

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

**Extração de flavanonas do albedo da Laranja-da-terra
(*Citrus aurantium*): caracterização parcial e hidrólise
enzimática da naringina**

Flavanones extraction from Bitter oranges's albedos (*Citrus aurantium*):
partial characterization and enzymatic hydrolysis of naringin

Fernando Merz Junior

Araraquara
2019

**Extração de flavanonas do albedo da Laranja-da-terra
(*Citrus aurantium*): caracterização parcial e hidrólise
enzimática da naringina**

Flavanones extraction from Bitter oranges's albedos (*Citrus aurantium*):
partial characterization and enzymatic hydrolysis of naringin

Fernando Merz Junior

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-graduação em
Alimentos e Nutrição para obtenção
do título de Mestre em Alimentos e
Nutrição.

Área de Concentração: Ciência dos
Alimentos

Orientador: Prof. Dr. Rubens Monti

Coorientador: Prof. Dr. Fernando
Masarin

Araraquara
2019

M577e Merz Junior, Fernando.
Extração de Flavanonas do albedo da Laranja-da-terra (*Citrus aurantium*): caracterização parcial e hidrólise enzimática da naringina = Flavanones extraction from Bitter oranges's albedos (*Citrus aurantium*): partial characterization and enzymatic hydrolysis of naringin / Fernando Merz Junior. – Araraquara, 2019.
59 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Alimentos e Nutrição. Área de concentração em Ciência dos Alimentos.

Orientador: Rubens Monti.
Coorientador: Fernando Masarin.

1. Laranja. 2. Albedo. 3. Flavonoides. 4. Prunina. 5. Naringenina. I. Monti, Rubens, orient. II. Masarin, Fernando, coorient. III. Título.

Diretoria do Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP - Campus de Araraquara

CAPES: 33004030055P6
Esta ficha não pode ser modificada

TERMO DE SIGILO PARA MEMBRO DE BANCA EXAMINADORA

RUBENS MONTI, nacionalidade brasileira, inscrito no CPF/MF sob n 98207202815, portador da cédula de identidade RG nº 4.782.083-4 , doravante denominada **EXAMINADOR**;

Considerando que a UNESP possui política institucional que visa a proteção legal dos resultados oriundos de suas atividades de pesquisa e desenvolvimento técnico e tecnológico;

Considerando que a novidade é um dos requisitos necessários à proteção dos resultados de pesquisas pelos institutos de propriedade industrial, e, por consequência, a sua manutenção em sigilo até a adoção dos procedimentos legais pertinentes é indispensável para a obtenção da proteção almejada; e

Considerando, ainda, o disciplinado pelo ordenamento jurídico brasileiro, em especial pela Lei nº 9.279/96 (Lei de Propriedade Industrial), Lei nº 9.609/98 (Lei de Programa de Computador), Lei nº 9.610/98 (Lei de Direitos Autorais), Lei nº 10.973/04 (Lei de Inovação, regulamentada pelo Decreto nº 5.563, de 11 de outubro de 2005) e Lei Complementar nº 1.049/08 (Lei Paulista de Inovação, regulamentada pelo Decreto nº 54.690, de 18 de agosto de 2009);

firma o CONVIDADO o presente Termo de Sigilo, nas condições a seguir:

CLÁUSULA PRIMEIRA. A EXAMINADORA compromete-se a manter sigilo em relação a qualquer "Informação Confidencial" a que tiver acesso no exercício de suas atividades de membro de banca examinadora constituída para análise da tese intitulada "Extração de flavanonas do albedo da Laranja-da-terra (Citrus aurantium): caracterização parcial e hidrólise enzimática da naringina", desenvolvida pelo mestrando **FERNANDO MERZ JUNIOR** da Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Campus de Araraquara-UNESP da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho".

CLÁUSULA SEGUNDA. A expressão "Informação Confidencial" abrange toda a informação relativa às pesquisas desenvolvidas no escopo da tese a que a Examinadora tenha acesso, sob a forma escrita, verbal ou por quaisquer outros meios de comunicação, inclusive eletrônicos.

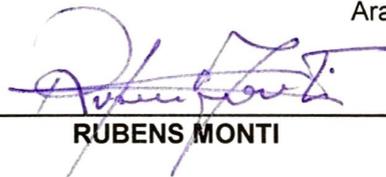
Parágrafo único. Não será considerada "Informação Confidencial" aquela que estiver sob domínio público antes de ser revelada ou disponibilizada à Examinadora.

CLÁUSULA TERCEIRA. O presente termo vigorará até que os direitos de propriedade intelectual das pesquisas desenvolvidas no escopo da tese estejam devidamente protegidos junto ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial – INPI e junto ao Órgão competente em âmbito internacional pela UNESP.

CLÁUSULA QUARTA. Fica eleito uma das varas da Fazenda Pública Estadual, circunscrição judiciária de São Paulo, Capital, para dirimir dúvidas ou litígios oriundos do presente instrumento.

E para todos os efeitos, firma o presente termo na presença das testemunhas abaixo-assinadas.

Araraquara, 27 de agosto de 2019.



RUBENS MONTI



TESTEMUNHA

Nome: Aniele Vilella
CPF/MF:368.997.328-74

TESTEMUNHA

Nome:
CPF/MF:

TERMO DE SIGILO PARA MEMBRO DE BANCA EXAMINADORA

JONAS CONTIERO, nacionalidade brasileira, inscrito no CPF/MF sob nº 002184438-03, portador da cédula de identidade RG nº 6079244, doravante denominada **EXAMINADOR**;

Considerando que a UNESP possui política institucional que visa a proteção legal dos resultados oriundos de suas atividades de pesquisa e desenvolvimento técnico e tecnológico;

Considerando que a novidade é um dos requisitos necessários à proteção dos resultados de pesquisas pelos institutos de propriedade industrial, e, por consequência, a sua manutenção em sigilo até a adoção dos procedimentos legais pertinentes é indispensável para a obtenção da proteção almejada; e

Considerando, ainda, o disciplinado pelo ordenamento jurídico brasileiro, em especial pela Lei nº 9.279/96 (Lei de Propriedade Industrial), Lei nº 9.609/98 (Lei de Programa de Computador), Lei nº 9.610/98 (Lei de Direitos Autorais), Lei nº 10.973/04 (Lei de Inovação, regulamentada pelo Decreto nº 5.563, de 11 de outubro de 2005) e Lei Complementar nº 1.049/08 (Lei Paulista de Inovação, regulamentada pelo Decreto nº 54.690, de 18 de agosto de 2009);

firma o CONVIDADO o presente Termo de Sigilo, nas condições a seguir:

CLÁUSULA PRIMEIRA. A EXAMINADORA compromete-se a manter sigilo em relação a qualquer "Informação Confidencial" a que tiver acesso no exercício de suas atividades de membro de banca examinadora constituída para análise da tese intitulada "Extração de flavanonas do albedo da Laranja-da-terra (*Citrus aurantium*): caracterização parcial e hidrólise enzimática da naringina", desenvolvida pelo mestrando **FERNANDO MERZ JUNIOR** da Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Campus de Araraquara-UNESP da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho".

CLÁUSULA SEGUNDA. A expressão "Informação Confidencial" abrange toda a informação relativa às pesquisas desenvolvidas no escopo da tese a que a Examinadora tenha acesso, sob a forma escrita, verbal ou por quaisquer outros meios de comunicação, inclusive eletrônicos.

Parágrafo único. Não será considerada "Informação Confidencial" aquela que estiver sob domínio público antes de ser revelada ou disponibilizada à Examinadora.

CLÁUSULA TERCEIRA. O presente termo vigorará até que os direitos de propriedade intelectual das pesquisas desenvolvidas no escopo da tese estejam devidamente protegidos junto ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial – INPI e junto ao Órgão competente em âmbito internacional pela UNESP.

CLÁUSULA QUARTA. Fica eleito uma das varas da Fazenda Pública Estadual, circunscrição judiciária de São Paulo, Capital, para dirimir dúvidas ou litígios oriundos do presente instrumento.

E para todos os efeitos, firma o presente termo na presença das testemunhas abaixo-assinadas.

Araraquara, 27 de agosto de 2019.



JONAS CONTIERO

TESTEMUNHA

Nome: Aniele Vilella
CPF/MF: 368.997.328-74

TESTEMUNHA

Nome:
CPF/MF:

TERMO DE SIGILO PARA MEMBRO DE BANCA EXAMINADORA

ANA LUCIA MARTINIANO NASSER, nacionalidade brasileira, inscrito no CPF/MF sob nº 14151275819, portador da cédula de identidade RG nº 18143384-9, doravante denominada **EXAMINADOR**;

Considerando que a UNESP possui política institucional que visa a proteção legal dos resultados oriundos de suas atividades de pesquisa e desenvolvimento técnico e tecnológico;

Considerando que a novidade é um dos requisitos necessários à proteção dos resultados de pesquisas pelos institutos de propriedade industrial, e, por consequência, a sua manutenção em sigilo até a adoção dos procedimentos legais pertinentes é indispensável para a obtenção da proteção almejada; e

Considerando, ainda, o disciplinado pelo ordenamento jurídico brasileiro, em especial pela Lei nº 9.279/96 (Lei de Propriedade Industrial), Lei nº 9.609/98 (Lei de Programa de Computador), Lei nº 9.610/98 (Lei de Direitos Autorais), Lei nº 10.973/04 (Lei de Inovação, regulamentada pelo Decreto nº 5.563, de 11 de outubro de 2005) e Lei Complementar nº 1.049/08 (Lei Paulista de Inovação, regulamentada pelo Decreto nº 54.690, de 18 de agosto de 2009);

firma o CONVIDADO o presente Termo de Sigilo, nas condições a seguir:

CLÁUSULA PRIMEIRA. A EXAMINADORA compromete-se a manter sigilo em relação a qualquer "Informação Confidencial" a que tiver acesso no exercício de suas atividades de membro de banca examinadora constituída para análise da tese intitulada "Extração de flavanonas do albedo da Laranja-da-terra (*Citrus aurantium*): caracterização parcial e hidrólise enzimática da naringina", desenvolvida pelo mestrando **FERNANDO MERZ JUNIOR** da Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Campus de Araraquara-UNESP da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho".

CLÁUSULA SEGUNDA. A expressão "Informação Confidencial" abrange toda a informação relativa às pesquisas desenvolvidas no escopo da tese a que a Examinadora tenha acesso, sob a forma escrita, verbal ou por quaisquer outros meios de comunicação, inclusive eletrônicos.

Parágrafo único. Não será considerada "Informação Confidencial" aquela que estiver sob domínio público antes de ser revelada ou disponibilizada à Examinadora.

CLÁUSULA TERCEIRA. O presente termo vigorará até que os direitos de propriedade intelectual das pesquisas desenvolvidas no escopo da tese estejam devidamente protegidos junto ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial – INPI e junto ao Órgão competente em âmbito internacional pela UNESP.

CLÁUSULA QUARTA. Fica eleito uma das varas da Fazenda Pública Estadual, circunscrição judiciária de São Paulo, Capital, para dirimir dúvidas ou litígios oriundos do presente instrumento.

E para todos os efeitos, firma o presente termo na presença das testemunhas abaixo-assinadas.

Araraquara, 27 de agosto de 2019.



TESTEMUNHA



ANA LUCIA MARTINIANO NASSER

TESTEMUNHA

Nome: Aniele Vilella
CPF/MF: 368.997.328-74

Nome:
CPF/MF:

TERMO DE SIGILO PARA MEMBRO DE BANCA EXAMINADORA

JULIANA CRISTINA BASSAN, nacionalidade brasileira, inscrito no CPF/MF sob nº 33290279839, portador da cédula de identidade RG nº 32.717.238-1, doravante denominada **CONVIDADA**;

Considerando que a UNESP possui política institucional que visa a proteção legal dos resultados oriundos de suas atividades de pesquisa e desenvolvimento técnico e tecnológico;

Considerando que a novidade é um dos requisitos necessários à proteção dos resultados de pesquisas pelos institutos de propriedade industrial, e, por consequência, a sua manutenção em sigilo até a adoção dos procedimentos legais pertinentes é indispensável para a obtenção da proteção almejada; e

Considerando, ainda, o disciplinado pelo ordenamento jurídico brasileiro, em especial pela Lei nº 9.279/96 (Lei de Propriedade Industrial), Lei nº 9.609/98 (Lei de Programa de Computador), Lei nº 9.610/98 (Lei de Direitos Autorais), Lei nº 10.973/04 (Lei de Inovação, regulamentada pelo Decreto nº 5.563, de 11 de outubro de 2005) e Lei Complementar nº 1.049/08 (Lei Paulista de Inovação, regulamentada pelo Decreto nº 54.690, de 18 de agosto de 2009);

firma o CONVIDADO o presente Termo de Sigilo, nas condições a seguir:

CLÁUSULA PRIMEIRA. A CONVIDADA compromete-se a manter sigilo em relação a qualquer "Informação Confidencial" a que tiver acesso no exercício de suas atividades de membro de banca examinadora constituída para análise da tese intitulada "Extração de flavanonas do albedo da Laranja-da-terra (*Citrus aurantium*): caracterização parcial e hidrólise enzimática da naringina", desenvolvida pelo mestrando **FERNANDO MERZ JUNIOR** da Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Campus de Araraquara-UNESP da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho".

CLÁUSULA SEGUNDA. A expressão "Informação Confidencial" abrange toda a informação relativa às pesquisas desenvolvidas no escopo da tese a que a Convidada tenha acesso, sob a forma escrita, verbal ou por quaisquer outros meios de comunicação, inclusive eletrônicos.

Parágrafo único. Não será considerada "Informação Confidencial" aquela que estiver sob domínio público antes de ser revelada ou disponibilizada à Examinadora.

CLÁUSULA TERCEIRA. O presente termo vigorará até que os direitos de propriedade intelectual das pesquisas desenvolvidas no escopo da tese estejam devidamente protegidos junto ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial – INPI e junto ao Órgão competente em âmbito internacional pela UNESP.

CLÁUSULA QUARTA. Fica eleito uma das varas da Fazenda Pública Estadual, circunscrição judiciária de São Paulo, Capital, para dirimir dúvidas ou litígios oriundos do presente instrumento.

E para todos os efeitos, firma o presente termo na presença das testemunhas abaixo-assinadas.

Araraquara, 27 de agosto de 2019.



JULIANA CRISTINA BASSAN

TESTEMUNHA
Nome: Aniele Vilella
CPF/MF: 368.997.328-74

TESTEMUNHA
Nome: Cláudia Lúcia Molina
CPF/MF: 108.957.808-36

AGRADECIMENTOS

Apoio financeiro: O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001. Nº do Processo: 1731880.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo equipamento utilizado sob cuidados da Prof^a Dr^a Magali Conceição Monteiro da Silva.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara - UNESP.

Ao Prof. Dr. Rubens Monti pela orientação e dedicação a este trabalho, sobretudo a todos os ensinamentos e confiança depositados em mim.

À Prof^a. Dr^a. Juliana Bassan pela disposição de colaborar com o desenvolvimento de diversas etapas do projeto.

À Prof^a. Dr^a. Juliana Álvares Duarte Bonini Campos pelo conhecimento de estatística necessário para o desenvolvimento do projeto e disposição para me auxiliar e retirar dúvidas.

Aos demais professores, técnicos e funcionários que contribuíram ativamente com a execução das atividades e para o bom funcionamento da universidade.

AGRADECIMENTOS PESSOAIS

Á Deus e todos os seres de luz do universo.

À equipe do Laboratório de Enzimologia Industrial e Análise de Alimentos pelo companheirismo, pela ajuda, e oportunidade de crescimento intelectual e pessoal agregados a mim.

Aos amigos e colegas de profissão pelas discussões e contribuições, além da força em diversos momentos.

Aos meus pais e irmã pelo apoio integral e pela confiança depositada em mim.

Meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

Objetivo: Extrair e caracterizar flavanonas do albedo de Laranja-da-terra (*Citrus aurantium*) por diferentes métodos e observar a eficiência com relação à extração. Partindo dos extratos obtidos utilizou-se a enzima naringinase comercial para a hidrólise da naringina presente nos extratos. **Métodos:** Para as extrações dos flavonoides foram utilizados cinco métodos diferentes: método de extração por trituração em água, extração por trituração hidroetanólica (70%), extração hidrotérmica, extração por prensa e extração por Soxhlet (Alcoólico). Os extratos de albedo, obtidos pelos diferentes métodos, foram analisados por Espectroscopia UV/VIS para determinação de compostos fenólicos (Folin-Ciocalteu), flavanonas (Davis) e açúcares redutores totais (Miller). Para a análise das flavanonas específicas (naringina, hesperidina, prunina, naringenina e hesperitina) os diferentes extratos foram submetidos à Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE-DAD). Todos os métodos foram realizados em triplica. Para a comparação das médias entre os tratamentos foi utilizada a ANOVA *one way* seguida do teste de *Tukey* – dados homocedásticos – ou ANOVA com correção de *Welch* seguida do teste de *Games-Howell* – dados heterocedásticos. Ambas as análises foram realizadas ao nível de significância de 5% ($\alpha=0,05$), através do programa estatístico IBM SPSS Statistics 24®. **Resultados:** Na determinação de açúcares redutores não houve diferença significativa entre os cinco tratamentos. Já para determinação de flavanonas e fenólicos totais os tratamentos que utilizaram etanol como solvente apresentaram maior eficiência de extração. Durante as análises cromatográficas (HPLC-DAD) foi possível quantificar a naringina e prunina presente em todas as extrações havendo diferença significativa apenas para a extração alcoólica por Soxhlet (1,49 mg/mL de naringina e 0,70 mg/mL de prunina) que apresentou melhor eficiência de extração. A naringina foi hidrolisada nos extratos aquosos pela enzima naringinase comercial (atividade de α -L-ramnosidase e β -D-glicosidase) e α -L-ramnosidase parcialmente purificada, ambas inibidas na presença de etanol. **Conclusão:** A escolha do método de extração pode variar de acordo com os compostos de interesse e com o processo de implementação necessário industrialmente. Apesar do método alcoólico (Soxhlet) ter apresentado melhor eficiência de extração da naringina e prunina, quando comparado com a utilização de água, o etanol possui maior valor de compra e necessita de tratamentos de purificação e retirada do solvente. O etanol também inibiu a atividade das enzimas utilizadas, impossibilitando a hidrólise enzimática dos compostos obtidos.

Palavras-chave: laranja; albedo; flavonoides; prunina; naringenina.

ABSTRACT

Objectives: To extract and to characterize flavanones of the Bitter orange's albedo (*Citrus aurantium*) by different methods and to observe the efficiency regarding the extraction. The Naringinase commercial enzyme was used for hydrolysis of the naringin present in the extracts from the different extractions.

Methods: Five different methods were used for the extractions of the flavonoids: extraction method by trituration in water, extraction by hydroethanolic trituration (70 %), hydrothermal extraction, extraction by press and extraction by Soxhlet (Alcoholic). The extracts of albedo, obtained by the different extraction methods, were analysed by Spectroscopy UV/VIS for determination of phenolics compounds (Folin-Ciocalteu), flavanones (Davis) and total reducing sugars (Miller). To analyse the specific flavanones (naringin, hesperidin, prunin, naringenin and hesperitin) the different extracts were subjected to high performance liquid chromatography with a diode array detector (HPLC-DAD). All the methods were carried out in triplicate. For the comparison of the averages between the treatments the ANOVA one way test was used followed by the test of Tukey – homoscedastic data – or ANOVA with Welch correction followed by the test of Games-Howell – heteroscedastic data. Both analyses were carried out at the signification of 5 % ($\alpha = 0,05$), through the statistics program IBM SPSS Statistics 24 ®. **Results:** During the reducing sugars determination there wasn't significant difference between the five treatments. For the total flavanones and total phenolics determination the treatments which used ethanol as solvent presented bigger extraction efficiency. During the chromatographic analyzes (HPLC-DAD) it was possible to quantify the naringin and prunin present in all the extractions. There was significant difference only for the alcoholic extraction by Soxhlet (1,49 mg/mL of naringin and 0,70 mg/mL of prunin), being the best extraction method. The naringin was hydrolyzed in the aqueous extracts for the naringinase commercial enzyme (with both activities: α -L-rhamnosidase and β -D-glucosidase) and α -L-rhamnosidase partially purified, both inhibited in the presence of ethanol. **Conclusion:** The choice of the extraction method can vary in accordance with the interest compounds and with the necessity for industrial deployment. In spite of the alcoholic method (Soxhlet) presented better extraction efficiency of naringin and prunin, when compared with the waters ones, the ethanol has bigger purchase value and needs purification treatments and solvent retreat methods. The ethanol also inhibited the enzymes activities, being unworkable to obtain the hydrolysis compounds.

Key-words: orange; albedo; flavonoids; prunin; naringenin.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Média e desvio-padrão da concentração de açúcares redutores, flavanonas totais e fenólicos totais para cada metodologia de extração (tratamento) por meio de métodos colorimétricos. Araraquara, 2018.	38
Tabela 2. Média e desvio-padrão da concentração de naringina e prunina para cada metodologia de extração por meio de CLAE. Araraquara, 2018.	41
Tabela 3. Porcentagem de rendimento da extração de naringina e prunina para cada metodologia de extração. Araraquara, 2018.	42
Tabela 4. Média e desvio-padrão da atividade de α -L-ramnosidase e β -D-glicosidase (U/mL) e da atividade específica (U/mg) da enzima naringinase comercial. Araraquara, 2019.	44
Tabela 5. Média e desvio-padrão da concentração de naringina, prunina e naringenina após a hidrólise dos extratos com naringinase comercial por meio de CLAE-DAD. Araraquara, 2019.	47
Tabela 6. Média e desvio-padrão da concentração de naringina e prunina (CLAE-DAD) após a hidrólise dos extratos pela enzima Ramnosidase parcialmente purificada (item 4.6.2). Araraquara, 2019.	48

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química básica dos flavonoides (5).	13
Figura 2. Estrutura química das principais flavanonas cítricas. Araraquara, 2018.	14
Figura 3. Mecanismo de hidrólise da naringina pelo complexo enzimático naringinase (atividade de α -L-ramnosidase e β -D-glicosidase). Araraquara, 2018.	16
Figura 4. Estrutura 3D da atividade de α -ramnosidase em complexo com a ramnose (16,17).	17
Figura 5. Morfologia geral da laranja. Araraquara, 2018.	18
Figura 6. Preparo da Laranja-da-terra para extração de flavanonas. Araraquara, 2018.	24

Figura 7. Desenvolvimento de prensa artesanal para extração de segundo metodologia descrita no item 4.2.4. Araraquara, 2018.....	26
Figura 8. Sistema de extração de flavonoides pelo método de Soxhlet segundo item 4.2.5. Araraquara, 2018.....	27
Figura 9. Princípio químico da redução do ácido 3,5-dinitrosalicílico na presença de açúcares redutores (36).	29
Figura 10. Cromatograma dos padrões analíticos (CLAE) utilizada para quantificação dos compostos fenólicos nos diferentes extratos. Os picos correspondentes aos compostos são: (1) Narirutina; (2) Naringina; (3) Hesperidina; (4) Prunina; (5) Naringenina; (6) Hesperitina. Araraquara, 2018.	30
Figura 11. Extratos do albedo da Laranja-da-terra provenientes das diferentes extrações de acordo com as metodologias descritas nos itens 4.2.1-5. Araraquara, 2018.	37
Figura 12. Curvas analíticas por CLAE das flavanonas: a) Narirutina (1,0 - 80 µg/mL); b) Naringina (1,0 - 80 µg/mL); c) Hesperidina (1,0 - 80 µg/mL); d) Prunina (1,0 - 80 µg/mL); e) Naringenina (0,1 - 20 µg/mL); f) Hesperitina (0,1 - 20 µg/mL). Araraquara, 2018.	40
Figura 13. Espectros de absorção típicos da classe das flavanonas no UV/Vis: a) Narirutina; b) Naringina; c) Hesperidina; d) Prunina; e) Naringenina; f) Hesperitina. Araraquara, 2018.	41
Figura 14. Fluxograma industrial geral de extração de citros. Adaptado de Kharfan (46).	43
Figura 15. SDS-PAGE 10%. Perfil proteico das frações da enzima naringinase comercial após purificação parcial onde: P= padrão de massa molar; R1 e R2= α-L-ramnosidase; N1 e N2 = Naringinase Comercial; G1 e G2 = β-D-glicosidase. Araraquara, 2019.....	45

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1	Estrutura morfológica da laranja	17
2.2	Produção e processamento industrial de laranja	18
2.3	Compostos antioxidantes	19
2.4	Extração de flavanonas da laranja.....	20
2.5	Hidrólise enzimática da naringina	20
3	OBJETIVOS	22
3.1	Geral.....	22
3.2	Específicos	22
4	MATERIAL E MÉTODOS	23
4.1	Preparo da Laranja-da-terra para extração de flavanonas	23
4.2	Extração das flavanonas do albedo da Laranja-da-terra	24
4.2.1	Método de extração por trituração em água	25
4.2.2	Método de extração por trituração hidroetanólica.....	25
4.2.3	Método Hidrotérmico	25
4.2.4	Método de Prensa	26
4.2.5	Método de Soxhlet (Alcólico)	27
4.3	Determinações analíticas	28
4.3.1	Determinação de compostos fenólicos totais	28
4.3.2	Determinação de flavanonas totais	28
4.3.3	Determinação de açúcares redutores totais	28
4.3.4	Determinação do perfil e quantificação de flavanonas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....	29
4.3.5	Determinação de umidade.....	30

4.3.6	Cálculo de rendimento de extração	31
4.4	Ensaio enzimático com a Naringinase®.....	31
4.4.1	Determinação da atividade por dosagem de açúcar redutor	31
4.4.2	Determinação da atividade α -L-ramnosidase e β -D-glicosidase	32
4.5	Purificação parcial da enzima comercial.....	33
4.5.1	Determinação de proteínas totais.....	34
4.6	Hidrólise enzimática dos extratos obtidos conforme item 4.2	34
4.6.1	Enzima comercial sem purificação	34
4.6.2	Enzima ramnosidase purificada parcialmente	35
4.7	Quantificação por CLAE de flavanonas após hidrólise enzimática	35
4.8	SDS-PAGE da enzima naringinase parcialmente purificada	35
4.9	Análise estatística.....	36
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	37
5.1	Caracterização inicial dos extratos	37
5.1.1	Análises espectrofotométricas.....	37
5.1.2	Análises cromatográficas.....	39
5.2	Ensaio enzimático da enzima comercial	44
5.2.1	Determinação da atividade por dosagem de açúcar redutor	44
5.2.2	Determinação da atividade α -L-ramnosidase e β -D-glicosidase e atividade específica com p -nitrofenil- α -L-ramnosídeo® (p -NF α R) e p -nitrofenil- β -D-glicosídeo® (p -NF β G).....	44
5.3	SDS-PAGE da enzima comercial e suas frações pós purificação parcial em “BATCH”.....	45
5.4	Análise por CLAE dos produtos da hidrólise enzimática	46
6	CONCLUSÃO.....	50
	REFERÊNCIAS	52

1 INTRODUÇÃO

A citricultura apresenta grande relevância na economia mundial, está presente em mais de 80 países com uma estimativa de produção no período de 2015-2024 de mais de 60 milhões de toneladas. Nesse cenário, o Brasil desponta como o maior exportador mundial de frutas cítricas processadas, com ênfase no suco concentrado de laranja congelado (Frozen Concentrated Orange Juice - FCOJ) (1). Apesar da grande produção, a citricultura brasileira não apresenta uma ampla variedade de laranjas (Hamlin, Natal, Pêra e Valência majoritariamente), o que acaba concentrando a produção em determinadas épocas do ano, além de aumentar o risco de perdas por ataque de pragas e variações de preços. Entretanto, existem outros cultivares de laranja que apresentam boa qualidade tecnológica e são ainda subutilizadas (2).

A Laranja-da-terra (*Citrus aurantium*) é um exemplo desses cultivares. Conhecida popularmente como laranja-azedada, pertence à família Rutaceae e teve sua origem no Sudeste Asiático. No Brasil é encontrada principalmente em pomares domésticos e sua reprodução ocorre através de sementes. Caracteriza-se principalmente por apresentar porte mediano, espinhos agudos, flores aromáticas e frutos do tipo baga (casca grossa e amarga). Sua aplicação na indústria varia desde a alimentação (produção de doces e compotas), até aplicações medicinais (2).

Como qualquer tipo de fruta, a composição química das frutas cítricas sofrem interferências por diversos fatores, podendo variar significativamente dependendo da variedade da fruta, estágio de maturação, fase de

crescimento, condições climáticas, qualidade do solo e época de colheita (3,4).

Os flavonoides, substâncias conseqüentemente também influenciadas pelos fatores citados anteriormente, consistem em uma classe de compostos fenólicos, do grupo dos polifenóis, que apresentam estruturas químicas e características particulares que os diferenciam entre si. Podem aparecer como agliconas, glicosídeos ou como parte de outras estruturas que contenham flavonoides. Possuem como estrutura básica um esqueleto de difenil propano ($C_6C_3C_6$) com dois anéis benzênicos (A e B) ligados a um anel pirano (C) (Figura 1). De acordo com a substituição e o nível de oxidação no anel C os flavonoides podem ser classificados em 14 classes e são encontrados em vários alimentos de origem vegetal, sendo importantes componentes na dieta humana (5).

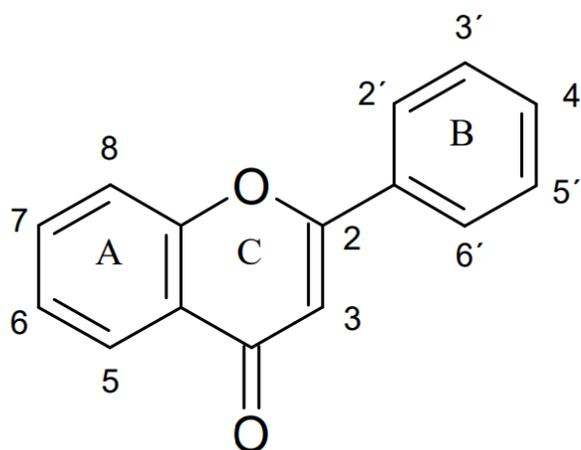


Figura 1. Estrutura química básica dos flavonoides (5).

Uma importante subclasse dos flavonoides são as flavanonas, uma vez que constituem a maioria dos flavonoides e estão presentes em concentrações significativas em frutas cítricas. As flavanonas de origem cítrica

são naturalmente glicosiladas, tais como a naringina, narirutina e hesperidina, mas também podem aparecer na forma de agliconas como naringenina e hesperitina (Figura 2) (6).

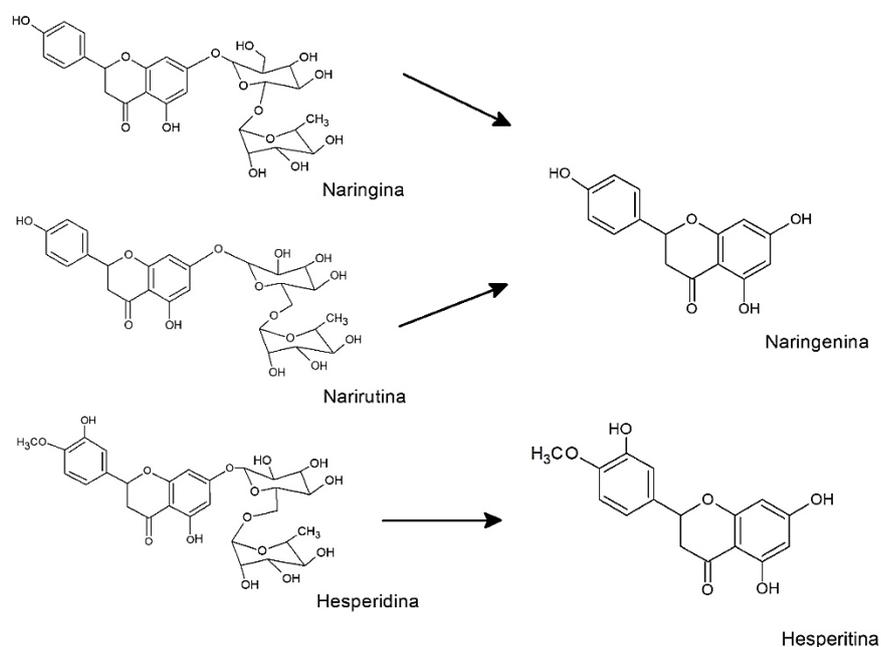


Figura 2. Estrutura química das principais flavanonas cítricas. Araraquara, 2018.

A naringina é encontrada principalmente na toranja (*grapefruit*) e, de longe, é a flavanona mais amarga e abundante em frutos imaturos, mas sua concentração diminui à medida que o fruto amadurece (7).

De modo geral, em citros, a presença de amargor tem sido uma grande limitação na aceitação comercial do suco, sendo necessária, em alguns casos, a utilização de métodos de lavagem da polpa cítrica para remoção do amargor. Esses processos, muitas vezes, são prejudiciais nutricionalmente e demandam etapas extras de purificação e remoção substâncias tóxicas (solventes orgânicos, por exemplo). Entretanto, a aplicação de processos enzimáticos apresentam vantagens no procedimento de lavagem da polpa de

laranja e toranja, no aumento do rendimento de recuperação de óleos essenciais, na remoção do amargor e clarificação de suco; além de ser considerado comercialmente mais favorável por apresentar menor impacto destrutivo sobre os nutrientes (8,9).

Dentre os compostos indesejáveis na produção de sucos cítricos, devido ao sabor amargo, está a flavanona naringina e os limonoides limonina e nomilina. Por outro lado, já existem ensaios experimentais e pesquisas em humanos que comprovam inúmeros efeitos terapêuticos e biológicos benéficos relacionados ao consumo de flavonoides. Por se tratarem de compostos bioativos, são bem conhecidos por sua atividade antioxidante, imunomoduladora, antimicrobiana e estrogênica (10).

A naringinase trata-se de um complexo enzimático que atua hidrolisando a naringina em duas etapas (Figura 3), sendo cada uma delas catalisada por umas das duas atividades da enzima, ou seja, a atividade α -L-ramnosidase (EC 3.2.1.40) hidrolisa a naringina liberando ramnose e prunina; sendo a prunina, substrato da atividade β -D-glicosidase (EC 3.2.1.21), que é hidrolisada em glicose e naringenina (11,12).

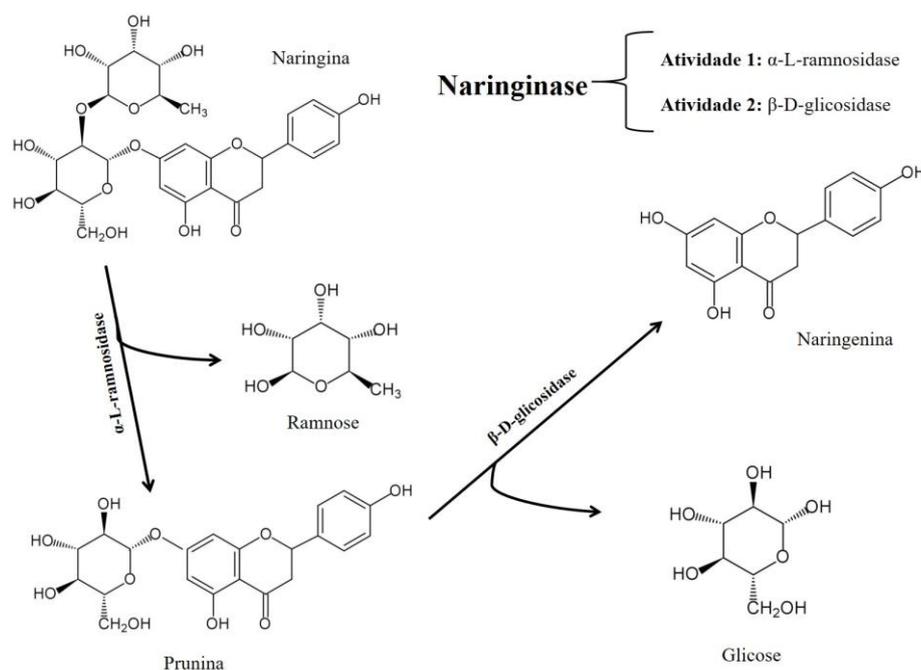


Figura 3. Mecanismo de hidrólise da naringina pelo complexo enzimático naringinase (atividade de α -L-ramnosidase e β -D-glicosidase). Araraquara, 2018.

A α -L-ramnosidase (Figura 4) oferece potencialidade de aplicação na produção de ramnose, que por sua vez apresenta grande possibilidade de utilização como componente fármaco e cosmético de ação antienvhecimento (13); além da prunina, que apresenta ação anti-inflamatória e pode ser utilizada como alternativa à sacarose para diabéticos. Já a naringenina apresenta ação antioxidante, antiúlcera e anti-inflamatória, além de propriedades neuroprotetoras capazes de prevenir doenças neurodegenerativas (14,15).

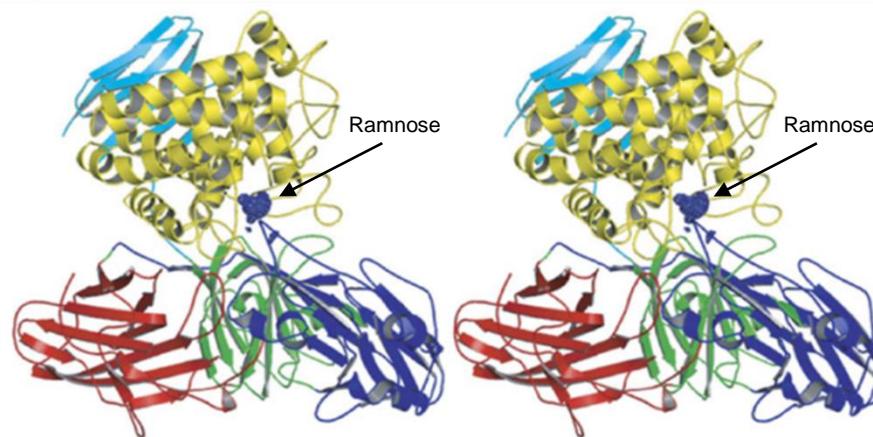


Figura 4. Estrutura 3D da atividade de α -ramnosidase em complexo com a ramnose (16,17).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Estrutura morfológica da laranja

Caracterizada por ser um fruto cítrico, a laranja é composta por epicarpo, mesocarpo, endocarpo, columela e sementes (Figura 5). O epicarpo, também conhecido por flavedo, é a porção externa com coloração. Já o mesocarpo, ou albedo, é caracterizado por ser a parte interna de coloração branca e textura esponjosa. Logo abaixo do mesocarpo, se encontra o endocarpo – parte comestível – constituído pelos gomos, vesículas e membranas (18,19).

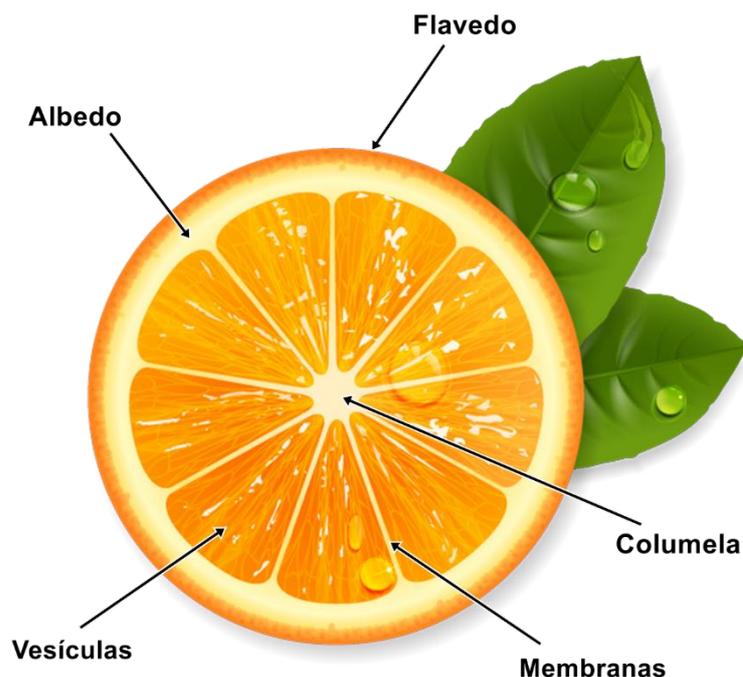


Figura 5. Morfologia geral da laranja. Araraquara, 2018.

2.2 Produção e processamento industrial de laranja

O Brasil detém atualmente mais da metade da produção mundial de suco de laranja (53 %), exporta 98 % da sua produção e o cultivo de laranja está presente em todos os estados brasileiros. A laranja é a fruta mais cultivada no país, ultrapassando a faixa dos 800 mil hectares, chegando a ocupar uma área 20 vezes maior do que os pomares de maçã e quase o dobro das terras dedicadas ao cultivo de banana em nosso país (20).

Os destinos da produção mundial, em geral, se compõem entre o processamento industrial (produção de suco), consumo doméstico de fruta *in natura* e exportação de fruta *in natura*. Já o Brasil destina 70 % de sua produção para processamento industrial, sendo que 86 % do que é produzido no Estado de São Paulo e no Triângulo Mineiro é destinado a esse

mercado (20).

O resíduo oriundo do processamento industrial do suco de laranja representa cerca de 50 % do peso total do fruto, sendo apontado como um subproduto com potencial de extração de compostos biologicamente ativos e de alto valor agregado que ainda é pouco explorado. Essa elevada quantidade de resíduo, em sua maioria, é utilizada como matéria prima complementar para a alimentação animal ou então é queimada. Visando a melhoria do gerenciamento desses resíduos, estudos vem sendo desenvolvidos para a implementação de novos processos de recuperação, possibilitando o melhoramento da produção de compostos secundários (pectina, óleo essencial, etanol, entre outros) e até obtenção de enzimas e extração de compostos bioativos de alto valor agregado (21–23).

2.3 Compostos antioxidantes

Os compostos fenólicos apresentam uma variedade de propriedades biológicas (antiarteriogênica, antialérgica, anti-inflamatória, antimicrobiana, antitrombótica, cardioprotetora e vasodilatadora), no entanto o destaque tem sido atribuído à sua ação antioxidante (24,25).

Os flavonoides apresentam atividade antioxidante efetiva devido à suas propriedades sequestrantes dos radicais livres. Esse processo ocorre por meio da ação quelante do oxigênio triplete e singlete e também por meio da decomposição dos peróxidos. Essa propriedade é direcionada a ação sobre o radical hidroxil e o ânion superóxido, já que estão envolvidas na inicialização da peroxidação lipídica e são altamente reativos (5).

Esses compostos possuem a capacidade de proteger as células contra *stress* oxidativo que, por sua vez, pode causar envelhecimento celular e doenças degenerativas (câncer, diabetes, doenças cardiovasculares, etc.) (18).

2.4 Extração de flavanonas da laranja

Existem diferentes métodos para realização da extração dos compostos antioxidantes em vegetais (substâncias bioativas). Dentre eles, é possível destacar os métodos de extração que utilizam solventes (como água, etanol, metanol e éter). Analisando quimicamente, não é possível eleger metodologia mais eficiente para a extração desses determinados compostos, já que sofrem influência de diferentes fatores como natureza do vegetal, solvente empregado, tamanho da partícula, tempo e temperatura de extração (24).

Justificou-se então o emprego de análises comparativas entre cinco métodos propostos para avaliar as melhores condições de extração, garantindo menor custo, tempo de extração e maior viabilidade dos compostos visados.

2.5 Hidrólise enzimática da naringina

A naringina (4,5,7-trihidroxi-7-rhamnoglucosil-flavanona) é um flavonoide disponível em diversas espécies de *Citrus sp.*, chegando a representar 10 % do peso seco no *grapefruits*, sendo o responsável principal pelo sabor amargo em frutas cítricas. Estudos apontam efeitos benéficos relacionados ao consumo da naringina: inibição da biossíntese de eicosanoides (processos inflamatórios), prevenção à formação de placas de

gordura e tecido fibroso nas paredes internas das artérias (aterosclerótica), proteção contra a oxidação da LDL-colesterol (*Low Density Lipoprotein*), prevenção da agregação plaquetária (efeito antitrombótico), além de promover o relaxamento do músculo liso (efeito anti-hipertensivo) e ter efeito antioxidante (26).

Uma alternativa amplamente utilizada para diminuição do amargor em vários produtos alimentícios é a utilização dos métodos enzimáticos.

As enzimas são catalisadores biológicos com grande aplicação industrial, principalmente por apresentarem boa eficiência e seletividade. Podem oferecer maiores rendimentos durante a reação, elevados níveis de pureza e mínima formação de subprodutos quando comparado com processos não enzimáticos (27).

A naringinase é responsável, especificamente, pela hidrólise da naringina. Trata-se de um complexo enzimático composto por atividade de α -L-ramnosidase (EC 3.2.1.40) e β -D-glicosidase (EC 3.2.1.21), gerando produtos como ramnose, prunina (4'-5,7'-trihydroxyflavonone-7-glucoside), naringenina (4,5,7-trihydroxyflavonone) e glicose, consecutivamente (Figura 3). Além das aplicações citadas, a naringinase também é largamente utilizada na preparação de fármacos por meio da desglicosilação de novos antibióticos e da transformação de esteróides e para o melhoramento na qualidade de produtos alimentícios (aumento de rendimento de óleos essenciais, remoção do amargor e clarificação de sucos processados) (8,28).

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Extrair e caracterizar flavanonas do extrato do albedo de Laranja-da-terra (*Citrus aurantium*) por diferentes métodos e observar sua eficiência com relação à extração. Partindo dos extratos obtidos pretende-se utilizar a enzima naringinase comercial e α -L-ramnosidase parcialmente purificada para a biotransformação das flavanonas disponíveis.

3.2 Específicos

- ✓ Avaliar diferentes métodos de extração de flavanonas do albedo de Laranja-da-terra (*Citrus aurantium*);
- ✓ Caracterizar por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-DAD) os extratos obtidos;
- ✓ Purificar parcialmente a enzima naringinase comercial a fim de se obter a atividade de α -L-ramnosidase;
- ✓ Hidrolisar enzimaticamente os diferentes extratos;
- ✓ Caracterizar por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-DAD) os extratos após hidrólises enzimáticas.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Nesse estudo utilizou-se a Laranja-da-terra (*Citrus aurantium*) como matéria-prima para a extração e caracterização das flavanonas, além da aplicação da enzima naringinase comercial de *Penicillium decumbens* (Sigma-Aldrich®) para obtenção de prunina e naringenina. Também foram usados os substratos sintéticos p-nitrofenil- α -L-ramnosídeo (p-NF α R) e p-nitrofenil- β -D-glicosídeo (p-NF β G) (Sigma-Aldrich®). Todos os demais reagentes utilizados foram de grau analítico.

4.1 Preparo da Laranja-da-terra para extração de flavanonas

A Laranja-da-terra (*Citrus aurantium*) foi colhida manualmente em uma propriedade rural chamada chácara Nosso Canto, localizada no município de São Carlos, interior de São Paulo, Brasil (21°57'26.2"S e 47°55'22.8"W, 842 m de altitude).

Após a colheita os frutos foram levados ao laboratório de Enzimologia do Departamento de Alimentos e Nutrição da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP de Araraquara. Todos os frutos passaram pelo processo de inspeção, higienização e sanitização (solução de hipoclorito de sódio 200 ppm por 10 minutos) e de remoção parcial do epicarpo (flavedo), por meio de um processo de raspagem com o objetivo de retirar grande parte do flavedo e outras substâncias interferentes (clorofila, óleos essenciais, sujidades, etc.) (Figura 6).



Figura 6. Preparo da Laranja-da-terra para extração de flavanonas. Araraquara, 2018.

Após o tratamento primário, os albedos foram cortados e homogeneizados. As partes restantes do fruto foram descartadas, e os albedos foram armazenados em sacos plásticos e mantidos congelados (- 18°C) até o momento da análise.

4.2 Extração das flavanonas do albedo da Laranja-da-terra

Para a realização da extração e identificação dos compostos de interesse foi necessária a utilização de solventes de diferentes polaridades pois o rendimento da extração depende basicamente do tipo de solvente, e das características intrínsecas e extrínsecas relacionadas ao fruto. Após a revisão bibliográfica foi possível definir cinco métodos de extração que utilizam etanol e água como principais solventes. A principal justificativa da utilização desses solventes foi devido ao seu grande emprego para extração de compostos antioxidantes e principalmente por razões técnico-ambientais (não apresentam riscos ambientais e não necessitam de grandes processos de purificação) e grande disponibilidade (solventes de baixo custo) (24).

4.2.1 Método de extração por trituração em água

Foi realizada a extração de flavonoides seguindo a proporção de 15 g de albedo para 150 mL de água ultra purificada (1:10; m/v), seguida de trituração em liquidificador convencional por 1 minuto. Após a trituração, a mistura foi colocada em refrigeração (6 °C) durante 24 horas. Ao final do tempo de repouso, a suspensão obtida foi filtrada a vácuo em papel filtro e o extrato (sobrenadante) foi armazenado em refrigeração (6 °C) para análises posteriores. O método descrito está baseado no fenômeno de lixiviação, onde o solvente em contato com o soluto se difunde, ocasionando a transferência do soluto para o solvente (18,29).

4.2.2 Método de extração por trituração hidroetanólica

Foi realizada a extração de flavonoides seguindo a proporção de 15 g de albedo para 150 mL de solução hidroetanólica 70 % (1:10; m/v), seguida de trituração em liquidificador convencional por 1 minuto. Após a trituração, a mistura foi exposta a refrigeração (6 °C) durante 24 horas. No término do tempo de repouso, a suspensão obtida foi filtrada a vácuo em papel filtro e o sobrenadante foi armazenado em refrigeração (6 °C) para análises posteriores. Esse método foi adaptado de Spagolla et al. (30).

4.2.3 Método Hidrotérmico

Foi realizada a extração de flavonoides seguindo a proporção de 10 g de albedo para 100 mL de água ultra purificada (1:10; m/v), seguida de trituração em liquidificador convencional por 1 minuto. Após a trituração, a mistura foi transferida para Erlenmeyers, que foram devidamente vedados com filme

plástico, e aquecidos em banho maria estabilizado a 65 °C por 3 horas. Após o término do processo de extração, os Erlenmeyers foram resfriados por 20 minutos e as suspensões foram filtradas a vácuo em papel filtro e o sobrenadante foi armazenado em refrigeração (6 °C) para análises posteriores. A metodologia foi adaptada de Cheigh et al. (31).

4.2.4 Método de Prensa

Foi realizada a extração de flavonoides seguindo a proporção de 30 g de albedo para 300 mL de água ultra purificada (1:10; m/v). O albedo foi imerso em água ultra purificada por 24 horas sob refrigeração (6 °C). Após o período de imersão, a mistura foi prensada em prensa manual (Figura 7) e o extrato obtido foi armazenado em refrigeração (6 °C) para análises posteriores. Esse método foi adaptado de El-Nawaki (29).



Figura 7. Desenvolvimento de prensa artesanal para extração de segundo metodologia descrita no item 4.2.4. Araraquara, 2018.

4.2.5 Método de Soxhlet (Alcólico)

Foi realizada a extração de flavonoides por meio do extrator Soxhlet (Figura 8), seguindo a proporção de 25 g de albedo para 250 mL de solução etanol PA 99,5 % (1:10; m/v). A mistura foi triturada em liquidificador convencional por 1 minuto. Após a trituração, a mistura foi filtrada em papel e o resíduo sólido foi seco em estufa (50 °C) por 3 horas. O sobrenadante foi reservado e utilizado durante o processo de extração juntamente com o solvente. O resíduo sólido seco foi acondicionado em cartuchos e levado ao extrator de Soxhlet (aproximadamente 70 °C) por um período de 3 horas. No término do processo de extração, foi recolhido o extrato líquido, que foi armazenado em refrigeração (6 °C) para análises posteriores. Esse método foi adaptado de Davis (32).

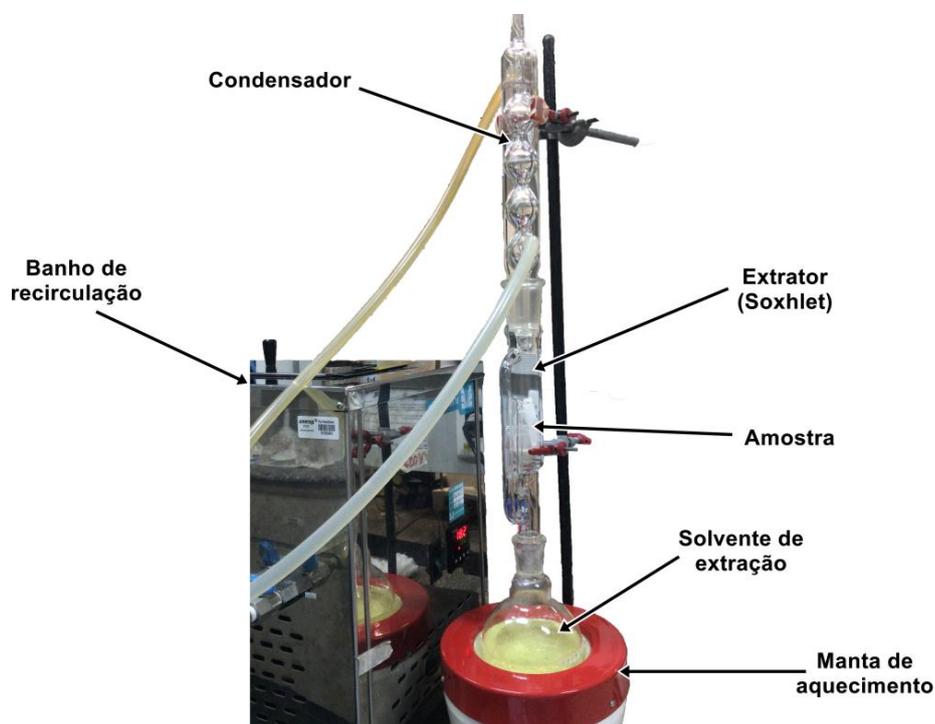


Figura 8. Sistema de extração de flavonoides pelo método de Soxhlet segundo item 4.2.5. Araraquara, 2018.

4.3 Determinações analíticas

A eficiência dos cinco métodos de extração para flavanonas foi acompanhada através dos métodos descritos abaixo:

4.3.1 Determinação de compostos fenólicos totais

Os fenólicos totais foram quantificados pelo método de Folin-Ciocalteu (1997) utilizando ácido gálico como padrão externo por meio de espectrofotometria com comprimento de onda de 700 nm (33,34). Para efeito de cálculo foi construída uma curva analítica de ácido gálico (0,088 – 0,265 mM) da qual obteve-se um $\epsilon_{700\text{nm}} = 0,0365 (\mu\text{g ácido gálico}/0,5 \text{ mL})^{-1}$.

4.3.2 Determinação de flavanonas totais

As flavanonas foram quantificadas segundo o método de Davis (1947). Uma alíquota de 40 μL da amostra foi homogeneizada em 2 mL dietilenoglicol 90 % (v/v). Em seguida foi acrescentado 40 μL de NaOH 4 N, dando início à reação com duração de 5 minutos (35). A quantificação foi realizada por espectrofotometria com comprimento de onda de 420 nm. Para os cálculos foi construída uma curva analítica de naringina (0,515 – 1,55 mM) como padrão de analítico. Após a regressão linear obteve-se um $\epsilon_{420\text{nm}} = 0,0233 (\mu\text{g naringina}/40 \mu\text{L})^{-1}$.

4.3.3 Determinação de açúcares redutores totais

A concentração de açúcares redutores foi determinada pelo método de Miller (1959), que consiste em uma reação colorimétrica de oxirredução do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) na presença de açúcares redutores (Figura 9)

(36). A quantificação ocorreu por meio da elaboração da curva analítica utilizando a glicose (1,679 – 8,393 mM) como padrão externo. Obteve-se um $\epsilon_{540\text{nm}} = 0,422 (\mu\text{mol}/0,25 \text{ mL})^{-1}$ ou um ϵ (molar) de $105,5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

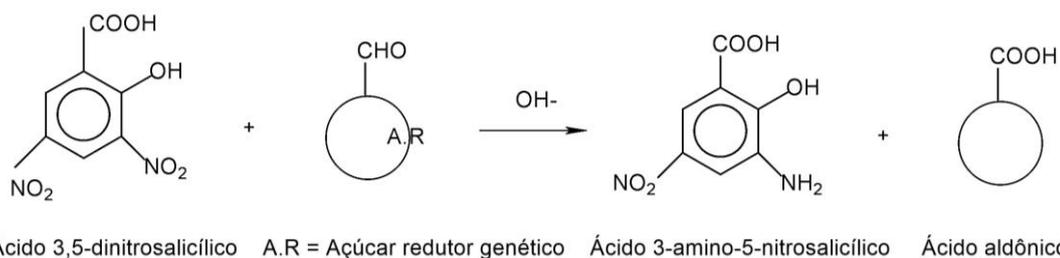


Figura 9. Princípio químico da redução do ácido 3,5-dinitrosalicílico na presença de açúcares redutores (36).

4.3.4 Determinação do perfil e quantificação de flavanonas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

A determinação do perfil cromatográfico de compostos fenólicos foi realizada por meio da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). O sistema cromatográfico consiste em uma bomba específica com gerenciador de solventes quaternário, que é comandado pela interface e pelo módulo de degaseificação. O equipamento utilizado foi da marca Waters®, modelo Acquity Arc com injetor automático, detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD), pertencente ao Departamento de Alimentos e Nutrição na Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Unesp, Araraquara.

A separação cromatográfica foi realizada em uma coluna da Thermo C18 – ODS – Hypersil de 250 x 4 mm e tamanho de partícula de 5 μ . As fases móveis utilizadas foram: (A) água:ácido acético 0,5% (v/v) e (B) acetonitrila. O sistema de gradiente iniciou com 5% de acetonitrila, passando para 60% aos 15 minutos, mantendo-se nessa condição até os 18 minutos, passando

imediatamente para 100% de acetonitrila mantidos até os 23 min e os 5 min finais com 5% de solvente orgânico para reequilíbrio. O fluxo foi de 0,8 mL/min, com volume de injeção de 20 μ L, sendo os compostos detectados em UV a 280 nm. A quantificação foi feita por curva de calibração externa construídas a partir das áreas dos picos cromatográficos dos compostos narirutina, naringina, hesperidina, prunina, naringenina e hesperitina (Figura 10). O método foi adaptado de Kwang-Il Park et al. e Cindy Hunlun et al. (37,38).

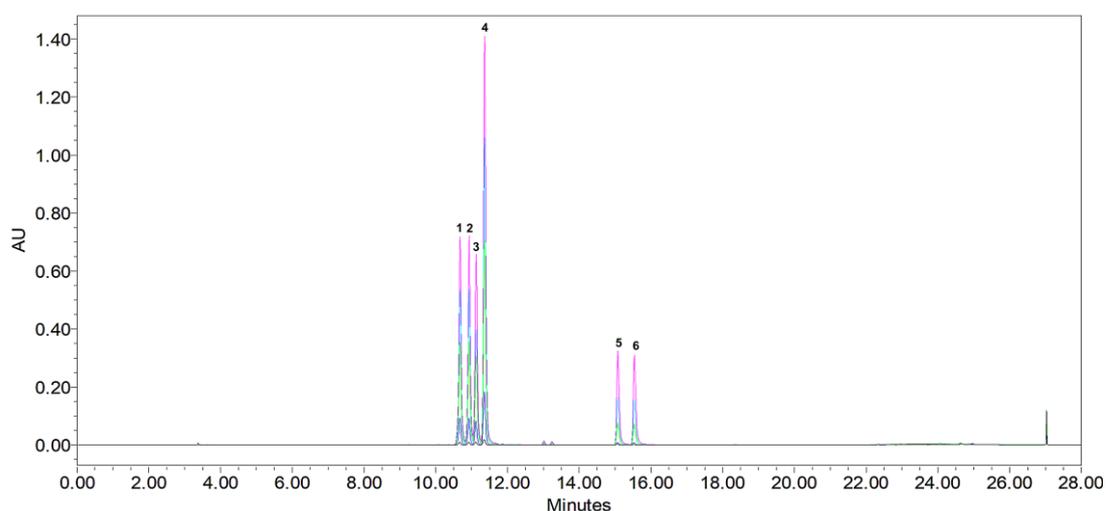


Figura 10. Cromatograma dos padrões analíticos (CLAE) utilizada para quantificação dos compostos fenólicos nos diferentes extratos. Os picos correspondentes aos compostos são: (1) Narirutina; (2) Naringina; (3) Hesperidina; (4) Prunina; (5) Naringenina; (6) Hesperitina. Araraquara, 2018.

4.3.5 Determinação de umidade

Para a determinação da umidade do albedo da Laranja-da-terra foi utilizado o método por infravermelho. Utilizaram-se aproximadamente 3 g de amostra triturada, acondicionada sobre a bandeja de alumínio da Balança de infravermelho (MA 35 - Sartorius), em que permaneceu submetida a raios infravermelhos com temperatura constante de 105 °C até estabilização do

peso. As análises foram realizadas em triplicada e os resultados expressos em porcentagem.

4.3.6 Cálculo de rendimento de extração

Os rendimentos das extrações foram calculados conforme Equação 1.

$$\text{Rendimento (\%)} = \frac{\left(\frac{\text{Concentração do composto } \left(\frac{\text{mg}}{\text{mL}} \right) \times \text{volume de solvente (mL)}}{1000} \right)}{\text{massa úmida ou massa seca do albedo (g)}} \times 100 \quad (1)$$

Equação 1. Cálculo de rendimento de extração (%)

4.4 Ensaios enzimáticos com a Naringinase®

A enzima Naringinase Comercial utilizada é de origem fúngica (*Penicillium decumbens*) e da marca Sigma-Aldrich®. A fabricante indica uma atividade Naringinase de ≥ 300 unidades/g sólida em seu produto.

A atividade enzimática da naringinase comercial foi determinada por meio das seguintes técnicas analíticas descritas abaixo.

4.4.1 Determinação da atividade por dosagem de açúcar redutor

A atividade enzimática de naringinase foi determinada por meio da quantificação de açúcares redutores liberados (ramnose e glicose) usando o DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico), conforme descrito por Miller (36). Foi utilizado como substrato naringina (Sigma-Aldrich) (0,5 % m/v ou 8,6 mM) em tampão acetato de sódio 0,1 M, pH 4,5 e temperatura de atividade de 50 °C. Uma unidade enzimática (U) foi definida como a concentração de enzima necessária para liberar 1 μmol de açúcar redutor por minuto nas condições de ensaio. Já a atividade específica da enzima foi definida como a quantidade de

μmol de produto liberados por minuto por miligrama de proteína ($\text{U} \cdot \text{mg prot}^{-1}$). Para a análise dos resultados foi construída curva analítica de glicose (açúcar redutor) possibilitando a obtenção do coeficiente de absorvidade molar (ϵ) de $0,422 (\mu\text{mol}/0,25 \text{ mL})^{-1}$, ou ϵ (molar) de $105,5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

4.4.2 Determinação da atividade α -L-ramnosidase e β -D-glicosidase

As atividades α -L-ramnosidase e β -D-glicosidase foram determinadas utilizando os substratos sintéticos *p*-nitrofenil- α -L-ramnosídeo[®] (p -NF α R) e *p*-nitrofenil- β -D-glicosídeo[®] (p -NF β G) conforme Romero et al. (39) com algumas modificações. O ensaio enzimático foi realizado com 0,7 mL de tampão acetato de sódio 0,1 M pH 4,5 contendo 0,05 mL de p -NF α R e/ou p -NF β G (0,5 mM) e 0,05 mL da enzima. A mistura foi incubada por 5 minutos em agitação a 50 °C, seguindo de resfriamento em banho de gelo e adição de uma solução de 0,8 mL de Na_2CO_3 1 M para interromper a reação. A leitura da absorbância foi realizada a 405 nm. Foi considerado uma unidade (U) de atividade de ramnosidase e/ou glicosidase como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μmol de *p*-nitrofenol por minuto sob as condições descritas conforme Galán (2016) (40). Para quantificação foi realizada a construção de uma curva analítica com diferentes concentrações de *p*-nitrofenol (0,003 mM – 0,049 mM) para obtenção do coeficiente de extinção molar em $\epsilon_{405\text{nm}} = 17013 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. O cálculo da atividade enzimática foi calculado conforme Equação 2 (41).

$$U = \frac{\sum \text{Absorbância} \times 1000 \times \text{Volume total de ensaio (mL)}}{\epsilon \text{ molar} \times \sum \text{tempo (min)} \times d \text{ (cm)} \times \text{Volume de enzima (mL)}} \quad (2)$$

Equação 2. Cálculo de atividade enzimática (U).

A atividade específica da enzima comercial (Tabela 4) foi calculada a partir da razão entre a atividade (U/mL) e quantidade de proteína dosada por Bradford (mg/mL) segundo o item 4.5.1.

4.5 Purificação parcial da enzima comercial

Através de estudos anteriores realizados no laboratório de Enzimologia é de conhecimento que a enzima Naringinase comercial de *Penicillium decumbens* (Sigma-Aldrich®) apresenta duas atividades distintas: α -L-ramnosidase e β -D-glicosidase. Por meio do uso da Cromatografia de troca iônica – DEAE-Sephacel pelo sistema de “BATCH” foi possível separar parcialmente o complexo proteico em suas duas atividades. O processo de purificação parcial foi realizado repetidas vezes até obtenção da quantidade da enzima α -L-ramnosidase necessária para os experimentos. O sistema “BATCH” foi realizado seguindo exatamente a metodologia descrita e executada por Galán (40). Para a purificação foram utilizadas resinas DEAE-Sephacel equilibradas em tampão fosfato de sódio 50 mM em pH 6,8. Foram pesados 20 g da resina DEAE-Sephacel (GE Healthcare) seca. A resina foi lavada exaustivamente com tampão fosfato de sódio 50 mM em pH 6,8 para garantir o carregamento e deixá-la pronta para o uso. Após a lavagem, a resina foi colocada em contato com 100 mL da solução enzimática de naringinase comercial (1 mg/mL) para que ocorresse a interação iônica resina-enzima. O tempo de interação foi de 60 minutos em agitador tipo “roller”.

Após o tempo de contato da solução de naringinase comercial com a resina foram realizadas lavagens com soluções de cloreto de sódio (75 mM e

200 mM) para a eluição das frações α -L-ramnosidase e β -D-glicosidase, respectivamente. Em seguida as amostras foram dialisadas contra tampão acetado de sódio 0,1 M pH 4,5 para a remoção do sal. Todo o procedimento de purificação parcial foi acompanhado por determinação de atividade (item 4.4.2), quantificação de proteína (item 4.5.1) e SDS-PAGE.

4.5.1 Determinação de proteínas totais

A quantificação de proteínas foi realizada seguindo a metodologia descrita por Bradford (40,42) utilizando como padrão a soro albumina bovina (SBA). Para o cálculo da concentração foi construída uma curva analítica de BSA (0,008 – 0,024 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) e o coeficiente de absorvidade obtido foi de $\epsilon_{595\text{nm}} = 17,150 \text{ (mg/mL)}^{-1}$.

4.6 Hidrólise enzimática dos extratos obtidos conforme item 4.2

Uma vez conhecendo os perfis cromatográficos das flavanonas presentes nos extratos obtidos a partir do albedo da Laranja-da-terra, foi realizada a hidrólise utilizando a enzima naringinase comercial e a ramnosidase oriunda da purificação parcial conforme o item 4.5.

4.6.1 Enzima comercial sem purificação

A enzima naringinase comercial foi ressuspensa em tampão acetato de sódio 0,1M pH 4,5 seguindo a proporção 1:1 (m/v). Em seguida o pH dos extratos obtidos com as diferentes metodologias de extração foi corrigido para 4,5. O ensaio enzimático foi constituído de 12 mL de cada extrato e 0,3 mL da enzima naringinase comercial (1 mg/mL) sob agitação suave e temperatura

controlada de 50 °C. Alíquotas do ensaio enzimático foram retiradas após uma e três horas de reação e, para inativação das enzimas, as alíquotas foram submetidas a aquecimento de 100°C por 5 minutos.

4.6.2 Enzima ramnosidase purificada parcialmente

A enzima ramnosidase purificada foi obtida conforme processo descrito no item 4.5. Após o processo de purificação a enzima α -L-Ramnosidase foi liofilizada para obter uma solução mais concentrada e em seguida diluída em tampão para entregar atividade aproximada a da enzima comercial. O ensaio enzimático foi constituído de 12 mL de cada extrato e 0,3 mL da enzima α -L-Ramnosidase sob agitação suave e temperatura controlada de 50 °C. Alíquotas do ensaio enzimático foram retiradas após uma e três horas de reação e, para inativação das enzimas, as alíquotas foram submetidas a aquecimento de 100°C por 5 minutos.

4.7 Quantificação por CLAE de flavanonas após hidrólise enzimática

Os produtos obtidos nos itens 4.6.1 e 4.6.2 foram analisados por CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência) seguindo metodologia citada no item 4.3.4.

4.8 SDS-PAGE da enzima naringinase parcialmente purificada

A amostra de enzima parcialmente purificada foi submetida à eletroforese em condições desnaturantes, em gel de poliacrilamida a 10 %, de acordo com o método de Laemmli (43). Essa análise teve como objetivo de elucidar o perfil proteico da naringinase comercial e das enzimas ramnosidase

e glicosidade parcialmente purificadas, identificando as diferenças em relação à enzima que não passou pelo processo de purificação. O gel foi corado com nitrato de prata, conforme Heukeshoven e Dernick (44) e Blum et al. (45).

4.9 Análise estatística

Foi realizada a estatística descritiva para análise básica do comportamento dos dados. Para avaliação da normalidade foi utilizado o teste de *Shapiro-Wilk* – que confirmou que todos os dados apresentam distribuição normal – e para avaliação da homocedasticidade foi utilizado o teste de Levene. Para a comparação das médias entre os tratamentos foi utilizada a ANOVA *one way* seguida do teste de *Tukey* – para dados homocedásticos – e a ANOVA com correção de *Welch* seguida do teste de *Games-Howell* – para dados heterocedásticos. Ambas as análises foram realizadas ao nível de significância de 5 % ($\alpha = 0,05$), através do programa estatístico *IBM SPSS Statistics 24*®.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após a realização das diferentes extrações (Figura 11), todas realizadas em triplicata independentes, foi possível realizar a determinação e quantificação dos compostos desejados por meio dos métodos colorimétricos e cromatográficos dos extratos obtidos (item 4.3).



Figura 11. Extratos do albedo da Laranja-da-terra provenientes das diferentes extrações de acordo com as metodologias descritas nos itens 4.2.1-5. Araraquara, 2018.

5.1 Caracterização inicial dos extratos

5.1.1 Análises espectrofotométricas

Na Tabela 1 estão descritos os resultados obtidos para as concentrações de açúcares redutores, flavanonas totais e fenólicos totais através das metodologias descritas nos itens 4.3.1-3.

Tabela 1. Média e desvio-padrão da concentração de açúcares redutores, flavanonas totais e fenólicos totais para cada metodologia de extração (tratamento) por meio de métodos colorimétricos. Araraquara, 2018.

Tratamento	Açúcares redutores (mg/mL)	Flavanonas totais (mg/mL)	Fenólicos totais (mg/mL)
Extração por trituração em água	3,78 ± 0,48 ^a	0,99 ± 0,06 ^b	0,63 ± 0,09 ^b
Extração por trituração hidroetanólica (70 %)	3,28 ± 0,42 ^a	1,19 ± 0,27 ^{ab}	0,63 ± 0,09 ^b
Extração hidrotérmica	3,31 ± 0,41 ^a	1,30 ± 0,09 ^{ab}	0,62 ± 0,04 ^b
Extração por prensagem	3,59 ± 0,15 ^a	1,09 ± 0,07 ^b	0,67 ± 0,03 ^{ab}
Extração alcoólica (Soxhlet)	4,02 ± 0,37 ^a	1,58 ± 0,25 ^a	0,81 ± 0,02 ^a

Médias com letras minúsculas diferentes na mesma coluna diferem significativamente entre si ($p \leq 0,05$) no teste de Tukey e Games-Howell (para dados heterocedásticos).

Os métodos colorimétricos são baseados na medida quantitativa de absorção da luz pelas soluções. A concentração das substâncias de interesse pode ser determinada devido à mesma ser diretamente proporcional à quantidade de luz absorvida. Partindo desse princípio e observando os resultados obtidos na Tabela 1, foi possível perceber que não houve diferença significativa entre os cinco métodos para a extração de açúcares redutores.

Já com relação à determinação de flavanonas totais, três dos métodos apresentaram melhor extração e ausência de diferença significativa (Extração por Soxhlet (alcoólica), Extração por trituração hidroetanólica (70 %) e Extração hidrotérmica). Para fenólicos totais, os métodos que se apresentaram mais eficientes foram a Extração por prensagem e a Extração por Soxhlet (alcoólica), não apresentando diferença significativa entre os dois.

Apesar dos métodos que utilizam etanol como solvente terem apresentados os melhores valores é importante salientar que, o solvente em

questão, possui maior valor agregado quando comparado com a água. A utilização do etanol pode, conseqüentemente, encarecer significativamente o processo e exigir etapas de purificação/retirada do solvente, o que o tornaria menos vantajoso que a água. Devido a sua natureza polar, a água, acaba se tornando um solvente versátil e eficiente para extração de produtos naturais solúveis em água (3).

5.1.2 Análises cromatográficas

Para a quantificação dos compostos por CLAE-DAD foram construídas e utilizadas curvas analíticas para cada uma das seis flavanonas de interesse, possíveis de serem encontradas no extrato (narirutina, naringina, hesperidina, prunina, naringenina e hesperitina) (Figura 12).

Os espectros de absorção dos compostos padrões obtidos por DAD (Figura 13) permitiram realizar a confirmação em função da classe química (flavanonas) dos compostos de interesse. Isso ocorreu devido as flavanonas possuírem bandas de absorção características na faixa de UV/Vis entre (220-330 nm).

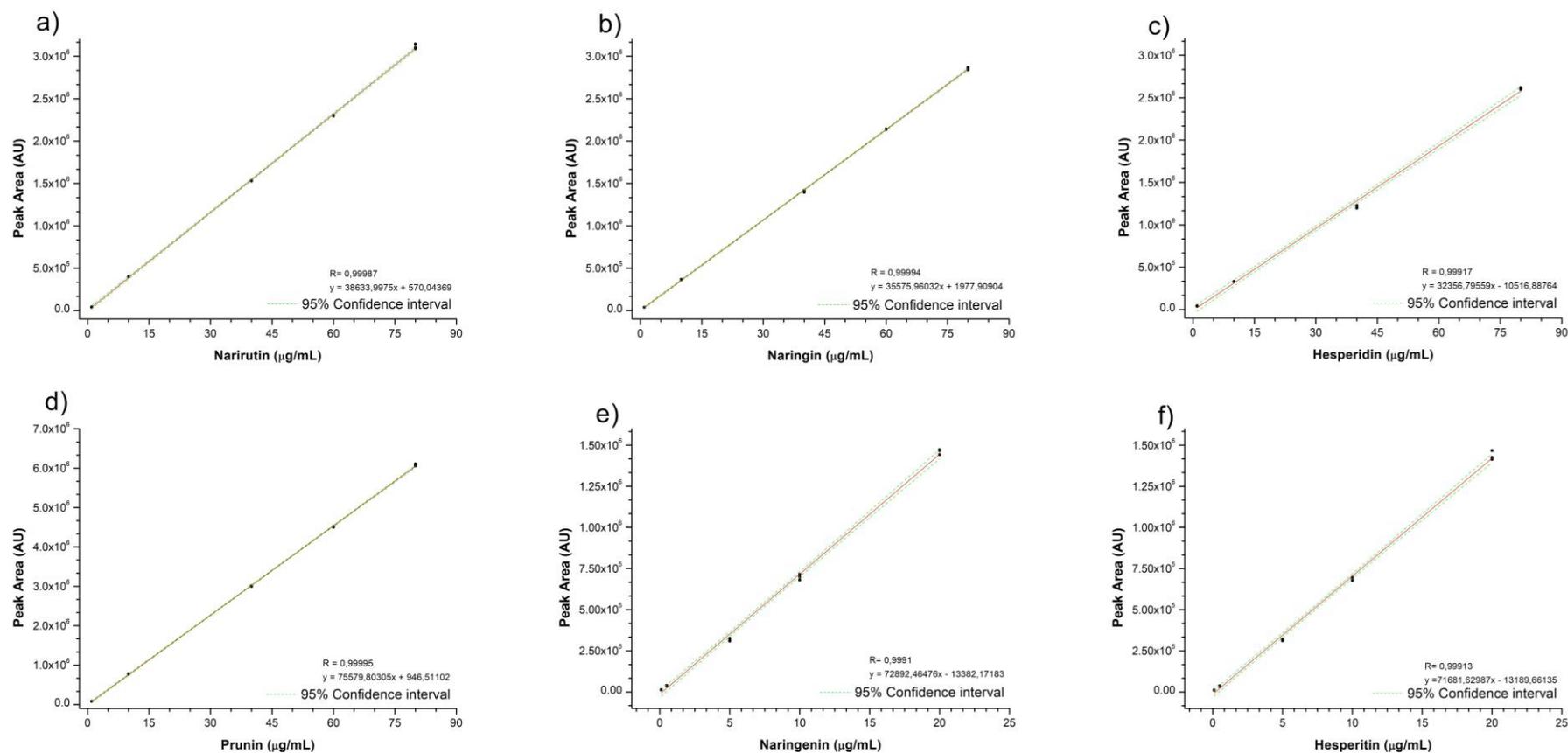


Figura 12. Curvas analíticas por CLAE das flavanonas: a) Narirutina (1,0 - 80 µg/mL); b) Naringina (1,0 - 80 µg/mL); c) Hesperidina (1,0 - 80 µg/mL); d) Prunina (1,0 - 80 µg/mL); e) Naringenina (0,1 - 20 µg/mL); f) Hesperitina (0,1 - 20 µg/mL). Araraquara, 2018.

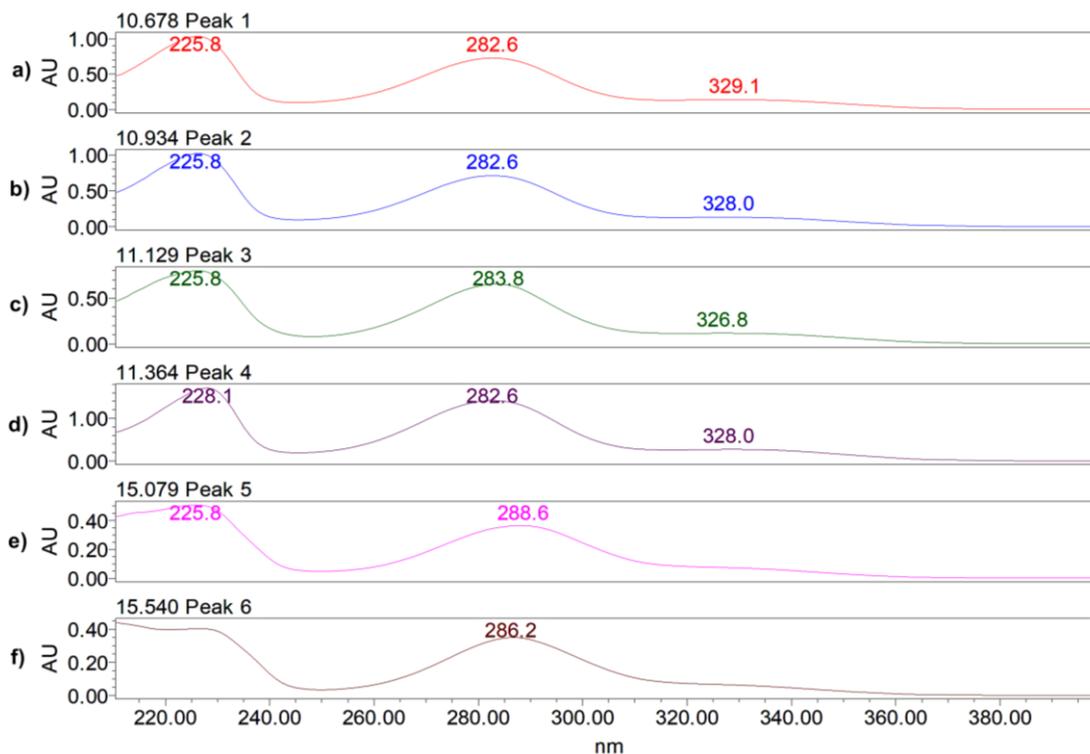


Figura 13. Espectros de absorção típicos da classe das flavanonas no UV/Vis: a) Narirutina; b) Naringina; c) Hesperidina; d) Prunina; e) Naringenina; f) Hesperitina. Araraquara, 2018.

Na Tabela 2 estão descritas as concentrações das duas flavanonas encontradas no albedo da Laranja-da-terra (naringina e prunina), extraídas através dos diferentes tratamentos e quantificadas através da Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-DAD) descrita no item 4.3.4.

Tabela 2. Média e desvio-padrão da concentração de naringina e prunina para cada metodologia de extração por meio de CLAE. Araraquara, 2018.

Tratamento	NARINGINA (mg/mL)	PRUNINA (mg/mL)
Extração por trituração em água	0,75 ± 0,04 ^b	0,43 ± 0,07 ^b
Extração por trituração hidroetanólica (70%)	0,91 ± 0,25 ^b	0,39 ± 0,10 ^b
Extração hidrotérmica	0,84 ± 0,09 ^b	0,38 ± 0,03 ^b
Extração por prensa	0,78 ± 0,03 ^b	0,35 ± 0,01 ^b
Extração alcoólica (Soxhlet)	1,49 ± 0,19 ^a	0,70 ± 0,11 ^a

Médias com letras minúsculas diferentes na mesma coluna diferem significativamente entre si ($p \leq 0,05$) no teste de Tukey e Games-Howell (para dados heterocedásticos).

Para a extração dos dois compostos, presentes e identificados no albedo da Laranja-da-terra, houve diferença significativa entre os diferentes tratamentos aplicados. No entanto, quando comparados os métodos que utilizam água como solvente, apesar de não apresentarem os melhores valores, não tiveram diferença significativa entre eles. Portanto, nestes casos, seria possível definir os melhores métodos com relação a sua viabilidade industrial e custos de aplicação. A utilização da água como solvente principal, aliado a um dos métodos descritos que não exigiria amplas mudanças estruturais nas grandes processadoras de alimentos, seria uma opção de fácil aplicação industrial; como por exemplo a utilização da prensagem aliada – ou não – à trituração.

O rendimento das extrações (Tabela 3) seguiu o mesmo comportamento descrito anteriormente e foram calculados conforme item 4.3.6 e uma umidade média do albedo de $71,65 \pm 1,17\%$.

Tabela 3. Porcentagem de rendimento da extração de naringina e prunina para cada metodologia de extração. Araraquara, 2018.

Tratamento	Naringina		Prunina	
	Massa úmida (%)	Massa seca (%)	Massa úmida (%)	Massa seca (%)
Extração por trituração em água	0,75	2,65	0,43	1,52
Extração por trituração hidroetanólico (70%)	0,91	3,21	0,39	1,38
Extração hidrotérmica	0,84	2,96	0,38	1,34
Extração por prensa	0,78	2,75	0,35	1,23
Extração Hidroalcoólica (Soxhlet)	1,49	5,26	0,70	2,47

A Figura 14 apresenta um fluxograma geral do processo de produção de suco cítrico, com ênfase nas principais etapas e produtos obtidos, possibilitando a verificação da pré-existência dos processos de prensagem e trituração na planta industrial das processadoras de laranja (46).

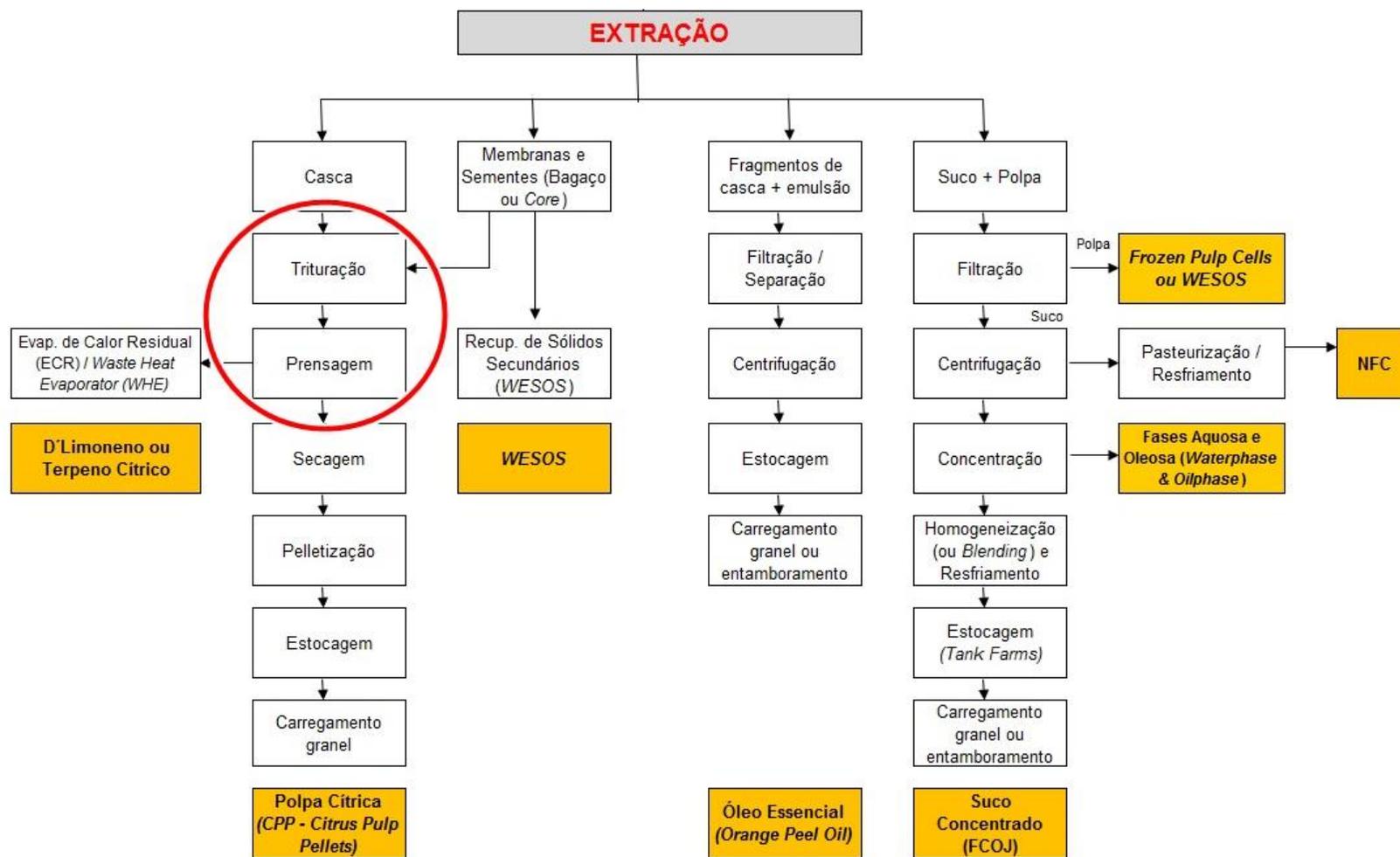


Figura 14. Fluxograma industrial geral de extração de citros. Adaptado de Kharfan (46).

5.2 Ensaio enzimáticos da enzima comercial

5.2.1 Determinação da atividade por dosagem de açúcar redutor

A determinação da atividade enzimática por dosagem de açúcar redutor ocorreu em 5 mL de substrato naringina (5 mg/mL) na presença de 0,2 mL da enzima naringinase comercial (1 mg/mL). A atividade obtida por dosagem de açúcar redutor liberado foi de $1,98 \pm 0,10$ U/mL nas condições descritas no item 4.4.1.

5.2.2 Determinação da atividade α -L-ramnosidase e β -D-glicosidase e atividade específica com p -nitrofenil- α -L-ramnosídeo® (p -NF α R) e p -nitrofenil- β -D-glicosídeo® (p -NF β G).

A dosagem de ambas as atividades da enzima comercial (Tabela 4) foram realizadas utilizando os substratos sintéticos p -nitrofenil- α -L-ramnosídeo® (p -NF α R) e p -nitrofenil- β -D-glicosídeo® (p -NF β G) segundo item 4.4.2 (40).

Tabela 4. Média e desvio-padrão da atividade de α -L-ramnosidase e β -D-glicosidase (U/mL) e da atividade específica (U/mg) da enzima naringinase comercial. Araraquara, 2019.

Atividade	Atividade (U/mL)	Atividade específica (U/mg)
α -L-ramnosidase	$0,0749 \pm 0,0004$	$0,7916 \pm 0,0030$
β -D-glicosidase	$0,0612 \pm 0,0012$	$0,6471 \pm 0,0159$

U= unidades em μ mol/mL

Observa-se que a enzima comercial (complexo enzimático) apresentou atividades relativamente proporcionais entre si.

5.3 SDS-PAGE da enzima comercial e suas frações pós purificação parcial em “BATCH”.

O objetivo da realização da eletroforese em condições desnaturantes foi verificar o perfil proteico da naringinase comercial e comparar com as frações α -L-ramnosidase e β -D-glicosidase obtidas na purificação parcial segundo o item 4.5. Partindo disso foi possível observar as diferenças/semelhanças entre os zimogramas das enzimas obtidas.

Ao observar o perfil proteico na Figura 15, após o processo de dessorção da enzima por exposição ao gradiente de NaCl, foi possível observar a separação parcial das proteínas.

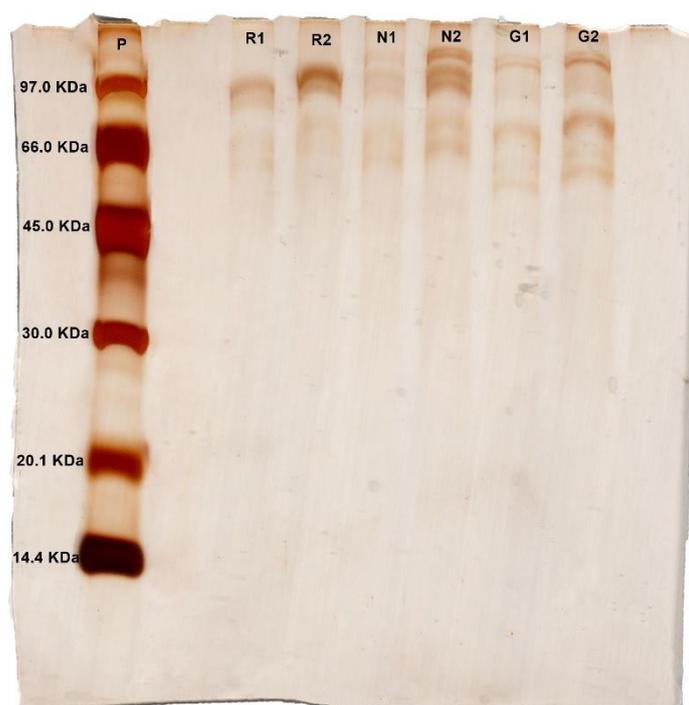


Figura 15. SDS-PAGE 10%. Perfil proteico das frações da enzima naringinase comercial após purificação parcial onde: P= padrão de massa molar; R1 e R2= α -L-ramnosidase; N1 e N2 = Naringinase Comercial; G1 e G2 = β -D-glicosidase. Araraquara, 2019.

Para a determinação da atividade enzimática por dosagem de açúcar redutor da enzima α -L-ramnosidase parcialmente purificada após concentração por liofilização (aproximadamente 10 vezes) foi utilizada uma solução de 5 mL de substrato naringina (5 mg/mL) na presença de 0,05 mL da enzima. A atividade obtida por dosagem de açúcar redutor liberado (ramnose) foi de $15,92 \pm 2,91$ U/mL. Para a análise dos resultados foi construída curva analítica de ramnose (açúcar redutor) possibilitando a obtenção do coeficiente de absorvidade molar (ϵ) de $0,399$ ($\mu\text{mol}/0,25$ mL) $^{-1}$, ou ϵ (molar) de $99,675$ M $^{-1}$ cm $^{-1}$.

5.4 Análise por CLAE dos produtos da hidrólise enzimática

Após a purificação das enzimas e a obtenção de uma solução enzimática com atividade predominantemente de α -L-ramnosidase, foram realizadas hidrólises enzimáticas dos extratos utilizando a enzima comercial e a ramnosidase parcialmente purificada conforme item 4.6. Amostras dos diferentes hidrolisados foram armazenadas e encaminhadas análise em CLAE conforme item 4.7.

Na Tabela 5 são apresentadas as concentrações das flavanonas presentes nos extratos (naringina, prunina e naringenina) após as hidrólises utilizando a enzima naringinase comercial.

Tabela 5. Média e desvio-padrão da concentração de naringina, prunina e naringenina após a hidrólise dos extratos com naringinase comercial por meio de CLAE-DAD. Araraquara, 2019.

Tratamento	NARINGINA (mg/mL)		PRUNINA (mg/mL)		NARINGENINA (mg/mL)	
	1 HORA	3 HORAS	1 HORA	3 HORAS	1 HORA	3 HORAS
Extração por trituração em água	0,51 ± 0,11 ^{b,A}	0,22 ± 0,06 ^{c,B}	0,29 ± 0,05 ^{b,A}	0,14 ± 0,04 ^{c,B}	0,02 ± 0,00 ^{b,B}	0,06 ± 0,01 ^{b,A}
Extração por trituração hidroetanólica (70%)	1,04 ± 0,27 ^{a,A}	0,78 ± 0,04 ^{b,A}	0,45 ± 0,11 ^{ab,A}	0,34 ± 0,03 ^{b,A}	-	-
Extração hidrotérmica	0,65 ± 0,09 ^{b,A}	0,31 ± 0,02 ^{c,B}	0,32 ± 0,03 ^{b,A}	0,18 ± 0,02 ^{c,B}	0,03 ± 0,01 ^{ab,B}	0,12 ± 0,01 ^{a,A}
Extração por prensa	0,58 ± 0,00 ^{b,A}	0,25 ± 0,02 ^{c,B}	0,28 ± 0,00 ^{b,A}	0,13 ± 0,01 ^{c,B}	0,02 ± 0,00 ^{a,B}	0,08 ± 0,01 ^{b,A}
Extração alcoólica (Soxhlet)	1,08 ± 0,09 ^{a,A}	1,10 ± 0,04 ^{a,A}	0,49 ± 0,03 ^{a,A}	0,50 ± 0,01 ^{a,A}	-	-

Médias com letras minúsculas diferentes na mesma coluna diferem significativamente entre si ($p \leq 0,05$) no teste de Tukey e Games-Howell (para dados heterocedásticos). Médias com letras maiúsculas diferentes na mesma linha dentro do mesmo composto diferem significativamente entre si ($p \leq 0,05$) no teste de medidas repetidas.

Como foi possível observar, a enzima atuou com esperado sobre a naringina presente nos extratos convertendo gradualmente em prunina e sucessivamente em naringenina. Nos extratos que utilizaram etanol como solvente não houve hidrólise enzimática. A inibição da atividade da enzima em contato com etanol é apresentada por Orejas et. al (1999) sendo de 50% na concentração de 12,5% (v/v) de etanol. O aumento da concentração de etanol possivelmente contribui para a desnaturação da proteína e perda da atividade enzimática.

Já na Tabela 6 são apresentadas as concentrações das flavanonas presentes nos extratos (naringina e prunina) após a hidrólise dos diferentes extratos usando a enzima α -L-ramnosidase parcialmente purificada (item 4.6.2)

Tabela 6. Média e desvio-padrão da concentração de naringina e prunina (CLAE-DAD) após a hidrólise dos extratos pela enzima Ramnosidase parcialmente purificada (item 4.6.2). Araraquara, 2019.

Tratamento	NARINGINA (mg/mL)		PRUNINA (mg/mL)	
	1 HORA	3 HORAS	1 HORA	3 HORAS
Extração por trituração em água	0,36 ± 0,08 ^{b,A}	0,11 ± 0,03 ^{b,B}	0,26 ± 0,04 ^{b,A}	0,20 ± 0,04 ^{b,B}
Extração por trituração hidroetanólica (70%)	0,98 ± 0,26 ^{ab,B}	1,06 ± 0,27 ^{ab,A}	0,40 ± 0,10 ^{ab,B}	0,42 ± 0,10 ^{ab,A}
Extração hidrotérmica	0,38 ± 0,03 ^{b,A}	0,11 ± 0,00 ^{b,B}	0,29 ± 0,02 ^{b,A}	0,26 ± 0,02 ^{b,B}
Extração por prensa	0,40 ± 0,05 ^{b,A}	0,10 ± 0,01 ^{b,B}	0,26 ± 0,03 ^{b,A}	0,25 ± 0,01 ^{b,A}
Extração alcoólica (Soxhlet)	1,06 ± 0,12 ^{a,A}	1,06 ± 0,12 ^{a,A}	0,44 ± 0,03 ^{a,A}	0,44 ± 0,04 ^{a,A}

Médias com letras minúsculas diferentes na mesma coluna diferem significativamente entre si ($p \leq 0,05$) no teste de Tukey e Games-Howell (para dados heterocedásticos). Médias com letras maiúsculas diferentes na mesma linha dentro do mesmo composto diferem significativamente entre si ($p \leq 0,05$) no teste de medidas repetidas.

Observa-se a diminuição da naringina, caracterizada pela atuação da enzima α -L-ramnosidase. No entanto, não houve aumento do produto da hidrólise (Prunina). Isso pode ter ocorrido devido à complexidade e a baixa concentração de naringina presente no extrato antes da hidrólise. Vários trabalhos reportaram também inibições na atividade da α -L-ramnosidase devido a influência de L-ramnose, glicose, ácido cítrico e vários íons metálicos (48). Diferente da hidrólise realizada utilizando a naringinase comercial, durante a hidrólise com a enzima α -L-ramnosidase não se obteve a formação do produto naringenina, verificando a ausência da atividade β -D-glicosidase da enzima e confirmando a purificação parcial efetiva da enzima.

As flavanonas naringenina e prunina, produtos da hidrólise enzimática da naringina, são muito importantes e vem sendo aplicadas para diversos fins. A naringenina, por exemplo, além de sua conhecida atividade antioxidante também vem sendo estudada devido a sua atividade de supressão da absorção de carboidratos no intestino e inibição das vias gliconeogênicas que levam a ação hipoglicemia em pacientes diabéticos (49); e também a atividade antivírus da dengue, uma vez que estudos demonstram que a naringenina preveniu a infecção pelo vírus da dengue em células, sendo uma molécula candidata ao desenvolvimento de tratamentos específicos relacionados (50). Já a prunina apresenta grande potencial na melhora da resistência à insulina, sendo considerada uma molécula com propriedades antidiabéticas (51); estudos apontam também que ésteres de prunina, sintetizados a partir da prunina por catálises enzimáticas a apresentam alta atividade antimicrobiana, podendo utilizada futuramente ser usada como aditivo alimentar (52,53).

Portanto, a extração e obtenção das flavanonas desponta ser promissora devido a sua infinidade de aplicações em benefício da sociedade.

Espera-se, em trabalhos futuros, realizar testes adicionais utilizando os melhores hidrolisados com o objetivo de verificar esses efeitos em sistemas *in vivo*.

6 CONCLUSÃO

Partindo dos resultados obtidos é possível observar que a escolha do melhor método de extração pode variar principalmente com relação ao composto desejado e de suas futuras aplicações. Para a extração de açúcares redutores não houve diferença significativa entre os métodos de extração propostos. De maneira geral, os métodos alcoólicos apresentaram melhor eficiência com relação as análises de flavanonas totais e fenólicos totais. No entanto, é importante salientar que, quando comparado à água, o etanol possui maior valor de compra, características inflamáveis, além da necessidade de tratamentos de purificação e retirada do solvente.

Ao realizar análises mais robustas nos extratos (CLAE-DAD) foi possível observar apenas a presença de dois dos seis compostos avaliados: naringina e prunina. Para ambos os compostos o método de Extração por Soxhlet apresentou ser o método com a maior capacidade de extração. Apesar da maior capacidade de extração o método em questão não possui uma aplicabilidade industrial devido à estrutura necessária para sua implementação e funcionamento para grandes volumes. Já entre os outros métodos aplicados não houve diferença significativa, ou seja, seria possível a

escolha de qualquer um deles levando em consideração a facilidade de implementação, custos gerais de operação e o solvente utilizado. Os destaques vão para os métodos de extração por trituração em água e à extração por prensa uma vez que ambos utilizam água como solvente, não necessitam de temperatura para a operação e ainda utilizam de equipamento facilmente encontrados em indústrias processadoras de citros. O processo de extração por prensa, ainda, possibilitaria a reutilização dos albedos para a fabricação de doces e compotas.

As diferentes hidrólises dos extratos demonstram a ação das enzimas sobre o substrato disponível. Durante a utilização da enzima naringinase comercial houve a hidrólise da naringina e da prunina característico de ambas as atividades da enzima, formando a naringenina. Os extratos alcoólicos apresentaram inibição da enzima justamente pelo teor alcoólico do meio. Já a hidrólise com a enzima α -L-ramnosidase parcialmente purificada, devido à ausência da atividade β -D-glicosidase, não houve formação da naringenina. Isso confirma que o processo de purificação aplicado foi eficiente. O aumento do produto prunina não foi observado apesar da diminuição das quantidades de naringina do extrato. Levando-se em consideração esses aspectos faz-se necessário mais estudos relacionados as peculiaridades da ação da enzima α -L-ramnosidase em extratos complexos e seus possíveis inibidores.

REFERÊNCIAS

1. OCDE/FAO. Perspectivas Agrícolas no Brasil: desafios da agricultura brasileira 2015-2024 [Internet]. Revista FAO. indd. Brasil: OECD Publishing; 2015. 61–108 p. (OECD-FAO Agricultural Outlook). Available from: http://www.oecd-ilibrary.org/agriculture-and-food/oecd-fao-agricultural-outlook-2015_agr_outlook-2015-en
2. Barbosa da Silva Júnior G, Fonseca da Rocha L, Hélcio Canuto Amaral F, de Andrade ML, Falcão Neto R, Lucena Cavalcante ÍH. Laranja-da-terra : fruta cítrica potencial para o Piauí. Semina: Ciências Agrárias [Internet]. 2010;31(1676-546X):557–62. Available from: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=445744097004>
3. Sharma K, Mahato N, Cho MH, Lee YR. Converting citrus wastes into value-added products: Economic and environmently friendly approaches. Nutrition [Internet]. 2017 Feb;34:29–46. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.nut.2016.09.006>
4. Pellati F, Benvenuti S. Chromatographic and electrophoretic methods for the analysis of phenethylamine alkaloids in Citrus aurantium. J Chromatogr A. 2007;1161(1–2):71–88.
5. Behling EB, Sendão MC. Flavonóide Quercetina : Aspectos gerais e ações biológicas. Aliment e Nutr. 2004;15(3):285–92.
6. Testai L, Calderone V. Nutraceutical Value of Citrus Flavanones and Their Implications in Cardiovascular Disease. Nutrients [Internet]. 2017 May 16;9(5):502. Available from: <http://www.mdpi.com/2072-6643/9/5/502>
7. Yusof S, Ghazali HM, King GS. Naringin content in local citrus fruits. Food Chem [Internet]. 1990 Jan;37(2):113–21. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0308814690900851?via%3Dihub>
8. Puri M, Banerjee UC. Production, purification, and characterization of the debittering enzyme naringinase. Biotechnol Adv [Internet]. 2000 May [cited 2017 Aug 14];18(3):207–17. Available from:

- <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0734975000000343>
9. Zhu Y, Jia H, Xi M, Li J, Yang L, Li X. Characterization of a naringinase from *Aspergillus oryzae* 11250 and its application in the debitterization of orange juice. *Process Biochem* [Internet]. 2017 Jul;(March):0–1. Available from: <http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.procbio.2017.07.012>
<http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.procbio.2017.07.012>
 10. Yang B, Liu H, Yang J, Gupta VK, Jiang Y. New insights on bioactivities and biosynthesis of flavonoid glycosides. *Trends Food Sci Technol* [Internet]. 2018 Sep;79(July):116–24. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.07.006>
 11. Rosa CB da S, Borsato D, Buzato JB, Celligoi MAPC. Naringinase de *Aspergillus niger*: Otimização da produção por metodologia de superfície de resposta e uso do ultrassom para extração. *Semin Ciências Agrárias* [Internet]. 2011 Aug 29;32(3):1049–58. Available from: <http://www.uel.br/revistas/uel/index.php/semagrarias/article/view/1679-0359.2011v32n3p1049>
 12. Martinez J, Dos Santos A, Monti R. Produção e purificação parcial da naringinase de *Aspergillus niger* Fcup1. *Rev Ciência Farm Básicas e Apl* [Internet]. 2014 Aug;35:183. Available from: <http://serv-bib.fcfar.unesp.br/seer/jornada/pdf/AN22.pdf>
 13. Kuivanen J, Richard P. Engineering a filamentous fungus for l-rhamnose extraction. *AMB Express* [Internet]. 2016 Dec 31;6(1):27. Available from: <http://amb-express.springeropen.com/articles/10.1186/s13568-016-0198-8>
 14. Vila-Real H, Alfaia AJ, Calado AR, Ribeiro MHL. Improvement of activity and stability of soluble and sol–gel immobilized naringinase in co-solvent systems. *J Mol Catal B Enzym* [Internet]. 2010 Aug;65(1–4):91–101. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1381117710000342>
 15. Cabrera MP. Imobilização de Enzimas em Suportes Magnéticos

- [Internet]. Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco, Recife; 2013. Available from: [http://repositorio.ufpe.br/xmlui/bitstream/handle/123456789/13413/TESE Mariana Cabrera.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://repositorio.ufpe.br/xmlui/bitstream/handle/123456789/13413/TESE%20Mariana%20Cabrera.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
16. Cui Z, Maruyama Y, Mikami B, Hashimoto W, Murata K. Crystal Structure of Glycoside Hydrolase Family 78 α -L-Rhamnosidase from *Bacillus* sp. GL1. *J Mol Biol* [Internet]. 2007 Nov;374(2):384–98. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022283607011667>
 17. Puri M. Updates on naringinase: Structural and biotechnological aspects. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2012;93(1):49–60.
 18. Escobar M. Extracción de compuestos fenólicos de las cáscaras de cítricos producidos en México. Tesis (Maestría en Ciencias en Alimentos) - La Escuela Nacional de Ciencias Biológicas - Instituto Politécnico Nacional, Ciudad de México, México.; 2010.
 19. Machado TV, Monteiro M. Avaliação sensorial e físico-química do suco de laranja proveniente das etapas do processamento do suco concentrado e congelado avaliação sensorial e físico-química do suco concentrado e congelado [Internet]. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Unesp, Araraquara, São Paul; 2010. Available from: <http://www.fcfar.unesp.br/.../2010/TALITAVIEIRAMACHADOME.PDF>
 20. Neves MF, Trombin VG, Milan P, Lopes FF, Cressoni F, Kalaki R. O retrato da citricultura brasileira [Internet]. São Paulo; 2010. 138 p. Available from: http://www.citrusbr.com.br/download/Retrato_Citricultura_Brasileira_Marcos_Fava.pdf
 21. Rezzadori K, Benedetti S, Amante ER. Proposals for the residues recovery: Orange waste as raw material for new products. *Food Bioprod Process* [Internet]. 2012 Oct;90(4):606–14. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fbp.2012.06.002>
 22. Martín MA, Siles JA, Chica AF, Martín A. Biomethanization of orange

- peel waste. *Bioresour Technol* [Internet]. 2010 Dec;101(23):8993–9. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852410011363>
23. Ohara A, Santos JG dos, Angelotti JAF, Barbosa P de PM, Dias FFG, Bagagli MP, et al. A multicomponent system based on a blend of agroindustrial wastes for the simultaneous production of industrially applicable enzymes by solid-state fermentation. *Food Sci Technol* [Internet]. 2018 Dec 11;38(suppl 1):131–7. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-20612018005002102&lng=en&tlng=en
24. Andreo D, Jorge N. Antioxidantes naturais: técnicas de extração. *Bol do Cent Pesqui Process Aliment* [Internet]. 2006 Dec 31;24(2):319–36. Available from: <http://ojs.c3sl.ufpr.br/ojs/index.php/alimentos/article/view/7489>
25. Jain M, Parmar HS. Evaluation of antioxidative and anti-inflammatory potential of hesperidin and naringin on the rat air pouch model of inflammation. *Inflamm Res* [Internet]. 2011 May 23;60(5):483–91. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00011-010-0295-0>
26. Zatti RA. Estudo biofarmacêutico da naringina [Internet]. Dissertação (Mestre em Ciências Farmacêuticas) - Escola de Farmácia, UFOP, Pilar - Ouro Preto, Minas Gerais; 2009. Available from: http://www.dominiopublico.gov.br/pesquisa/DetalheObraForm.do?select_action=&co_obra=201582
27. Abud AKS, Araújo ML, Almeida RMRG. Uso do resíduo de laranja lima e da casca de coco verde na produção de enzimas. *Sci Plena* [Internet]. 2015 Oct 9;11(10):1–8. Available from: <http://www.scienciaplenua.org.br/sp/article/view/104201>
28. Shanmugaprakash M, Vinothkumar V, Ragupathy J, Reddy DA. Biochemical characterization of three phase partitioned naringinase from *Aspergillus brasiliensis* MTCC 1344. *Int J Biol Macromol* [Internet]. 2015 Sep;80:418–23. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.06.057>

29. El-Nawawi SA. Extraction of citrus glucosides. *Carbohydr Polym* [Internet]. 1995 Jan;27(1):1–4. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0144861795000367>
30. Spagolla LC, Santos MM, Passos LML, De Aguiar CL. Extração alcoólica de fenólicos e flavonóides totais de mirtilo “Rabbiteye” (*Vaccinium ashei*) e sua atividade antioxidante. *Rev Ciencias Farm Basica e Apl.* 2009;30(2):187–91.
31. Cheigh C-I, Chung E-Y, Chung M-S. Enhanced extraction of flavanones hesperidin and narirutin from Citrus unshiu peel using subcritical water. *J Food Eng* [Internet]. 2012 Jun;110(3):472–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2011.12.019>
32. Davis PL. A Rapid Procedure for Extraction of Naringin From Grapefruit Rind. *Floriada state horticultlural Soc.* 1966;
33. Obanda M, Owuor PO, Taylor SJ. Flavanol Composition and Caffeine Content of Green Leaf as Quality Potential Indicators of Kenyan Black Teas. *J Sci Food Agric* [Internet]. 1997 Jun;74(2):209–15. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/%28SICI%291097-0010%28199706%2974%3A2%3C209%3A%3AAID-JSFA789%3E3.0.CO%3B2-4>
34. Turkmen N, Sari F, Velioglu YS. Effects of extraction solvents on concentration and antioxidant activity of black and black mate tea polyphenols determined by ferrous tartrate and Folin–Ciocalteu methods. *Food Chem* [Internet]. 2006 Jan;99(4):835–41. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814605007296>
35. Davis WB. Determination of Flavanones in Citrus Fruits. *Anal Chem* [Internet]. 1947 Jul;19(7):476–8. Available from: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ac60007a016>
36. Miller GL. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Anal Chem.* 1959;31(3):426–8.
37. Park K-I, Park H-S, Kim M-K, Hong G-E, Nagappan A, Lee H-J, et al. Flavonoids identified from Korean Citrus aurantium L. inhibit Non-Small Cell Lung Cancer growth in vivo and in vitro. *J Funct Foods* [Internet].

- 2014 Mar;7(1):287–97. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2014.01.032>
38. Hunlun C, de Beer D, Sigge GO, Wyk J Van. Characterisation of the flavonoid composition and total antioxidant capacity of juice from different citrus varieties from the Western Cape region. *J Food Compos Anal* [Internet]. 2017 Sep;62:115–25. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0889157517301163>
 39. Romero C, Manjón A, Bastida J, Iborra J. A method for assaying the rhamnosidase activity of naringinase. *Anal Biochem* [Internet]. 1985 Sep;149(2):566–71. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0003269785906141>
 40. Monti R, Galán JPM, Bassan JC, Peixoto G, Masarin F, Carceller JM, et al. Imobilização da Naringinase em Grafeno Oxidado: Estabilidade e Reuso do Derivado Enzimático. XII Semin Bras Tecnol Enzimática - ENZITEC 2016 [Internet]. 2016; Available from: <https://www.ucs.br/site/midia/arquivos/4363-enzitec2016.pdf>
 41. Aragon CC. Imobilização multipontual covalente de xilanases: seleção de derivados ativos e estabilizados. [Araraquara]: Tese (Doutorado em Biotecnologia) Instituto de Química, Unesp; 2013.
 42. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* [Internet]. 1976 May;72(1–2):248–54. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0003269776905273>
 43. Laemmli UK. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* [Internet]. 1970 Aug 15;227(5259):680–5. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/227680a0>
 44. Heukeshoven J, Dernick R. Simplified method for silver staining of proteins in polyacrylamide gels and the mechanism of silver staining. *Electrophoresis*. 1985;6(3):103–12.
 45. Blum H, Beier H, Gross HJ. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* [Internet].

- 1987;8(2):93–9. Available from:
<http://doi.wiley.com/10.1002/elps.1150080203>
46. Kharfan D. Proposta de Método para Avaliação do Desempenho Técnico do Processo de Extração de Sucos Cítricos [Internet]. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Produção) - Universidade Federal de São Carlos, Centro de Ciências exatas e de Tecnologia, UFSCar, São Carlos, São Paulo.; 2011. Available from: <https://repositorio.ufscar.br/handle/ufscar/3685>
 47. Orejas M, Ibáñez E, Ramón D. The filamentous fungus *Aspergillus nidulans* produces an α -L-rhamnosidase of potential oenological interest. *Lett Appl Microbiol* [Internet]. 1999 May 4;28(5):383–8. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1046/j.1365-2672.1999.00539.x>
 48. Yadav V, Yadav PK, Yadav S, Yadav KDS. α -L-Rhamnosidase: A review. *Process Biochem* [Internet]. 2010 Aug;45(8):1226–35. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2010.05.025>
 49. Ahmed OM, Hassan MA, Abdel-Twab SM, Abdel Azeem MN. Navel orange peel hydroethanolic extract, naringin and naringenin have anti-diabetic potentials in type 2 diabetic rats. *Biomed Pharmacother* [Internet]. 2017 Oct;94:197–205. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0753332217326100>
 50. Frabasile S, Koishi AC, Kuczera D, Silveira GF, Verri WA, Duarte dos Santos CN, et al. The citrus flavanone naringenin impairs dengue virus replication in human cells. *Sci Rep* [Internet]. 2017 Dec 3;7(1):41864. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/srep41864>
 51. Jung HA, Ali MY, Bhakta HK, Min B-S, Choi JS. Prunin is a highly potent flavonoid from *Prunus davidiana* stems that inhibits protein tyrosine phosphatase 1B and stimulates glucose uptake in insulin-resistant HepG2 cells. *Arch Pharm Res* [Internet]. 2017 Jan 31;40(1):37–48. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s12272-016-0852-3>
 52. Céliz G, Daz M, Audisio MC. Antibacterial activity of naringin derivatives against pathogenic strains. *J Appl Microbiol* [Internet]. 2011

Sep;111(3):731–8. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2672.2011.05070.x>

53. Céliz G, Audisio MC, Daz M. Antimicrobial properties of prunin, a citric flavanone glucoside, and its prunin 6"-O-lauroyl ester. *J Appl Microbiol* [Internet]. 2010 Oct;109(4):1450–7. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2672.2010.04773.x>