **Food Technology and Biotechnology**, v. 46, n. 2, p. 178-182, 2008.
- SOTO, K. M.; QUEZADA-CERVANTES, C. T.; HERNÁNDEZ-ITURRIAGA, M.; LUNA-BÁRCENAS, G.; VAZQUEZ-DUHALT, R.; MENDOZA, S. Fruit peels waste for the green synthesis of silver nanoparticles with antimicrobial activity against foodborne pathogens. **LWT**, v. 103, p. 293-300, 2019.
- SOUSA, M. C. **Avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos alcóolicos preparados a partir dos frutos (casca e polpa) de *Citrus sinensis* L. Osbeck – variação Pêra e Navel – frente a bactérias e fungos patogênicos**. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação na área de Farmácia) – Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande-PB, 2013.
- SPIGNO, G.; TRAMELLI, L.; DE FAVERI, D. M. Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. **Journal of Food Engineering**, v. 81, n. 1, p. 200-208, 2007.
- TANG, G. Y.; ZHAO, C. N.; LIU, Q.; FENG, X. L.; XU, X. Y.; CAO, S. Y.; MENG, X.; LI, S.; GAN, R.-Y.; LI, H.-B. Potential of grape wastes as a natural source of bioactive compounds. **Molecules**, v. 23, n. 10, p. 2598, 2018.
- TOALDO, I. M. **Potencial bioativo de sucos de uva *Vitis labrusca* L.: caracterização química e atividade antioxidante, influência de sementes de uva e de pectinases na composição fenólica, e bioatividade do trans-resveratrol em células humanas**. Tese (Doutorado na área de Ciências de Alimentos) – Centro de Ciências Agrárias – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis-SC, 2016.
- TUNDIS, R.; LOIZZO, M. R.; MENICHINI, F. Natural products as α -amylase and α -glucosidase inhibitors and their hypoglycaemic potential in the treatment of diabetes: An update. **Mini Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 10, n. 4, p. 315-331, 2010.
- UDDIN, N.; HASAN, M. R.; HOSSAIN, M. M.; SARKER, A.; HASAN, A. N.; ISLAM, A. M.; CHOWDHURY, M. M. H.; RANA, M. S. In vitro α -amylase inhibitory activity and in vivo hypoglycemic effect of methanol extract of *Citrus macroptera* Montr. fruit. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 4, n. 6, p. 473-479, 2014.
- VALIATTI, F. B.; CRISPIM, D.; BENFICA, C.; VALIATTI, B. B.; KRAMER, C. K.; CANANI, L. H. Papel do fator de crescimento vascular endotelial na angiogênese e na retinopatia diabética. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 55, n. 2, p. 106-113, 2011.
- VODNAR, D. C.; CĂLINOIU, L. F.; DULF, F. V.; ȘTEFĂNESCU, B. E.; CRIȘAN, G.; SOCACIU, C. Identification of the bioactive compounds and antioxidant, antimutagenic and antimicrobial activities of thermally processed agro-industrial waste. **Food Chemistry**, v. 231, p. 131-140, 2017.

XU, C.; YAGIZ, Y.; HSU, W. Y.; SIMONNE, A.; LU, J.; MARSHALL, M. R. Antioxidant, antibacterial, and antibiofilm properties of polyphenols from muscadine grape (*Vitis rotundifolia* Michx.) pomace against selected foodborne pathogens. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 28, p. 6640-6649, 2014.

YANG, S. C.; LIN, C. H.; SUNG, C. T.; FANG, J. Y. Antibacterial activities of bacteriocins: application in foods and pharmaceuticals. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, p. 241, 2014.

ZHU, Q. Y.; HACKMAN, R. M.; ENSUNSA, J. L.; HOLT, R. R.; KEEN, C. L. Antioxidative activities of oolong tea. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 50, p. 692–699, 2002.