

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 27/07/2022.

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. Mérô, 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>	<i>80</i>
<i>Capítulo 3: Resíduos de laranja e uva, isolados e fermentados: fontes de antioxidantes, antimicrobianos, antidiabéticos, moduladores celulares e anti-inflamatórios.....</i>	<i>91</i>
<i>Resumo</i>	<i>91</i>
<i>Abstract.....</i>	<i>92</i>
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>	<i>119</i>

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, 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 ($p > 0,05$).

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 específica 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 U/g.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, 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 ($p>0,05$).

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, 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 ($p>0,05$).

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.

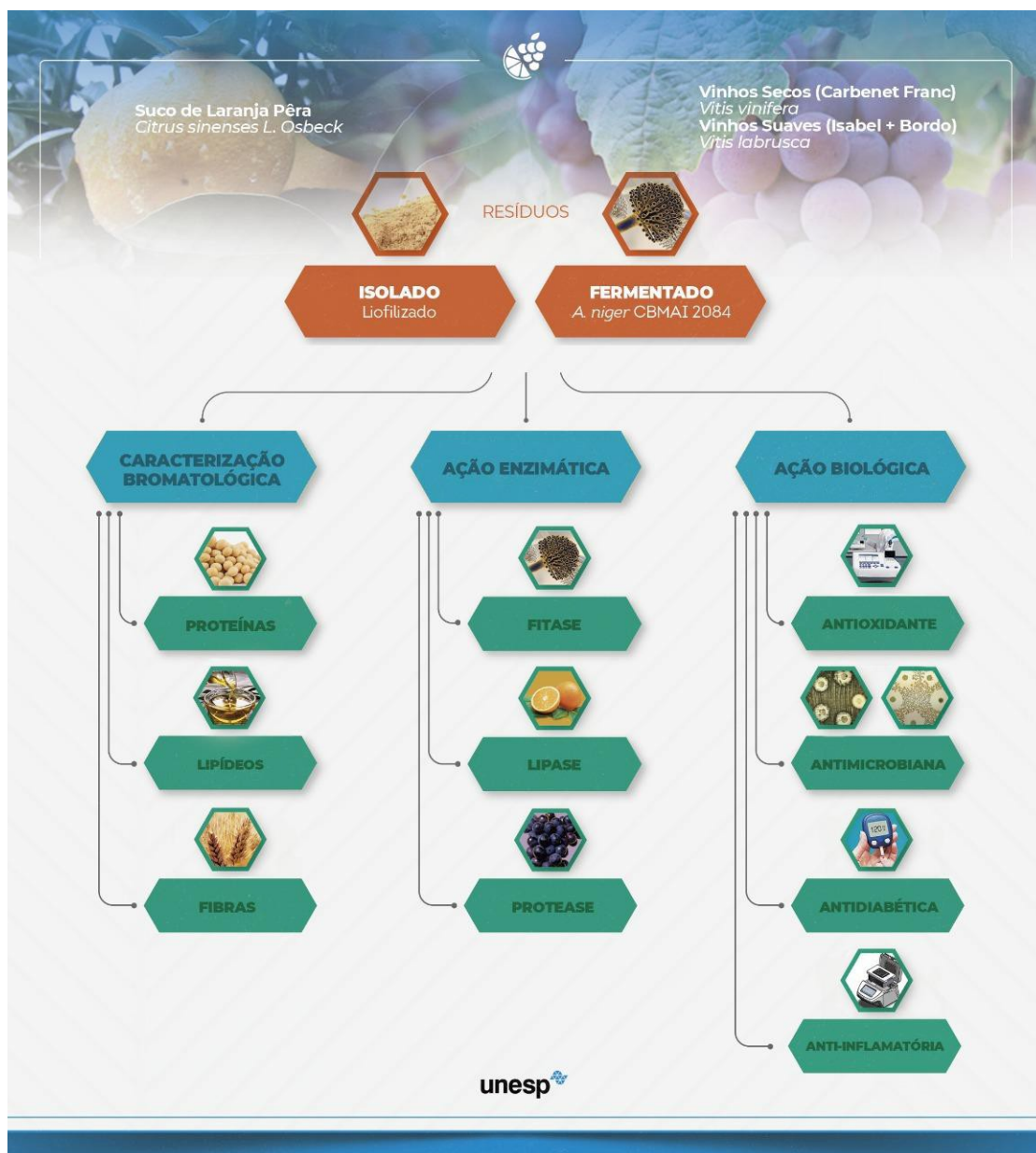
Palavras-chave: *Citrus sinensis* L. Osbeck, *Vitis vinifera* e *Vitis labrusca*, enzimas, compostos bioativos, ação biológica.

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).

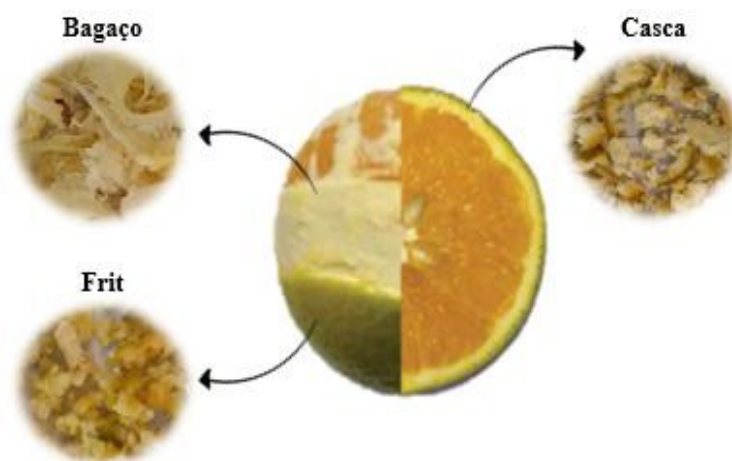


Figura 1. Resíduos sólidos (Bagaço, Casca e Frit) originados do processamento do suco de laranja (OKINO-DELGADO e FLEURI, 2014) modificado.

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 (KOBBLITZ 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 a 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-etilbenzotiazolina-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).

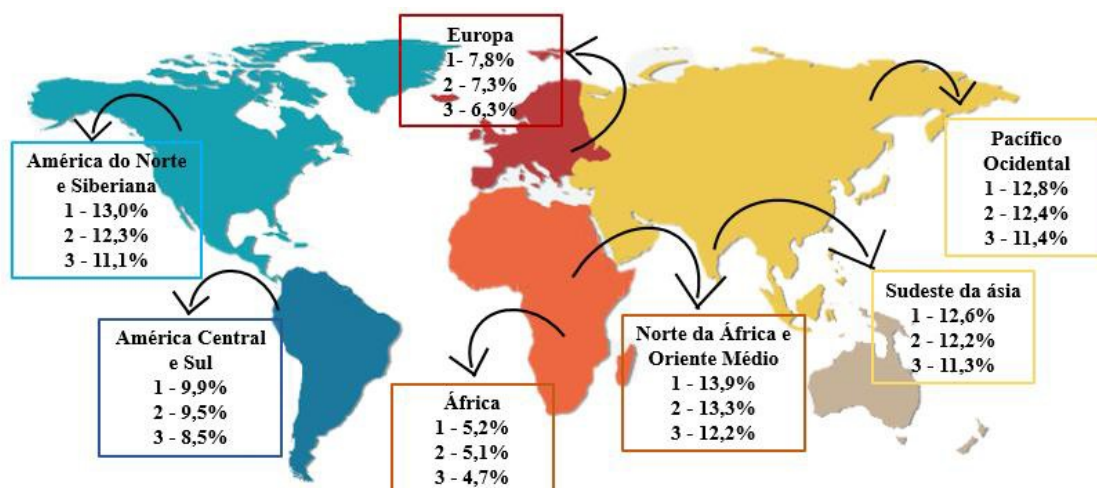


Figura 2. Análise atual e estimada dos anos 2030 e 2045 no predomínio de diabéticos adultos, que possuem de 20 a 79 anos, em 7 regiões do globo: América do Norte e Caribe, América Central e Sul, África do Norte e Oriente médio, África, Sudeste da Ásia, Europa e Oeste do Pacífico. Representação dos anos 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-lipídica; 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-agropecuario-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 agente 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.; BIZ-ZARRI, 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. **Pharmacology 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.; REICHEL, 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.