



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



RESÍDUOS DE LARANJA COMO FONTE DE ENZIMAS E COMPOSTOS BIOATIVOS

MILENE STEFANI PEREIRA

ORIENTADORA: PROF^a ADJ^a LUCIANA FRANCISCO FLEURI

CO-ORIENTADORA: PROF^a DR^a MÁRCIA ORTIZ MAYO MARQUES

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências,
Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de
Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia.

BOTUCATU – SP

2017



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“Júlio de Mesquita Filho”
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

RESÍDUOS DE LARANJA COMO FONTE DE ENZIMAS E
COMPOSTOS BIOATIVOS

MILENE STEFANI PEREIRA

ORIENTADORA: PROF^a ADJ^a LUCIANA FRANCISCO FLEURI
CO-ORIENTADORA: PROF^a DR^a MÁRCIA ORTIZ MAYO MARQUES

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências,
Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de
Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia.

BOTUCATU – SP

2017

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Pereira, Milene Stefani.

Resíduos de laranja como fonte de enzimas e compostos bioativos / Milene Stefani Pereira. - Botucatu, 2017

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

Orientador: Luciana Francisco Fleuri
Coorientador: Márcia Ortiz Mayo Marques
Capes: 90400003

1. Laranja - Indústria. 2. Lipase. 3. Bioquímica.
4. Fenóis. 5. Compostos bioativos. 6. Resíduos - Subprodutos.

Palavras-chave: Atividade biológica; Compostos fenólicos; Descarte; Laranja; Lipases.

*Dedico este trabalho aos meus pais Júlio e Rose,
por todo amor e incentivo.*

AGRADECIMENTOS

Expresso meus sinceros agradecimentos:

Primeiramente à Deus por todas as oportunidades oferecidas e por me capacitar para cada conquista.

Aos meus pais Júlio e Rose, meu pai pelo apoio incondicional em cada momento, por possibilitar meus sonhos e por todo o amor e minha mãe por ser a minha maior incentivadora, por todo cuidado, dedicação e por todo amor.

Ao meu irmão Giovani por ser meu companheiro de vida e sempre torcer por mim.

Ao meu namorado Cauê que é meu companheiro e participou ativamente desse trabalho, me acompanhando nas viagens que foram necessárias e as idas ao laboratório em horários adversos sempre com o maior carinho.

À minha orientadora Luciana por todo o conhecimento, amizade e carinho, nessa parceria de quase 5 anos de trabalho, onde me ensinou sobre bioquímica, amor ao trabalho e ao próximo.

À minha co-orientadora Márcia, que abraçou nossas ideias com todo o carinho e nos ajudou no desenvolvimento do trabalho e do meu conhecimento.

À pesquisadora Cássia que me assessorou nos experimentos com muita boa vontade e carinho, me presenteou com seu conhecimento e companhia.

À Daniela pela ajuda em todos os procedimentos realizados no Instituto Agrônomo de Campinas – IAC e pelas boas conversas.

À Daniela representante da empresa JBT-Food Tech, por ter sido tão solícita e confiar na seriedade do nosso trabalho.

À empresa JBT- Food Tech, por ceder os resíduos de laranja utilizados neste trabalho.

Ao Prof Dr Willian Fernando Zambuzzi e ao seu grupo de pesquisa do Laboratório de Bioensaios e Dinâmica Celular – LaBio – IBB, que colaboraram com parte deste trabalho.

À minha amiga e mentora científica Clarissa, que me ensinou muito sobre a área de pesquisa deste trabalho, me incentivou e ajudou em momentos de dúvidas.

Aos meus colegas de laboratório: Débora pelo auxílio sempre simpático em qualquer situação, pelo companheirismo e ajuda nas estatísticas deste trabalho; Valesca pelos sábios conselhos, pelas tardes processando os resíduos de laranja, pelas risadas e companheirismo; Mirella por todo o conhecimento repassado, pela dedicação, pelas conversas, pelos gestos repletos de carinho e pelo companheirismo; Júlia por todas as reações aprendidas juntas, pelas cantorias no laboratório e por todo o

companheirismo; João por ter me ajudado ativamente em parte deste trabalho, pelas histórias incomuns e pelas risadas; Bruna por ingressar comigo nessa fase e pelas risadas.

À minha banca de qualificação da qual fizeram parte Prof^a Dr^a Mayara, minha amiga e ex-companheira de laboratório e o Prof Dr Valber, que me presentearam com sugestões que enriqueceram muito meu trabalho e minha postura para conduzi-lo.

À minha banca de defesa Prof Dr Pedro e Prof Dr Ruann, que aceitaram meu convite para contribuírem com o meu trabalho.

Às minhas amigas que me acompanham desde a graduação e dividem este estilo de vida comigo, as alegrias e aflições da pós-graduação: Camila “Sova”, Maira “Sauza”, Flávia “Klo” e Camila “Pandora”.

Aos meus amigos que me acolheram na sua casa, com toda a hospitalidade e carinho, Laura e Júnior.

Aos servidores do departamento de Química e Bioquímica do Instituto de Biociências: Gabriela por todas as gentilezas, Augusto, Fábio e Elaine pelo suporte laboratorial de todo dia.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pela concessão da bolsa de estudos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP – Processo 2015/01753-8.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq.

Ao Instituto Agrônomo de Campinas – IAC por possibilitar a realização de parte deste trabalho.

À Universidade Estadual “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP.

*Todo conhecimento começa tão incomum - não
reconhecido, desvalorizado e, por vezes, não aceito.
Mas, com a perspectiva correta, o incomum pode
se tornar o excepcional.*

ELSEVIER

Lista de tabelas

Tabela 1. Lipases de origem vegetal.	12
Tabela 2. Proteases de origem vegetal comerciais.	14
Tabela 3. Atividade de lipase relacionando variedades e frações de laranja.	31
Tabela 4. Atividades de lipases dos resíduos de laranja em diferentes condições de ensaio.	39
Tabela 5. Regioespecificidade de lipases obtidas de resíduos do processamento de laranja.	42
Tabela 6. Teor de umidade dos resíduos de laranja de diferentes variedades.	46
Tabela 7. Principais classes de substâncias presentes nos resíduos de laranja.	50
Tabela 8. Concentração de hesperidina nos resíduos de laranja (mg/100g amostra).	52
Tabela 9. Redução de radicais DPPH pelos resíduos de laranja expressos em $\mu\text{mol TE/g}$ de amostra.	54

Lista de Figuras

Figura 1. Estrutura química da hesperidina.	18
Figura 2. Esquema sinalizando os momentos em horas (h) de cada processo do MTT.	29
Figura 3. pH ótimo das lipases obtidas de resíduos de laranja da variedade Valência.	33
Figura 4. pH de estabilidade das lipases obtidas de resíduos de laranja da variedade Valência.	34
Figura 5. pH ótimo das lipases obtidas de resíduos de laranja da variedade Natal.	34
Figura 6. pH de estabilidade das lipases obtidas de resíduos de laranja da variedade Natal.	35
Figura 7. Temperatura ótima das lipases obtidas de resíduos de laranja da variedade Valência.	36
Figura 8. Temperatura de estabilidade das lipases obtidas de resíduos de laranja da variedade Valência.	37
Figura 9. Temperatura ótima das lipases obtidas de resíduos de laranja da variedade Natal.	37
Figura 10. Temperatura de estabilidade das lipases obtidas de resíduos de laranja da variedade Natal.	38
Figura 11. Especificidade das lipases sobre substratos sintéticos de diferentes tamanhos de cadeia carbônica.	40
Figura 12. Produtos de reação da hidrólise da trioleína realizada por lipases de diferentes resíduos de laranja e lipase comercial.	43
Figura 13. Teor de fenóis totais expressos em $(\text{ACE}/100\text{g}^{-1})$ e $(\text{AGE}/100\text{g}^{-1})$	47
Figura 14. Teor de flavonoides totais nos resíduos de laranja $(\text{mg HE}/100\text{g}^{-1})$	49
Figura 15. Perfil químico do frit de laranja das variedades Hamlin (A), Pêra (B), Valência (C) e Natal (D).	51
Figura 16. Capacidade sequestrante do radical DPPH (%) dos resíduos de laranja de diferentes variedades.	53
Figura 17. Viabilidade das células NHI-3t3, HaCat e SCC9 em teste com casca de laranja das variedades Hamlin (A), Pêra (B), Valência (C) e Natal (D).	58
Figura 18. Viabilidade das células NHI-3t3, HaCat e SCC9 em teste com frit de laranja das variedades Hamlin (A), Pêra (B), Valência (C) e Natal (D).	59
Figura 19. Viabilidade das células NHI-3t3, HaCat e SCC9 em teste com polpa de laranja das variedades Hamlin (A), Pêra (B), Valência (C) e Natal (D).	60

Sumário

Resumo	1
Abstract.....	2
1 INTRODUÇÃO	3
2 REVISÃO DA LITERATURA	6
2.1 Resíduos.....	6
2.2 Laranja	7
2.3 Enzimas.....	10
2.3.1 Lipases	10
2.3.2 Proteases	13
2.4 Compostos bioativos.....	16
3 OBJETIVOS.....	19
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	20
4.1 Obtenção e preparação dos resíduos vegetais	20
4.2 Atividade de lipase dos resíduos de laranja	20
4.3 Caracterização das lipases presente nos resíduos de laranja.....	21
4.3.1 Influência do pH na atividade e estabilidade de lipase dos resíduos de laranja.....	21
4.3.2 Influência da temperatura na atividade e estabilidade de lipase dos resíduos de laranja.....	21
4.4 Especificidade das lipases dos resíduos de laranja quanto ao tamanho de cadeia do substrato.....	21
4.5 Regioespecificidade das lipases dos resíduos de laranja	22
4.6 Atividade de protease dos resíduos de laranja	23
4.7 Teor de umidade dos resíduos de laranja.....	23
4.8 Extração de compostos fenólicos dos resíduos de laranja	24
4.9 Quantificação do teor dos fenóis totais dos resíduos de laranja	24
4.10 Quantificação do teor dos flavonoides totais dos resíduos de laranja	25
4.11 Perfil dos constituintes químicos dos resíduos de laranja.....	25
4.12 Atividade antioxidante dos resíduos de laranja	26
4.13 Atividades antimicrobianas dos resíduos de laranja	27
4.14 Avaliação da citotoxicidade – teste de viabilidade celular por meio da redução de MTT.....	28
4.15 Análise estatística	29
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
5.1 Atividade de lipases dos resíduos de laranja	31
5.2 Caracterização de lipases presente nos resíduos de laranja	33
5.2.1 Influência do pH na atividade de lipase dos resíduos de laranja	33
5.2.2 Influência da temperatura na atividade de lipase dos resíduos de laranja.....	36
5.3 Especificidade das lipases dos resíduos de laranja quanto ao tamanho de cadeia do substrato.....	40
5.4 Regioespecificidade das lipases dos resíduos de laranja	42
5.5 Atividade de protease dos resíduos de laranja	45
5.6 Teor de umidade dos resíduos de laranja.....	46
5.7 Teor dos fenóis totais dos resíduos de laranja	47
5.8 Teor de flavonoides totais dos resíduos de laranja	49
5.9 Perfil dos constituintes químicos dos resíduos de laranja.....	50
5.10 Atividade antioxidante dos resíduos de laranja.....	53
5.11 Atividades antimicrobiana dos resíduos de laranja.....	55

5.12 Avaliação da citotoxicidade – teste de viabilidade celular por meio da redução de MTT.....	57
6 CONCLUSÃO.....	62
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63

Resumo

Os resíduos agroindustriais são o destaque deste trabalho. Resíduos de laranja, uma cultura de extrema importância no Brasil, foram utilizados devido ao seu descarte abundante e pelo potencial em conter diversas moléculas de interesse biotecnológico. O objetivo foi avaliar os descartes do processamento de suco de laranja das principais variedades comerciais Hamlin, Pêra, Valência e Natal quanto à presença de enzimas e compostos bioativos. As lipases se mostraram presentes em todas as variedades de laranjas estudadas. Nas variedades Hamlin, Valência e Natal é a primeira vez que lipases são documentadas. As lipases do bagaço e polpa de Hamlin apresentaram 27,45 U/g e 31,13 U/g de atividade lipolítica, respectivamente. As proteases não foram encontradas a partir dos métodos utilizados, deixando em aberto a possibilidade de testar novas metodologias, como critério de caracterização e contribuição literária. O perfil químico dos compostos fenólicos existentes nos resíduos de laranja foi determinado e apresentou cerca de 80% de flavanonas no geral. Além disso, foi detectado alto teor de hesperidina (em mg/100 g) nos resíduos da variedade Pêra (3294,6); Hamlin (2903,2); Natal (2885,9) e Valência (2880,2). Atividades biológicas como antioxidante, antimicrobiana e sobre a viabilidade celular também foram abordadas, sendo que os resíduos apresentaram capacidade de redução do radical DPPH em torno de 70%. No entanto, não apresentaram potencial antimicrobiano frente às bactérias e fungos testados. Nos testes de viabilidade celular alguns resíduos demonstraram citotoxicidade para uma linhagem celular cancerígena bucal, outros exibiram efetividade no estímulo do crescimento de fibroblastos. Esse estudo aponta um direcionamento para os resíduos da cadeia de produção do suco de laranja identificando e caracterizando moléculas, substâncias e compostos valiosos, passíveis de recuperação e aplicação.

Palavras-chave: laranja, lipases, descarte, compostos fenólicos, flavonoides e atividade biológica.

Abstract

The agroindustrial residues are the highlight of this work. Orange residues, a crop of extreme importance in Brazil, were used due to their abundant disposal and the potential to contain several molecules of biotechnological interest. The objective was to evaluate the discards of the orange juice processing of the main commercial varieties Hamlin, Pera, Valencia and Natal for the presence of enzymes and bioactive compounds. Lipases were present in all varieties of oranges studied. In the Hamlin, Valencia and Natal varieties is the first time lipases are documented. The lipases of Hamlin bagasse and pulp presented 27,45 U / g and 31,13 U / g of lipolytic activity, respectively. The proteases were not found from the methods used, leaving open the possibility of testing new methodologies as a criterion of characterization and literary contribution. The chemical profile of the phenolic compounds in orange residues was determined and showed about 80% of flavanones in general. In addition, high content of hesperidin (in mg / 100 g) was detected in the residues of the Pera variety (3294,6); Hamlin (2903,2); Natal (2885,9) and Valencia (2880,2). Biological activities such as antioxidant, antimicrobial and cell viability were also addressed and the residues presented a DPPH radical reduction capacity of around 70%. However, they not showed antimicrobial potential against the bacteria and fungi tested. In the cell viability tests some residues demonstrated cytotoxicity for an oral cancer cell line, others exhibited effectiveness in stimulating the growth of fibroblasts. This study indicates a direction for the residues of the orange juice production chain identifying and characterizing molecules, substances and valuable compounds that can be recovered and applied.

Keywords: orange, lipases, discard, phenolic compounds, flavonoids and biological activity.

1 INTRODUÇÃO

O processamento industrial de frutas e vegetais gera uma enorme quantidade de resíduos no mundo (KAPOOR et al., 2016). O descarte excedente e inadequado desses resíduos agroindustriais vem causando problemas de poluição ambiental, além de déficit comercial, visto que podem ser empregados em processos biotecnológicos e resultar em novos produtos de alto valor agregado (GOULA e LAZARIDES, 2015).

Uma área biotecnológica bastante promissora é a de bioprocessos que combina sustentabilidade e tecnologia, utilizando os descartes agroindustriais como substratos para cultivo de micro-organismos de grande interesse, produzindo indiretamente biomoléculas para diversas aplicações (NEETHU et al., 2015; FLEURI et al., 2014a). Sendo assim, é possível também obter biomoléculas diretamente desses resíduos (FLEURI, 2016).

O Brasil é o terceiro maior produtor de frutos frescos e transformados em todo o mundo, atrás apenas da China e Índia (SILVA et al., 2014b) e, dentre as diversas culturas produzidas em grande escala, a produção e o processamento de laranja doce (*Citrus sinensis* L. Osbeck) representam um mercado de grande porte e bem estabelecido, em que o Brasil é o principal produtor e exportador mundial. Entretanto, o consumo do suco de laranja apresentou queda significativa no último ano (CITRUSBR, 2015). Com o principal produto em declínio, uma alternativa viável, é a pesquisa de novos compostos obtidos a partir da mesma cadeia de produção.

As características do suco de laranja já estão bem esclarecidas e documentadas em artigos científicos, bem como o perfil dos compostos voláteis e sólidos, e atividade biológica dos compostos. Considerando que toneladas de laranja são direcionadas para a indústria de suco e nesse processo 50% do fruto é descartado (LANZA, 2003), existe uma fonte de resíduos promissores que até agora foi pouco explorada.

Os resíduos de laranja apresentam fibras e óleos essenciais já conhecidos e utilizados (ARANHA, 2011); demonstraram a presença de uma importante enzima em estudos recentes (OKINO-DELGADO e FLEURI, 2014); e baseado na composição do suco (SILVA, 2009), é possível que possuam outras biomoléculas interessantes e passíveis de recuperação e utilização comercial, havendo necessidade de pesquisa para elucidação da constituição. Além disso, é possível vislumbrar as possibilidades de aplicação dos componentes destes resíduos, bem como, possibilitar a elucidação de mecanismos bioquímicos e fisiológicos da fruta.

Enzimas representam algumas dessas biomoléculas de interesse, as quais são biocatalisadores que podem substituir catálises químicas em diversos processos industriais, devido às suas propriedades promissoras em condições ambientais variadas, altas atividades de conversão de substrato em produto, alta seletividade e especificidade (BARBOSA et al., 2015). Ao longo das últimas décadas, a busca por novas tecnologias com diminuição do desperdício e ambientalmente corretas, estão motivando o investimento em processos enzimáticos (CHOI et al., 2015).

Entre as inúmeras enzimas, as lipases (EC 3.1.1.3, triacilglicerol acilhidrolase) têm se destacado por catalisarem reações de hidrólise e de síntese (MIRANDA et al., 2015), com vasta aplicação na produção de detergentes, alimentos, produtos orgânicos, farmacêuticos, aromas, biosensores (GOLAKI et al., 2015) e biodiesel (FLEURI et al., 2014b).

Recentemente foi registrada a presença de lipases em resíduos de laranja da variedade Pêra (OKINO-DELGADO e FLEURI, 2014), porém, visando a cadeia de produção anual do suco de laranja e a geração dos resíduos, mais três variedades de laranja doce (Hamlin, Valência e Natal) são empregadas na obtenção do suco (SPADA, 2011). Essas variedades não apresentam até agora relato sobre a presença de lipases. Possuem características muito similares no sabor e rendimento, porém, apresentam diferenças em parâmetros como BRIX°, porcentagem de conversão em suco, porcentagem de cada fração de resíduo (JBT, 2011) e o período de colheita (MATTOS JUNIOR et al., 2005), podendo, portanto, apresentar diferenças quanto à presença das biomoléculas.

As proteases são enzimas multifuncionais, de extrema importância para as indústrias farmacêutica, médica, alimentícia e biotecnológica, e respondem por quase 60% de todas as enzimas disponíveis no mercado (CASTRO e SATO, 2013; RAMAKRISHNA et al., 2010; JINKA et al., 2009). São utilizadas no tratamento do couro, na produção de cerveja, na produção de hidrolisados proteicos, amaciante de carne, como agentes digestivos e na indústria de laticínios como coagulante, principalmente, para a produção de queijo (MAZORRA-MANZANO, 2013; FEIJOO-SIOTA E VILLA, 2011; MAHAJAN e MADGUJAR, 2010).

As proteases estão presentes em todos os organismos vivos existentes, podem ser obtidas de fontes (vegetal, animal e microbiana) e conduzem várias funções metabólicas essenciais (NEVES, 2014). Algumas proteases de origem vegetal já foram caracterizadas e são utilizadas e comercializadas por alto valor, tais como: papaína de

mamão (*Carica papaya*), bromelina de abacaxi (*Ananas comosus*) e ficina de figo (*Ficus* spp.) (BALA et al., 2012; DUBEY et al., 2007).

Na literatura atual não há registros de proteases em resíduos de laranja doce (*Citrus sinensis*), vertente que foi explorada neste trabalho.

Os compostos bioativos são substâncias que conferem ações benéficas à saúde exercendo várias funções do ponto de vista biológico, como atividade antioxidante, modulação de enzimas, estimulação do sistema imune, atividade antibacteriana e anticarcinogênica (COSTA e JORGE, 2011). Mais de 170 compostos oriundos de frutas cítricas, incluindo vitaminas, minerais, compostos fenólicos e terpenoides, com atividade antioxidante foram relatados na literatura (ZHOU, 2012). Entre os polifenóis das frutas cítricas, os ácidos fenólicos e flavonoides são os mais estudados (ZOU et al. 2016). Como um exemplo podemos citar a hesperidina, um flavonoide relacionado intimamente com frutas cítricas e que apresenta diversas atividades biológicas (UMENO et al., 2016; DEVI et al., 2015; IRANSHAHI et al., 2015).

Assim sendo, o presente trabalho investigou os resíduos de laranja de diferentes variedades para obtenção de enzimas e sua caracterização. Além disso, visou traçar o perfil dos compostos bioativos e suas atividades biológicas. Dessa forma, esse projeto redireciona os resíduos agroindustriais, fortalece uma cadeia de produção e pode trazer inovação em conjunto com novos produtos para o mercado.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Resíduos

O consumo de alimentos processados teve início após a revolução industrial que ocorreu em meados do século XVIII. Com o aprimoramento tecnológico e o emprego de máquinas nos campos, a produção agrária apresentou um aumento exponencial, e o grande montante de frutas e vegetais que eram produzidos começaram a ser destinados para novos produtos, como sucos, geleias e enlatados (NASCIMENTO FILHO e FRANCO, 2015).

Com o aumento da população, a demanda de mercado também cresceu e os alimentos industrializados passaram a fazer parte do dia-a-dia da sociedade, em conjunto com os seus resíduos gerados nesses processos (OKINO-DELGADO, 2014; WOICIECHOWSKI et al., 2013).

Resíduos sólidos diferenciam-se do termo “lixo” porque, enquanto este último não possui nenhum tipo de valor, já que é aquilo que deve apenas ser descartado; os resíduos podem possuir algum valor econômico, por possibilitarem reaproveitamento no próprio processo produtivo (DEMAJORIVIC, 1995).

Atualmente, nos Estados Unidos cerca de 30% de todos os alimentos produzidos são descartados. Na mesma proporção, o Reino Unido e Japão são os países que mais desperdiçam seus alimentos chegando a descartar 40% de sua produção (EPA, 2013; WOICIECHOWSKI et al., 2013). Na Índia, Filipinas e China a geração de resíduos resultante do processamento de alimentos chega a 1,81; 6,53 e 31,98 milhões de toneladas por ano, respectivamente (SHARMA et al., 2016; WADHWA e BAKSHI, 2013).

O processamento de frutas e vegetais gera uma quantidade substancial de resíduos como vagens, cascas, bagaços, polpas, caroço e sementes (BABBAR e OBEROI, 2014). O Brasil é o terceiro maior produtor de frutos frescos e transformados em todo o mundo, atrás da China e Índia (SILVA et al., 2014b), sendo que devido à expressiva produção agrícola, é também grande gerador de resíduos.

Muitas culturas têm histórico de descarte em nosso país como o côco verde que tem 85% de seu peso descartado para a extração e industrialização de sua água; a goiaba para a produção de sucos, geleias e polpas, e que gera como resíduos sementes e parte da polpa, na proporção de 12% e 4%, respectivamente; e o café, que tem como resíduo

sua casca, que apresenta um descarte de 50% em relação ao fruto total (GUSMÃO, 2014; MELO, 2011; COELHO, 2001).

Esses resíduos de alimentos, muitas vezes, são aproveitados como ração animal ou dispostos no campo como adubo. Entretanto, a maior parte ainda é descartada sem o tratamento adequado, causando danos ao meio ambiente (MELO et al., 2011). Além disso, o destino dado a esses resíduos, tal como é feito, causa déficit econômico na cadeia produtiva, pois esses resíduos representam perda de matérias-primas ou energia já pagos pela indústria, além de gastos adicionais para o manuseio e descarte (NASCIMENTO FILHO e FRANCO, 2015; MELO et al., 2011).

A otimização no uso de matérias-primas resulta em economia e aumento na produtividade. Maior quantidade e diversidade de produtos são produzidos a partir da mesma quantidade de material inicial, quando não há desperdício de recursos, afinal, esses resíduos podem conter substâncias valiosas que se recuperadas podem ser destinadas para diferentes finalidades, resultando em vantagem competitiva para a empresa no mercado (WOICIECHOWSKI et al., 2013; MELO et al., 2011; TIMOFIECSYK e PAWLOWSKY, 2000; SEABRA et al., 1998; FREEMAN, 1995).

A exploração de resíduos de frutas e vegetais para o desenvolvimento de produtos de valor agregado é uma área promissora (SHARMA et al., 2016). O descarte desses resíduos representa inúmeras toneladas, portanto, reutilizá-los para obter moléculas como enzimas e compostos bioativos fenólicos, é de interesse econômico, científico e tecnológico (MARTÍNEZ et al., 2012).

2.2 Laranja

As frutas cítricas (laranjas, limões, tangerinas e toranjas) são cultivadas há mais de 4.000 anos. A principal região referente ao surgimento dos citros são as áreas tropicais e subtropicais da Ásia, no entanto, algumas espécies e variedades foram predominantes em outras regiões, sendo que historiadores e pesquisadores concordam sobre a origem chinesa da laranja doce (BERK, 2016).

A disseminação das frutas cítricas pelo mundo ocorreu devido ao comércio, guerras e emigração que juntamente com a fragrância atraente e sabor do fruto, chegou ao Oriente Médio, África do Norte e Sul da Europa no início da Idade Média. Na América, a laranja foi introduzida durante as expedições colonizadoras de Cristóvão Colombo na América do Norte e de Pedro Álvares Cabral na América do Sul (BERK, 2016; FERNANDES, 2010).

Antigamente, as frutas cítricas eram comercializadas e consumidas apenas como frutos frescos mesmo por países não produtores, devido à estabilidade pós-colheita de citros. Além disso, o fruto pode permanecer na árvore por um longo período após a maturação, sem deterioração. Atributos favoráveis à exportação. (BERK, 2016).

Por possuir esses atributos que prolongam sua vida útil, a produção de citros passou a atingir escalas enormes de estocagem, surgindo a necessidade de gerar novos produtos que absorvessem esses frutos, como compotas, geleias e sucos (NOGUEIRA, 2012).

A laranja pertence à família Rutaceae, subfamília Aurancioideas e gênero *Citrus* (SWINGLE, 1967). As laranjeiras (*Citrus sinensis* L. Osbeck) são os citros de maior importância econômica (LOPES et al., 2011), pois se destaca devido ao sabor ácido e levemente adocicado. Deu origem a um produto que ganhou espaço no mercado mundial e hoje é um dos produtos mais consumidos em todo o mundo, o suco de laranja (NEVES et al., 2010).

Os maiores produtores de laranja são o Brasil e os Estados Unidos, que juntos representam cerca de 45% do total mundial (SILVA, 2009). No ano de 2014, o Brasil produziu cerca de 16.927.637 toneladas de laranja doce (IBGE, 2015). Em torno de 40% de todas as laranjas produzidas são convertidas em suco concentrado, sendo que os EUA e o Brasil juntos produzem 90% de toda a laranja doce processada no mundo (LANZA, 2003).

A variedade Pêra é a mais importante no cenário brasileiro, tanto para a produção de suco, quanto para o consumo *in natura* (ARANHA, 2011). Nos Estados Unidos, a variedade Valência ocupa esse espaço, no cultivo e comercialização (JOMORI, 2011).

As principais variedades de laranja doce cultivadas no Brasil e destinadas ao processamento de suco são Hamlin, Pêra, Valência e Natal (SPADA, 2011). Essas variedades merecem destaque, pois possuem características muito similares no sabor e rendimento, porém cada variedade carrega suas particularidades.

A variedade Hamlin tem sua época de colheita concentrada entre os meses de abril e meados de julho, os frutos são ligeiramente ovais, com poucos açúcares e acidez moderada, peso médio de 130 g, casca lisa e delgada, com a coloração da casca e polpa laranja-pálido, apresenta em média 4 sementes por fruto e possui maturação semitardia (EMBRAPA, 2013; ARANHA, 2011; SILVA, 2009; MATTOS JUNIOR et al., 2005).

A variedade Pêra tem período de colheita de julho até meados de novembro, os frutos apresentam forma alongada, peso médio de 150 g, casca lisa e delgada, cada fruto tem em média 4 sementes, sabor adocicado e levemente ácido e maturação semitardia (EMBRAPA, 2013; ARANHA, 2011; SILVA, 2009; MATTOS JUNIOR et al., 2005).

A variedade Valência é colhida de agosto a dezembro, o fruto tem forma esférica, casca fina e levemente rugosa e casca e polpa de coloração laranja. O peso está entre 150-170 g e em média possui 6 sementes por fruto e maturação tardia (EMBRAPA, 2013; ARANHA, 2011; JOMORI, 2011; SILVA, 2009; MATTOS JUNIOR et al., 2005).

A variedade Natal tem seu período de colheita entre agosto e dezembro, os frutos são ovais com a casca superficialmente grossa, peso médio de 140 g, cada fruto apresenta de três a quatro sementes, seu suco é adocicado e de coloração amarelo escuro. Sua maturação é considerada tardia (EMBRAPA, 2013; ARANHA, 2011; SILVA, 2009; MATTOS JUNIOR et al., 2005).

Essas variedades ainda apresentam diferenças em parâmetros como BRIX^o, porcentagem de conversão em suco e porcentagem de cada fração de resíduo (CITRUSBR, 2011), podendo, portanto, apresentar diferenças quanto à presença de biomoléculas.

Quanto às características gerais, as laranjeiras atingem em média quatro metros de altura, a copa é densa e de formato arredondado, as folhas são aromáticas e as flores são pequenas e brancas (SILVA, 2009; MATTOS JUNIOR et al., 2005).

O processamento de frutas cítricas no mundo merece atenção especial quanto ao descarte de resíduos. Na temporada 2010-2011, a produção mundial foi superior a 115 milhões de toneladas, sendo que as laranjas ocuparam 61% desse montante (FAO, 2012). No Brasil, em 2011, foram produzidas 19 milhões de toneladas de laranja doce, com cerca de 15,2 milhões de toneladas utilizadas na produção de suco concentrado, gerando, aproximadamente 7,6 milhões de toneladas de resíduos, ou seja, 50% de todas as laranjas foram descartadas ao final do processo (IBGE, 2012; LANZA, 2003; DONADIO et al., 1995). Entre os resíduos gerados neste processamento estão cascas, bagaços e sementes (WILKINS et al., 2007).

O processo de obtenção do suco de laranja é totalmente mecânico, portanto, não afeta as biomoléculas sensíveis à alta temperatura. As extratoras utilizadas neste processo são padrão entre as indústrias produtoras do seu suco e separam diferentes frações residuais (JBT, 2016). Industrialmente, cada uma dessas frações possui uma

denominação: casca, frit, bagaço ou polpa. Comparando-se as definições botânicas às industriais, a fração chamada casca consiste no epicarpo; a fração denominada frit (ou fragmento de casca) corresponde à parte externa do epicarpo; o bagaço consiste do mesocarpo e a polpa ao endocarpo (OKINO-DELGADO e FLEURI, 2016).

Em muitos casos, mesmo quando a composição do produto final é bem conhecida, a constituição dos resíduos gerados permanece obscura. Isso ocorre com o suco de laranja, para o qual o perfil dos compostos voláteis e fixos, bem como a atividade biológica dos compostos que já são conhecidos e documentados em artigos científicos. No entanto, para seus resíduos há a necessidade de pesquisa para elucidação dos constituintes e para que seja possível vislumbrar as possibilidades de aplicação dos componentes destes descartes, além de possibilitar a elucidação de mecanismos bioquímicos e fisiológicos dessas frações vegetais (FLEURI, 2016; OKINO-DELGADO, 2014).

Os resíduos de laranja apresentam fibras e óleos essenciais já conhecidos e utilizados (ARANHA, 2011), demonstram a presença de uma importante enzima em estudos recentes (OKINO-DELGADO e FLEURI, 2014), portanto, é possível que possuam outras biomoléculas interessantes e passíveis de recuperação e utilização comercial.

Esses dados alertam que resíduos agroindustriais como farelos, cascas, palhas, bagaços e sementes, devem ter sua utilização ou aproveitamento direcionados aos bioprocessos industriais como matérias-primas para a obtenção de novos compostos e/ou produtos. Além de reduzir a disposição de resíduos no meio ambiente, apresentam baixo custo e grande disponibilidade, criando uma cadeia de produção fechada e ambientalmente correta (FLEURI, 2016; WOICIECHOWSKI et al., 2013).

2.3 Enzimas

2.3.1 Lipases

As enzimas são biocatalisadores que podem substituir catálises químicas em diversos processos industriais, devido às suas propriedades promissoras em condições ambientais variadas, altas atividades de conversão de substrato em produto, alta seletividade e especificidade (BARBOSA et al., 2015). Nas últimas décadas a busca por novas tecnologias limpas estão motivando o investimento em processos enzimáticos (CHOI et al., 2015).

As lipases (E.C. 3.1.1.3), também denominadas de triacilglicerol acilhidrolase, têm se destacado por catalisarem reações de hidrólise das ligações ésteres carboxílicas de óleos e reações de síntese em meio não aquoso, como esterificação, transesterificação e interesterificação (AGUIEIRAS et al., 2015; MIRANDA et al., 2015; VESCOVI, 2012; MENDES et al., 2012).

Lipases não específicas hidrolisam moléculas de triglicerídeos, produzindo ácidos graxos livres e glicerol. Lipases 1,3 específicas catalisam reações envolvendo apenas os ácidos graxos das posições 1 e 3 dos triglicerídeos resultando em monoglicerídeos e ácidos graxos livres. A especificidade dessas enzimas também pode ser em relação ao ácido graxo, demonstrando afinidade ao comprimento da cadeia ou à presença da dupla ligação na cadeia do ácido graxo (CASTRO, 2004). São enzimas que apresentam um mecanismo peculiar de atuação e seus sítios ativos são geralmente compostos pela tríade dos aminoácidos serina (Ser), histidina (His) e ácido aspártico (Asp) (VESCOVI, 2012). São obtidas de fonte microbiana, animal ou vegetal (FLEURI et al., 2014a), sendo que essa diversidade de fontes gera lipases amplamente variáveis quanto à massa molecular, pH e temperatura ótimos de atuação (VESCOVI, 2012), bem como outros parâmetros importantes, como K_m , $V_{máx}$, estabilidade na presença de solventes orgânicos, inibidores e ativadores (ITABAIANA JR et al., 2013).

As lipases vegetais são encontradas principalmente em tecidos de reserva de energia, como nas sementes. Nas sementes oleaginosas possuem a função de auxiliar nos primeiros estágios da germinação, iniciando a metabolização de triglicerídeos estocados pela hidrólise dos ácidos graxos, os quais são recrutados como fonte de energia para o crescimento do embrião (QUETTIER e EASTMOND, 2009).

As principais substâncias de reserva armazenadas pelas sementes durante o seu desenvolvimento são carboidratos, lipídeos e proteínas. Também podem armazenar enzimas como invertases, amilases, lipases e galactosidases que são responsáveis pela conversão das macromoléculas armazenadas em metabolizáveis (amido em glicose, triglicerídeos em glicerol e ácidos graxos, polipeptídios em peptídeos e aminoácidos), que serão transferidas e utilizadas pela planta para o crescimento e germinação das sementes (QUETTIER e EASTMOND, 2009; MARTINS et al., 2007).

Apesar do grande registro de lipases de sementes de plantas, essas não são as únicas fontes de lipases vegetais existentes (Tabela 1).

Tabela 1. Lipases de origem vegetal.

Fontes vegetais de lipase	Parte da planta	Referência
Tremoço (<i>Lupinus albus</i> cv multotupa)	Semente	SANZ e OLIAS (1990)
Canola (<i>Brassica Napus</i> L.)	Semente	SANA et al. (2004)
Trigo (<i>Fagopyrum esculentum</i>)	Semente	SUZUKI et al. (2004)
Mamona (<i>Ricinus communis</i>)	Semente	EASTMOND (2004)
Girassol (<i>Helianthus annuus</i>)	Semente	SAGIROGLU e ARABACI (2005)
Coco (<i>Cocos nucifera</i> linn)	Semente	EJEDEGBA et al. (2007)
Seringueira (<i>Hevea brasiliensis</i>)	Semente	WEERASOORIYA e GUNASEKARA (2011).
Mamão (<i>Carica papaya</i>)	Látex	FOGLIA e VILLENEUVE (1997)
Babaco (<i>Carica pentagona</i>)	Látex	DHUIQUE-MAYER et al. (2001)
Abacaxi (<i>Ananas comosus</i>)	Caule e folha	GIORDANI et al. (1991)
<i>Euphorbia characias</i>	Látex	GIORDANI et al. (1991)
<i>Euphorbia wulfenii</i>	Látex	PALOCCI et al. (2003)
Manga (<i>Mangifera indica</i> L.)	Casca, semente e polpa	OKINO-DELGADO e FLEURI, (2016)
Laranja (<i>Citrus sinensis</i> L. Osbeck)	Bagação, casca e frit	OKINO-DELGADO e FLEURI, (2014)

O farelo de arroz (*Oryza sativa* L.) apresenta duas lipases distintas: a primeira é uma proteína de 40 kDa e 1,3 regioespecífica, já a segunda tem massa molecular de 34 kDa e pH ótimo de 7,5 (VIJAYAKUMAR e GOWDA, 2013).

A manga (*Mangifera indica* L.) avaliada por Okino-Delgado e Fleuri (2016) apresentou atividade de lipase em ampla faixa de pH e temperatura, e especificidade por ácidos graxos de cadeia carbônica diferentes.

Em resíduos do processamento de suco de laranja (*C. sinensis*) da variedade Pêra, Okino-Delgado e Fleuri (2014) identificaram lipases com atividade em extenso intervalo de pH e temperatura, o que faz desses resíduos, importantes fontes dessas enzimas.

Lipases podem ser aplicadas para a produção de detergentes, na síntese de compostos orgânicos, na gestão ambiental, síntese de aromas, aplicações farmacêuticas, produção de biosensores (GOLAKI et al., 2015) e de biodiesel (FLEURI et al., 2014b).

Devido à sua estabilidade em solventes orgânicos e alta disponibilidade, muitas delas sem necessidade de cofatores, as lipases tornaram-se os biocatalisadores mais utilizados nas reações de transformação (ITABAIANA JR et al., 2013).

2.3.2 Proteases

As proteases são enzimas multifuncionais, de extrema importância para as indústrias farmacêutica, médica, alimentícia e biotecnológica, respondendo por quase 60% de todas as enzimas disponíveis no mercado (CASTRO e SATO, 2013; RAMAKRISHNA et al., 2010; JINKA et al., 2009). São utilizadas no tratamento do couro, na produção de cerveja, na produção de hidrolisados proteicos, amaciante de carne, como agentes digestivos e na indústria de laticínios como coagulante, principalmente, para a produção de queijo (MAZORRA-MANZANO, 2013; FEIJOO-SIOTA e VILLA, 2011; MAHAJAN e MADGUJAR, 2010).

As enzimas proteolíticas pertencem ao grupo das hidrolases e catalisam a reação de hidrólise das ligações peptídicas das proteínas, podendo apresentar atividade sobre ligações éster e amida (KOBBLITZ, 2010; BEYNON e BOND, 1996).

As enzimas proteolíticas são classificadas pelo modo de ação (endo e exopeptidases) e conforme a natureza do sítio ativo (serina-proteases, cisteína-proteases ou proteases sulfídricas, proteases aspárticas ou ácidas e metalo-proteases) (KOBBLITZ, 2010; BEYNON e BOND, 1996). De modo geral, proteases extracelulares catalisam a hidrólise de proteínas em moléculas menores para consequente absorção pela célula, enquanto as intracelulares possuem um papel vital na regulação do metabolismo (RAO et al., 1998).

Proteases podem agir na hidrólise de proteínas para a geração de peptídeos e aminoácidos, entretanto, a ação dessas enzimas pode diferir quanto às propriedades bioquímicas incluindo, especificidade ao substrato, sítio ativo, mecanismos catalíticos, pH e temperatura ótimos e de estabilidade (MOLINA et al., 2013).

As proteases têm importante papel em todos os processos fisiológicos, desde a quebra geral de proteína à regulação da apoptose (POZA et al., 2003). Sua importância se torna evidente, visto que as proteases estão presentes em todos os organismos vivos existentes e conduzem várias funções metabólicas e essenciais (NEVES, 2014).

As proteases de origem vegetal vêm se destacando no campo da biotecnologia e da medicina devido às suas diversas propriedades. Existem diversas proteases vegetais em estudo, algumas já caracterizadas e comercializadas (Tabela 2).

Tabela 2. Proteases de origem vegetal comerciais.

Proteases	Origem vegetal	Referência
Papaína	Mamão (<i>Carica papaya</i>)	RASKOVIC et al. (2015)
Bromelina	Abacaxi (<i>Ananas comosus</i>)	ARSHAD et al. (2014)
Ficina	Figo (<i>Ficus carica</i>)	BAEYENS-VOLANT et al. (2015)

O Brasil está entre os maiores produtores de mamão do mundo, com uma produção de 1,65 milhões de toneladas/ano (PERES et al., 2015; EMBRAPA, 2014). A papaína (E.C.3.4.22.2) foi isolada a partir do látex do mamão imaturo (*Carica papaya*) (RASKOVIC et al., 2015) e é classificada como uma cisteína-protease com ampla especificidade de substrato e muitas aplicações. Essa enzima é composta por uma cadeia de polipeptídios incluindo 212 resíduos de aminoácidos, com massa molecular em torno de 23 kDa; ponto isoelétrico em 8,75; e atividade catalítica ótima em pH de 5-8. Sua cadeia de polipeptídios inclui três ligações dissulfeto (-SS-) e um grupo sulfidril (-SH). O centro ativo inclui resíduos de cisteína e histidina, que são ativados por tióis (e outros agentes redutores) e inibidas por oxidantes e íons metálicos (ALPAY e UYGUN, 2015). É utilizada amplamente em muitos processos, como no amaciamento de carne, agindo nas fibras musculares e nos componentes do tecido conectivo. Pode também ser utilizada como clarificante na produção de cerveja, na indústria de cosméticos como *peeling* facial e corporal e de detergentes, potencializando sua ação de limpeza (RASKOVIC et al., 2015).

Alguns estudos têm descrito que o extrato de papaína também tem atividade antibacteriana contra *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Proteus vulgaris* e *Alicyclobacillus* spp. (DOS ANJOS et al., 2016; ESHAMAH et al., 2014; OSATO et al., 1993). Devido à grande utilização da papaína em processos industriais, muitos estudos atuais têm sido em torno da possível imobilização dessa enzima, para que sua reutilização nas reações seja viável e para comparar o rendimento de sua forma imobilizada com a solúvel (HOMAEI, 2015).

A bromelina ou bromelaína é uma enzima proteolítica, que pode ser encontrada nos tecidos de plantas da família Bromeliaceae, o abacaxi (*Ananas comosus* L. Merrill),

estando presente em sua polpa, coroa, caule e casca, com massa molecular de 23-36 kDa (ARSHAD et al., 2014). Essa protease é solúvel em água, mas é insolúvel em solventes orgânicos. O seu ponto isoelétrico é em pH 4,6 quando extraído da polpa (E.C. 3.4.22.33) e 9,5 quando obtidos a partir do caule ou casca (E.C. 3.4.22.32) (WAN et al., 2016; ARSHAD et al., 2014 e HEBBAR et al., 2008). A bromelina do caule/casca apresenta pH ótimo de 6,0 a 7,0 e temperatura ótima de 50 a 60°C; enquanto a bromelina da polpa apresenta pH ótimo de 3,0 a 8,0 e temperatura ótima de 37 a 70°C (BALA et al., 2012). Por ter essa faixa ampla de temperatura e pH em que atua, a bromelina se mostra uma enzima aplicável à uma enorme variedade de substratos e condições (MIRANDA, 2014).

A bromelina tem aplicações similares à papaína, também pode ser usada no amaciamento de carnes, na clarificação da cerveja e vinho. Atua na prevenção do escurecimento do suco de maçã; é empregada na indústria têxtil para facilitar o tingimento de roupas; hidrolisa proteínas presentes em seda, lã e couro; e também é utilizada como ingrediente ativo para proporcionar efeitos de *peeling* suave para cosméticos (BALA et al., 2012). A *Food and Drug Administration*, EUA, classificou a bromelina como aditivo alimentar seguro para ser utilizada na indústria de alimentos e medicina (FOOD and DRUG ADMINISTRATION, 2006). É considerada um suplemento alimentar e está disponível ao público em geral em lojas de produtos naturais e farmácias nos EUA e na Europa. Pode ser absorvida no intestino humano sem degradação e sem diminuir a sua atividade biológica, sendo indicada para ajudar na digestão alimentar. Também apresentou potencial antibacteriano no combate de *Alicyclobacillus* spp. (DOS ANJOS et al., 2016).

A ficina (E. C. 3.4.22.3) é uma protease isolada do látex de figo (*Ficus carica*), pertence à grande família da papaína e, assim como a bromelina, também é uma cisteína-protease (BAEYENS-VOLANT et al., 2015). Possui cadeia polipeptídica simples, com massa molecular de 23,1 kDa. A enzima é ativa em pH neutro e a sua inativação completa ocorre abaixo de pH 3,0. As propriedades enzimáticas caracterizadas da ficina compartilham muitas semelhanças com outras cisteína-proteases de plantas (DEVARAJ et al., 2011). Também pode ser empregada na indústria alimentícia no amaciamento de carnes e produção de queijos (GAGAOUA et al., 2014).

Existem ainda exemplos de proteases vegetais não comerciais.

A fruta-pão (*Artocarpus altilis*) é uma planta produtora de látex. Em estudo recente foi constatado que o extrato bruto de seu látex tem alta atividade de proteases

coagulantes do leite. A enzima apresentou melhor rendimento em pH alcalino e em temperatura superior a 40°C, tornando-as enzimas potenciais para a indústria alimentícia (SOARES et al., 2015).

Em experimento realizado com pepino (*Cucumis sativus* L.), uma protease de massa molecular de 56 kDa e com atividade em pH 5, foi detectada. Os pesquisadores acreditam que essa enzima no pepino tenha relação com sua maturação, pois são encontradas apenas em frutos maduros (LEE et al., 2015).

Proteases foram também detectadas no extrato de laranja azeda (*Citrus aurantium* L.) e mostraram atividade máxima em pH ácido e temperatura ótima em 65°C. Essas enzimas apresentaram potencial uso em bioprocessos, especialmente como coagulante de leite para fabricação de queijos (FAO, 2012).

Nos vegetais, constatou-se que as proteases participam na formação do xilema, na maturação das sementes, na mobilização de fornecimento de nutrientes, degradação de proteínas danificadas, respostas aos estímulos ambientais, fatores de virulência, senescência e morte celular programada. Estão presentes em processos biológicos, desempenhando funções importantes como, ativação e inativação de proteínas, transporte de proteínas pela membrana plasmática e no metabolismo geral (BAEYENS-VOLANT et al., 2015; TAN-WILSON et al., 2012). Além disso, participam de mecanismos de defesa, protegendo as frutas contra patógenos, como fungos e insetos (BAEYENS-VOLANT et al., 2015; KONNO et al., 2004; BAKER e DRENTH, 1987).

A descoberta e recuperação de enzimas existentes no metabolismo de frutas e vegetais devem ser exploradas, pois possibilitam novas aplicações biotecnológicas e a expansão na oferta de biocatalisadores no mercado.

2.4 Compostos bioativos

Os compostos bioativos são substâncias que conferem ações benéficas à saúde, como os compostos fenólicos, ácidos graxos, vitaminas, isoprenoides e pigmentos. Esses compostos exercem várias funções biológicas, como atividade antioxidante, modulação da atividade de enzimas, estimulação do sistema imune, atividade antibacteriana e anticarcinogênica (COSTA e JORGE, 2011).

A atividade antioxidante indica a capacidade de um composto bioativo de manter a estrutura e a função das células por realizar de maneira eficaz a limpeza dos radicais livres, prevenindo danos oxidativos (ZOU et al., 2016). Por isso, são frequentemente recomendados na proteção do organismo contra o estresse oxidativo e na prevenção de

doenças associadas ao envelhecimento, inclusive o câncer (GOH et al., 2015; DEVASAGAYAM et al., 2004).

Assim sendo, os antioxidantes são considerados possíveis agentes de proteção, que inibem ou retardam o início da oxidação e podem ser classificados de acordo com os seus diferentes mecanismos de ação, como antioxidantes primários ou secundários. (EMBUSCADO 2015; SHAHIDI e ZHONG, 2015; SHAHIDI e ZHONG, 2010). Os primários inibem a reação em cadeia da oxidação, doando hidrogênio ou atuam como receptores de radicais livres, tornando-os estáveis (SHAHIDI e ZHONG, 2015; NAWAR, 1996). Os secundários podem evitar ou retardar a oxidação suprimindo os promotores de oxidação, incluindo íons metálicos, oxigênio molecular, enzimas pró-oxidantes, entre outros.

Alguns ainda têm a capacidade de regenerar antioxidantes primários, repondo átomos de hidrogênio, impedindo assim o esgotamento das fontes primárias de antioxidantes (SHAHIDI e ZHONG, 2015; SHAHIDI e ZHONG, 2010). Quando um antioxidante inibe um radical livre, torna-se oxidado, portanto, os recursos antioxidantes devem ser constantemente renovados no organismo (GUPTA et al., 2014).

Na indústria alimentícia é muito comum a utilização de antioxidantes sintéticos, por exemplo, hidroxitolueno butilado (BHT) e hidroxianisol butilado (BHA), que podem ser tóxicos e apresentar propriedades mutagênicas, o que demonstra a necessidade de buscar fontes naturais desses compostos, que são, provavelmente, mais seguros e podem ser usados em alimentos (GOH et al., 2015; DEVASAGAYAM et al., 2004).

Existem mais de 170 antioxidantes de frutas cítricas que foram relatados na literatura atual, incluindo vitaminas, minerais, compostos fenólicos e terpenoides (ZHOU, 2012).

Os polifenóis ou compostos fenólicos são uma grande classe de substâncias biologicamente ativas, amplamente distribuídas entre as plantas. Constituem, principalmente, o metabolismo secundário das plantas que é responsável pela cor e sabor dos vegetais, pela proteção contra patógenos e adversidades ambientais (IRANSHAHI et al., 2015). Entre os compostos fenólicos das frutas cítricas, com atividade antioxidante, os ácidos fenólicos e flavonoides são os mais estudados (ZOU et al., 2016).

Os ácidos fenólicos estão presentes em elevada quantidade em frutas cítricas, têm diferentes níveis de eliminação de radicais livres e mostram propriedades antioxidantes efetivas através da desidrogenação de grupos hidroxilas (ZHOU, 2012).

Os flavonoides têm um papel direto na eliminação dos radicais livres, sendo que *in vitro* inibem a oxidação lipídica e *in vivo* melhoram a atividade das enzimas antioxidantes do organismo, diminuindo a formação de peróxido (NAKAO et al., 2011). Os dois anéis aromáticos que compõem a estrutura dos flavonoides são ligados por três carbonos, que podem ou não formar um terceiro anel, que difere no grau de oxidação e leva à subclassificação dos flavonoides como: flavonas, flavonois, isoflavonas, flavanonas, antocianina e flavanois (AMIOT et al., 2016). Geralmente os flavonoides são encontrados na forma glicosilada em plantas e a presença da molécula de açúcar é um fator determinante na sua função e biodisponibilidade (IRANSHAHI et al., 2015). Entre os flavonoides cítricos, subclassificados como flavanonas, estão a hesperidina, naringina e naringenina (ZOU et al., 2016).

A hesperidina é amplamente encontrada no epicarpo, mesocarpo e endocarpo de diferentes espécies de citros. Sua estrutura química (Figura 1) é constituída de uma aglicona, a hesperitina, e um dissacarídeo que contém ramnose e glicose (DEVI et al., 2015).

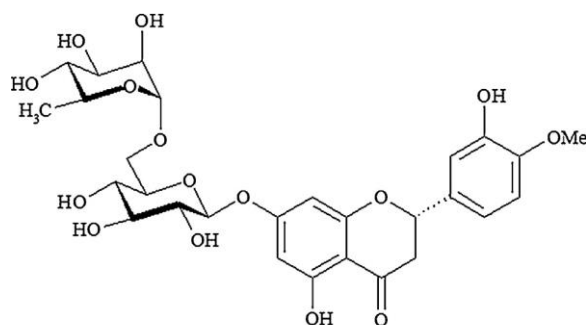


Figura 1. Estrutura química da hesperidina.

Oriunda de diferentes fontes, a hesperidina já demonstrou desempenhar atividades biológicas diversas como antioxidante, antidiabética (UMENO et al., 2016), anti-inflamatória, antifúngica, antibacteriana contra bactérias gram-positivas (IRANSHAHI et al., 2015) e antineoplásica contra células cancerígenas de várias linhagens (DEVI et al., 2015).

Neste contexto, identificar novas fontes de compostos bioativos indica perspectivas interessantes nas áreas biotecnológicas e da saúde.

3 OBJETIVOS

- Explorar os resíduos de laranja quanto à presença de lipases, proteases e compostos bioativos;
- Caracterizar bioquimicamente as enzimas;
- Caracterizar e traçar o perfil dos compostos bioativos, correlacionando as estruturas químicas com as atividades biológicas.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Obtenção e preparação dos resíduos vegetais

Os resíduos do processamento da laranja (*Citrus sinensis* L. Osbeck) das variedades Hamlin, Pêra, Valência e Natal foram doados pela empresa J. B. T. Food Tech (Araraquara, SP). Cada variedade e cada fração (casca, bagaço, frit e polpa) foi analisada separadamente. Após o processamento da laranja realizado pela empresa J. B. T. Food Tech, os resíduos foram embalados de acordo com cada fração e o transporte das amostras foi realizado a baixa temperatura. Posteriormente, os resíduos foram armazenados e preparados segundo método utilizado por Okino-Delgado e Fleuri (2014). Os resíduos de laranja foram acondicionados por 2 dias a -20°C em freezer, triturados mecanicamente até atingir granulometria homogênea de $0,5\text{ cm}^3$, congelados a -20°C por 24 horas e liofilizados (liofilizador L101 – Liotop) por 48 horas a -60°C . Após a liofilização foram novamente triturados e depois armazenados congelados em freezer a aproximadamente -20°C .

4.2 Atividade de lipase dos resíduos de laranja

A atividade lipolítica das frações foi determinada seguindo o método descrito por Macedo et al. (1997) com modificações. Foi utilizado 5 mL do substrato composto por azeite de oliva extra virgem e solução de goma arábica 7% (na proporção de 1:4, v/v), 3 mL de solução tampão fosfato (0,1 mol/L, pH 7,0) e 0,5 g do extrato vegetal enzimático liofilizado. O branco recebeu o mesmo volume de emulsão, tampão e 0,5 g do extrato vegetal desnaturado (12 segundos em micro-ondas a 1.000W). O controle consistiu no mesmo volume da emulsão e de tampão fosfato, sem extrato enzimático. A mistura de reação foi incubada por 30 minutos a 40°C em banho-maria termostaticado (Dubnoff – Nova Ética) com agitação de 130 opm. A reação foi paralisada pela adição de solução acetona:etanol (1:1, v/v). Os ácidos graxos liberados pela hidrólise dos lipídeos do azeite foram titulados com solução de NaOH (0,05 mol/L) utilizando fenolftaleína como indicador. Uma unidade de atividade lipolítica foi definida como a quantidade de lipase necessária para liberar $1\text{ }\mu\text{mol}$ de ácido graxo por minuto nas condições de ensaio. O resultado do branco obtido na titulação foi descontado das amostras correspondentes. O controle com o substrato e tampão (sem extrato enzimático) foi analisado como garantia de que os resultados obtidos na titulação foram referentes à reação com os extratos enzimáticos e não dos ácidos presentes no substrato.

4.3 Caracterização das lipases presente nos resíduos de laranja

Para a caracterização bioquímica das lipases das variedades Valência e Natal, foi utilizada a metodologia de Okino-Delgado e Fleuri (2014), para determinação de pH e temperatura ótimos e de estabilidade.

4.3.1 Influência do pH na atividade e estabilidade de lipase dos resíduos de laranja

Para o estudo do pH ótimo foi analisada a atividade lipolítica de cada fração em meio reacional semelhante ao utilizado para atividade de lipase, apenas diferenciando o pH da solução tampão. Foram testadas soluções tamponadas nos pHs 4 e 5 (tampão acetato 0,1 mol/L), 6, 7 e 8 (tampão fosfato 0,1 mol/L), 9 e 10 (tampão borax 0,1 mol/L). O pH referente à maior atividade lipolítica foi considerado o pH ótimo (100% de atividade relativa). Para o estudo de pH de estabilidade foi utilizado o mesmo meio reacional anterior, porém as amostras permaneceram 24 horas na solução tampão antes da análise da atividade.

4.3.2 Influência da temperatura na atividade e estabilidade de lipase dos resíduos de laranja

A atividade lipolítica das frações foi analisada no meio reacional citado acima, alterando apenas a temperatura do banho-maria termostaticado com agitação (Dubnoff – Nova Ética). Foram determinadas as atividades lipolíticas das frações nas temperaturas de 20, 30, 40, 50, 60, 70 e 80°C. Para verificação da temperatura de estabilidade das frações de laranja, as amostras foram incubadas em diferentes temperaturas por 60 minutos antes da determinação da atividade de lipase.

4.4 Especificidade das lipases dos resíduos de laranja quanto ao tamanho de cadeia do substrato

O *p*-nitrofenil palmitato (*p*-NPP, Sigma Aldrich) é composto por ácidos graxos de cadeia longa (16 carbonos). A análise da atividade lipolítica dos extratos vegetais foi realizada seguindo o método descrito por ANVISA (2009). Uma emulsão composta por 9 mL de solução emulsionante (2 g de triton X-100; 0,5 g de goma arábica e 450 mL de tampão Tris-HCl 50 mmol/L, pH 8) e 1 mL de substrato foi preparado inicialmente. Para a reação 0,1 g da amostra foi adicionado a 0,9 mL da emulsão e permaneceu em repouso por 15 minutos a 40°C. Após o período de incubação, as amostras foram

centrifugadas a 6.000 rpm por 5 minutos a 5°C. O sobrenadante de cada amostra foi lido em espectrofotômetro com absorvância no comprimento de 410 nm.

O *p*-nitrofenil laurato (*p*-NPL, Sigma Aldrich) é um substrato sintético constituído por ácidos graxos de cadeia média (12 carbonos). Os extratos vegetais foram analisados pelo método descrito por Gutarra et al. (2009). A solução de substrato foi preparada utilizando-se 0,25 mL de *p*-NPL 2,5 mmol em 2,2 mL de tampão fosfato de sódio (pH 7,0; 0,5 mol/L). A reação foi iniciada pela adição de 0,05 g do extrato enzimático e incubada por 15 minutos a 30°C. Após o período de incubação as amostras foram centrifugadas a 6.000 rpm por 5 minutos a 5°C. O sobrenadante de cada amostra foi lido em espectrofotômetro com absorvância no comprimento de 412 nm.

Os resíduos foram analisados segundo o método descrito por Calado et al. (2002) e Lopes et al. (2011), para avaliar a sua afinidade ao substrato *p*-nitrofenilbutirato (*p*-NPB, Sigma Aldrich), um ácido graxo sintético de cadeia curta (4 carbonos). Uma alíquota de 0,05 g de cada fração foi adicionada a 3,43 mL de mistura reacional constituída por 1,12 mmol de *p*-NPB dissolvido em tampão fosfato 50 mmol/L (pH 7,2) contendo 0,2% de Triton X-100 e 0,43 mol de tetrahydrofurano. A reação foi incubada durante 15 minutos a 37°C. Após a incubação, as amostras foram centrifugadas a 6.000 rpm durante 10 minutos a 5°C. O sobrenadante de cada amostra foi lido em espectrofotômetro com absorvância no comprimento de 405 nm.

Para todos os ensaios de *p*-NPs o equipamento foi zerado com o branco de substrato.

4.5 Regioespecificidade das lipases dos resíduos de laranja

A regioespecificidade das lipases obtidas a partir dos resíduos de laranja foi determinada segundo Meghwanshi et al. (2006), pela incubação de 0,5 mL de trioleína com 0,1 g de extrato enzimático dissolvidas em 2,5 mL de tampão fosfato 0,1 mol/L pH 7,0 a 40°C e 100 opm durante 24 horas. Após a reação alíquotas de 500 µL foram adicionadas a 1,5 mL de éter etílico. Os produtos formados como resultado da hidrólise da trioleína pelas lipases, foram avaliados por cromatografia em camada delgada (CCD) utilizando cromatoplasmas de sílica gel (Macherey-Nagel, 20x20 cm). Foi utilizada fase móvel constituída por éter de petróleo, éter etílico e ácido fórmico (210: 90: 0,4; v: v: v). As placas foram reveladas por imersão em câmara contendo ácido sulfúrico 10% em etanol (v/v). A lipase 1,3-regioespecífica de *Rhizomucor miehei* da empresa Sigma

Aldrich foi utilizada como controle positivo, bem como os padrões monoleína, dioleína, ácido oleico e trioleína.

4.6 Atividade de protease dos resíduos de laranja

A atividade de protease foi mensurada utilizando duas metodologias.

Na primeira metodologia utilizou-se a azocaseína como substrato segundo descrito por Charney e Tomarelli (1947), com modificações. O meio reacional foi composto por 0,5 mL de azocaseína (Sigma-Aldrich) 0,5% em tampão fosfato 0,1 mol/L pH 7 e 0,5 g do extrato vegetal enzimático liofilizado, os quais foram incubados por 40 minutos a 37°C. A reação foi paralisada com a adição de 0,5 mL de ácido tricloroacético (TCA) 10% (m/v) e as amostras centrifugadas a 6.000 rpm por 15 minutos a 15°C (centrífuga refrigerada SL 701 – Solab). O branco foi preparado com o extrato vegetal desnaturado e adição de ácido tricloroacético (TCA) anteriormente à reação. Posteriormente 1 mL de hidróxido de potássio (KOH) 5 mol/L foi adicionado a 1 mL do sobrenadante para formação do cromóforo. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para aumentar a absorvância em 0,1 a 428 nm nas condições de ensaio.

Na segunda metodologia, utilizou-se caseína como substrato como descrito por Obata et al. (1977), Rowley e Bull (1977) e Santos (2004). A mistura de reação contendo 1,5 mL de solução 2% de caseína (m/v), 1 mL de tampão fosfato 0,15 mol/L pH 7,5 e 0,5 mg de extrato enzimático foi incubada em banho-maria (SL 150/10 – Solab) a 30°C por 30 minutos. A reação foi paralisada pela adição de 3 mL de solução 0,4 mol/L de ácido tricloroacético (TCA), seguida de filtração em papel Whatman 42. A absorvância do filtrado foi determinada a 280 nm, sendo uma unidade de atividade definida como aquela capaz de aumentar em uma unidade a absorvância do filtrado, nas condições de ensaio. Foi preparado um branco de solução para cada amostra, com adição de TCA antes do extrato enzimático.

4.7 Teor de umidade dos resíduos de laranja

Para a determinação do teor de umidade, aproximadamente 60 g de cada amostra foram acondicionadas em placas de petri, devidamente identificadas e secas em estufa com ventilação forçada a 40°C até obtenção de peso constante. Após completa secagem o teor de matéria seca (MS) foi calculado através da equação proposta por Carvalho et al. (1990):

$$\text{Equação} = \text{MS (\%)} = [((\text{Mp} + \text{MAS}) - \text{Mp}) \div \text{MAU}] * 100$$

Mp: massa da placa de pétri (g); MAS: massa da amostra seca (g); MAU: massa da amostra úmida (g).

4.8 Extração de compostos fenólicos dos resíduos de laranja

A determinação de fenóis totais, flavonoides totais e o perfil químico dos resíduos de laranja foram realizadas em parceria com a Prof^a Dr^a Márcia Ortiz Mayo Marques e a Pesquisadora Cássia Regina Limonta Carvalho, ambas do Departamento de Fitoquímica do Instituto Agronômico de Campinas – IAC.

As amostras úmidas foram pesadas em tubo falcon de 50 mL utilizando 0,5 g para frit, 1 g para casca e 2 g para bagaço e polpa. A seguir foi adicionado 10 mL de n-hexano, seguido de centrifugação (Hettich Rotina 380) a 5°C por 10 minutos a 6000 rpm e posterior descarte do solvente. Em seguida, na amostra foi adicionado 40 mL de etanol 70% (v/v) com 10 mmol/L de EDTA e mantido sob agitação por 5 horas em mesa agitadora orbital (TE-141 Tecnal). Após a agitação, as amostras foram colocadas em banho de ultrassom 25 kHz (Eco-sonics) por 45 minutos a 68°C. O sobrenadante foi separado por pipetagem e congelado em tubo falcon a -80°C, até a realização das próximas análises.

4.9 Quantificação do teor dos fenóis totais dos resíduos de laranja

As soluções etanólicas foram avaliadas quanto ao teor de fenóis totais por espectrofotometria no UV-visível (UV/VIS HITACHI, modelo U 2000) com leituras das absorbâncias no comprimento de onda de 765 nm, empregando o método de Folin-Ciocalteu (SINGLETON et al., 1999). Em tubos de ensaio devidamente identificados, adicionou-se 300 µL da amostra, 700 µL de água destilada e 500 µL do reagente Folin-Ciocalteu, sendo que após aproximadamente 7 minutos, foi adicionado 2,5 mL de uma solução de Na₂CO₃ (carbonato de sódio) 20% (m/v). A mistura foi homogeneizada e mantida a temperatura ambiente e no escuro por cerca de 40 minutos e absorbância lida a 765 nm. A quantificação dos fenóis totais foi estimada a partir da equação da reta, obtida da curva de calibração do padrão de ácido p-cumárico (98%, Sigma Aldrich, concentração das soluções: 0,0025 a 0,0700 mg/5 mL) e do ácido gálico (99%, Sigma Aldrich, concentração das soluções: 0,0025 a 0,0500 mg/5 mL). O primeiro padrão foi utilizado por ser majoritário nas amostras (Wang et al., 2008) e o segundo por ser o

mais comum nas literaturas. Os resultados obtidos foram expressos, em base seca, como mg/equivalentes de ácido p-cumárico (ACE)/100 g⁻¹ e de ácido gálico (AGE)/100 g⁻¹.

4.10 Quantificação do teor dos flavonoides totais dos resíduos de laranja

Os extratos etanólicos foram analisados quanto à presença de flavonoides totais utilizando o método de Zhishen et al. (1999) adaptado por Lin et al. (2010). Em tubos de ensaio devidamente identificados adicionou-se 500 µL do extrato da amostra, 2,5 mL de água destilada e 150 µL de NaNO₂ (nitrito de sódio) 5% (m/v). Após repouso de 6 minutos, foi adicionado 300 µL de solução AlCl₃ (cloreto de alumínio) 10% (m/v), seguido novamente de 5 minutos de repouso. Por fim, foi adicionado 1 mL de NaOH 1 mol/L e o volume foi completado para 5 mL com água destilada. A solução foi deixada em repouso por 15 minutos. Todo o procedimento foi realizado a temperatura ambiente. As amostras foram analisadas em espectrofotômetro UV/VIS HITACHI, modelo U 2000, com leituras de absorvância a 357,5 nm. A quantificação dos flavonoides totais foi realizada pelo método de padrão externo, empregando a hesperidina como referência para a construção da curva de calibração. Para a curva de calibração foram preparadas 6 soluções nas concentrações: 0,137 a 0,821 mg/mL. O teor de flavonoides totais foi calculado a partir da equação da reta, obtida do gráfico da concentração das soluções de hesperidina *versus* absorvância. Os resultados obtidos foram expressos como mg/equivalente de hesperidina (HE)/100 g⁻¹.

4.11 Perfil dos constituintes químicos dos resíduos de laranja

A separação, identificação e quantificação dos compostos fenólicos foram realizadas por meio da técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Para a separação dos compostos fenólicos foi utilizado cromatógrafo líquido (Agilent Technologies, modelo 1260 Infinity Quaternary LC), equipado com bomba quaternária (1260 Quat Pump, G1311B), injetor automático (1260 ALS, G1329B) e detector com arranjo de diodos (DAD) acoplado à um sistema de integração ChemStation®. Para aquisição dos dados utilizou-se o sistema de software Agilent OpenLAB CDS, versão A.01.04. O metanol utilizado foi grau HPLC e água ultra-pura obtida do sistema de purificação de água Milli-Q (PURELAB Ultra Mk2).

A separação dos compostos foi realizada mediante uso de coluna analítica Zorbax C- 18 (250 nm x 4,6 mm, 5 mm) precedida de coluna de guarda com a mesma fase estacionária. A fase móvel consistiu de fosfato de sódio 50 mmol/L pH 3,3;

metanol a 10% (v/v), (solução A) e metanol 70% (v/v) (solução B), em sistema gradiente, fluxo de 1,0 mL/minuto e temperatura constante de 35°C, conforme instruções descritas por (SAKAKIBARA et al., 2003): inicialmente 100% da solução A; para os próximos 15 minutos 70% da solução A; durante mais 30 minutos 65% da solução A; durante mais 20 minutos 60% da solução A; por mais 5 minutos 50% da solução A; e finalmente 0% da solução A durante 25 minutos. O volume de injeção das amostras foi de 10 µL.

Para a identificação das substâncias foram utilizados padrões comerciais das principais classes de substâncias presentes em citros: a) flavavonas: hesperidina (97%, Acros Organics), naringina (97%, Acros Organics) e naringenina ($\geq 95\%$, Sigma-Aldrich); b) flavanol: catequina (98%, Sigma-Aldrich), c) flavona: rutina (95%, Sigma-Aldrich), d) flavonol: quercetina (98%, Sigma-Aldrich), e) ácidos fenólicos: ácido clorogênico (95%, Sigma-Aldrich), ácido vanílico (97%, Sigma-Aldrich), ácido cafeico (98%, Sigma-Aldrich), ácido p-cumárico (98%, Sigma-Aldrich), ácido ferúlico (99%, Sigma-Aldrich) e ácido sináptico (98%, Sigma-Aldrich).

Para a identificação do perfil das classes de substâncias presentes nas amostras foram utilizados os espectros UV-visível dos padrões comerciais injetados e os relatados por Frutos (2007).

A quantificação da hesperidina foi realizada pelo método de padrão externo. Para a curva de calibração foram preparadas soluções de hesperidina solubilizadas em metanol nas seguintes concentrações: 0,1 mg/mL; 0,4 mg/mL; 0,7512 mg/mL; 1,0 mg/mL e 1,5 mg/mL.

4.12 Atividade antioxidante dos resíduos de laranja

Os extratos utilizados nessa análise foram preparados utilizando 10 mL de etanol 99,8% e 0,5 g da amostra vegetal liofilizada, seguido de 15 minutos no ultrassom Cristófoli 42 kHz e centrifugação a 6.000 rpm por 10 minutos a 5°C (centrífuga refrigerada SL 701 – Solab). O sobrenadante foi separado por pipetagem e congelado a -20°C para posterior realização dos estudos.

O estudo realizado foi da capacidade do sequestro do radical livre DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila) total de acordo com metodologia descrita por Zhu et al. (2002) e Chen et al. (2003), com modificações.

Alíquota de 500 µL da solução extrativa de cada amostra foi adicionado a 3 mL de etanol e a 300 µL de solução de DPPH (0,02 g/100 mL etanol 99,8%), a qual

permaneceu 60 minutos no escuro a temperatura ambiente. Para o branco foi realizado o mesmo procedimento, mas ao invés do extrato amostral, foi adicionado 300 µL de etanol 99,8%. A leitura foi realizada em espectrofotômetro UV-visível Bel *Photonics* UV-M51 e leitura de absorbância a 517 nm. A porcentagem de DPPH reduzido foi calculado como descrito na fórmula abaixo.

$$\text{Equação} = \frac{\text{Branco} - \text{Amostra}}{\text{Branco}} * 100 = \% \text{ DPPH reduzido}$$

Para expressar os resultados em equivalente de trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-ácido carboxílico, Sigma-Aldrich) foi realizada uma curva de calibração com 5 soluções nas concentrações de 0,0099 a 0,1188 mg/mL. A equação obtida da reta foi utilizada para os cálculos.

4.13 Atividades antimicrobianas dos resíduos de laranja

As amostras foram preparadas utilizando 100 g de cada fração das laranjas (bagaço, casca, frit e polpa) *in natura* e 100 mL de água destilada resfriada a 5°C. A mistura foi homogeneizada em liquidificador por 2 minutos, seguido de filtração em gaze. A porção sólida foi descartada e a líquida foi congelada a -20°C para posterior utilização nos testes de atividade antimicrobiana e avaliação da citotoxicidade.

As atividades antimicrobianas foram determinadas de acordo com Motta e Brandelli (2002) com modificações. Para determinar a atividade antibacteriana as cepas indicadoras testadas foram *Escherichia coli* (ATCC 8739), *Listeria monocytogenes* (ATCC 7644), *Pseudomonas aureginosa* (ATCC 27853), *Salmonella* Enteritidis (ATCC 13076) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 1901). Os micro-organismos indicadores na concentração de 10⁸ UFC/mL⁻¹ em solução salina (0,85% NaCl, m/v) foram inoculados em placas de ágar Mueller Hinton. Discos de difusão foram distribuídos uniformemente sobre as placas e sobre eles foram pipetadas as amostras. Como branco foi utilizado solução salina, como controle negativo gentamicina 10 µg para cepas gram-negativas e vancomicina 30 µg para cepas gram-positivas. Alíquotas de 20 µL das amostras (filtrado dos resíduos de laranja) foram pipetados nas placas com as estirpes indicadoras a cada 1 hora por 3 horas. Após o tempo de cultivo, cada aplicação as placas foram incubadas na temperatura ótima para cada micro-organismo por 24 horas. Subsequentemente, foi observada a atividade inibidora contra o indicador bacteriano representada pela presença de halos claros que foram medidos e apresentados como zona de inibição em mm.

Para determinar a atividade antifúngica os fungos *Fusarium oxysporum* ssp. (IOC 4065), *Aspergillus fumigatus* (IOC 0081), *Penicillium expansum* (IOC 4076) e *Candida albicans* (IOC 2508) foram utilizados como indicadores. Cada fungo foi cultivado em *slant* de *Potato Dextrose Agar* (PDA) por 5 dias a 30°C, após foram adicionados 6 mL de água destilada esterilizada em cada *slant*. O crescimento foi homogeneizado com o auxílio de uma alça e espraído em placas de PDA. O teste foi realizado da mesma forma que o teste antibacteriano, utilizando discos de difusão sobre os quais foram pipetadas as amostras. As placas foram incubadas por 72 horas a 30°C e foi observada a atividade inibidora contra o indicador fúngico representada pela presença de halos claros. Como controle negativo foi utilizado solução salina e como controle positivo foi utilizado anfotericina B (1 µg/mL).

4.14 Avaliação da citotoxicidade – teste de viabilidade celular por meio da redução de MTT

Os ensaios de citotoxicidade foram realizados em colaboração com grupo liderado pelo Prof. Dr. Willian Fernando Zambuzzi do Laboratório de Bioensaios e Dinâmica Celular – LaBio – Instituto de Biociências de Botucatu, utilizando a metodologia segundo Gökbulut et al. (2016), Brackett et al. (2012) e Farquharson et al. (1993). Linhagens de fibroblastos de camundongo normal NIH/3T3, queratinócitos humanos normais HaCaT e tumoral SCC9 (carcinoma epidermóide bucal) foram mantidas em *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 100 µg/mL de sulfato de estreptomicina e 100 U/mL de penicilina (antibióticos) e mantidas em estufa úmida a 37°C contendo 5% de CO₂. Para manutenção da linhagem tumoral, SCC9, o meio de cultura foi suplementado adicionando-se 400 ng/mL de hidrocortisoma.

Para cada composto proveniente dos resíduos de laranja, foram testados 3 volumes diferentes: 10 µL (5%), 20 µL (10%) e 40 µL (20%). Paralelamente, as células das linhagens (NHI-3t3, HaCaT e SCC9) foram plaqueadas em placas de 96 poços, com meio convencional; a cada poço foi adicionado 100 µL (10.000 células). Após 24 horas, o tratamento de cada composto foi realizado adicionando volumes específicos e meio de cultura DMEM para um volume final de 200 µL por poço (a saber: 90 µL, 80 µL e 60 µL).

O controle foi definido como as células em meio convencional que não receberam o tratamento com os resíduos de laranja. Os grupos foram as células que receberam o tratamento com os resíduos de laranja em diferentes concentrações.

Para realização dos testes de viabilidade celular, as células foram plaqueadas em microplacas de 96 poços a uma densidade de 1×10^4 células por poço em meio DMEM suplementado. Ao atingirem a semi-confluência (24 horas após o plaqueamento), as células foram expostas aos extratos dos resíduos de laranja em diferentes concentrações, diluídos em meio DMEM suplementado com 10% SFB e antibióticos, exceto para as células SCC9, as quais foram mantidas as condições ideais de cultura preconizadas pela ATCC (400 ng/mL). Após 24 horas a viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio de redução do MTT (*3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide*) (Figura 2).

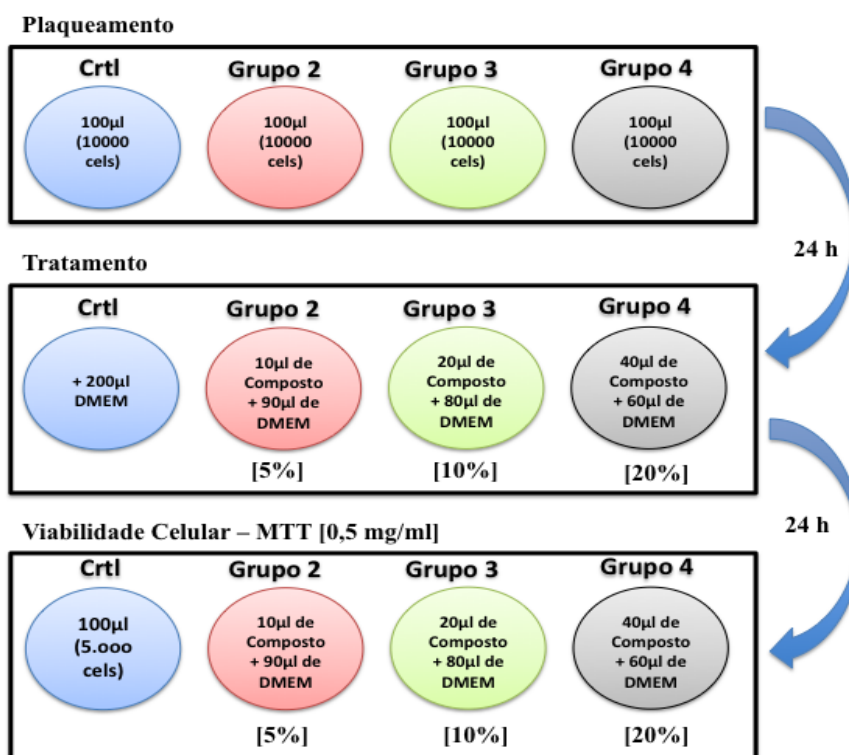


Figura 2. Esquema sinalizando os momentos em horas (h) de cada processo do MTT. As células foram plaqueadas 48 horas antes da avaliação da viabilidade celular.

4.15 Análise estatística

Os dados da atividade de lipase foram avaliados pelo programa Assistat 7.7 pt. O experimento foi delineado em arranjo fatorial duplo (4x4, quatro variedades e quatro frações), os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias

foram comparadas pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). As análises foram realizadas em triplicata.

O teste de especificidade de lipases foi realizado em triplicata e determinado o desvio padrão.

O experimento do teor de umidade dos resíduos de laranja foi realizado em triplicata, os dados foram analisados pelo programa Assistat 7.7 pt, submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

A análise para teor de fenóis totais foi realizada em triplicata e determinado o desvio padrão.

O teste de teor de flavonoides totais foi conduzido em triplicata e analisados pelo programa Assistat 7.7 pt, em arranjo fatorial duplo (4x4, quatro variedades e quatro frações), os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Os dados da atividade antioxidante foram analisados pelo programa Assistat 7.7 pt, submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$), também foi determinado o desvio padrão. As análises foram feitas em triplicata.

A atividade antimicrobiana foi realizada em duplicata, o indicador antimicrobiano foi a presença de halos claros que foram medidos e apresentados como zona de inibição em mm.

Para a análise do teste de citotoxicidade foi utilizado o Software *Prism 6* e aplicados os testes ANOVA e Tukey. Para cada grupo foi realizado um conjunto de replicatas (3 experimentos independentes) com $n = 9$ para cada experimento.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Atividade de lipases dos resíduos de laranja

A atividade de lipase mensurada foi a sua capacidade de hidrolisar os triglicerídeos de óleo de oliva presentes no meio reacional (Tabela 3).

Tabela 3. Atividade de lipase relacionando variedades e frações de laranja.

Frações Variedades	Atividade de lipase (U/g)			
	Bagaço	Casca	Frit	Polpa
Hamlin	27,45 ± 1,6 aA	17,48 ± 1,7 aB	9,27 ± 1,7 bC	31,13 ± 2,1 aA
Pêra	17,26 ± 1,7 bcA	16,13 ± 1,2 aA	19,10 ± 4,4 aA	2,12 ± 1,1 cB
Valência	22,64 ± 1,3 abAB	17,69 ± 2,1 aB	19,60 ± 1,7 aB	28,80 ± 3,9 aA
Natal	13,87 ± 2,5 cAB	12,73 ± 4,1 aAB	11,53 ± 3,5 bB	19,24 ± 2,1 bA

Médias seguidas de letra maiúscula horizontalmente e minúscula verticalmente, iguais não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

± Desvio padrão.

Todas as variedades de laranja demonstraram a presença de lipases. Para as variedades Hamlin, Valência e Natal é a primeira vez que se observa a atividade dessa enzima.

As lipases da variedade Hamlin e Valência, das frações bagaço e polpa foram as que apresentaram as maiores atividades enzimáticas. Na fração casca, as médias de atividade de lipase entre as variedades foram estatisticamente iguais entre si, o que indica a presença de enzimas semelhantes na casca de todas as variedades. As lipases da fração frit apresentaram as maiores atividades nas variedades Pêra e Valência. Apesar da menor atividade de lipase ter sido apresentada pela polpa da variedade Pêra, é a primeira vez que lipases são detectadas nessa fração.

Entre as frações, as atividades de lipases foram bastante diversas, provavelmente, as frações residuais distintas da laranja possuam lipases diferentes, afinal cada repartição morfológica tem uma função no metabolismo do fruto.

Lipases fúngicas de *Candida rugosa* obtidas por fermentação líquida na presença de óleos residuais, segundo Abdelmoez et al. (2013) apresentaram 12 U/mL de atividade de hidrólise do azeite de oliva. Além desse processo de obtenção de lipase ser bastante oneroso e exigir maquinário específico, as atividades lipolíticas foram inferiores às encontradas nos resíduos de laranja.

O farelo de trigo foi utilizado por Colla et al. (2015) na obtenção de lipases fúngicas por fermentação em estado sólido com *Aspergillus niger* e fermentação submersa com *Aspergillus flavus*, as quais apresentaram 22,1 U/g e 4,3 U/mL de atividade de lipase, respectivamente. As lipases obtidas por fermentação submersa demonstraram atividade inferior, comparada com as lipases obtidas da fermentação sólida. As lipases de *A. niger* obtidas por fermentação em estado sólido apresentaram atividade similar com as lipases do bagaço de laranja da variedade Valência 22,6 U/g e inferior às lipases do bagaço da variedade Hamlin 27,4 U/g, obtidas nesse estudo. Porém, as lipases vegetais dos resíduos de laranja são mais vantajosas no seu processo de obtenção, que não exige associação com micro-organismos, reator e tempo de incubação.

Extrato de sementes de mamona (*Ricinus communis* L.) apresentou 61 U/g de atividade lipolítica segundo Avelar et al. (2013) na hidrólise do óleo de oliva. Esse dado corrobora com Quettier e Eastmond (2009) sobre a presença de lipases em tecidos de reserva de plantas, como as sementes e ainda demonstra o potencial de lipases de origem vegetal, como as encontradas nos resíduos de laranja.

No estudo de Okino-Delgado e Fleuri (2014), foram analisados os resíduos da variedade Pêra quanto à atividade de lipase e foram obtidos 36,5 U/g, 57,5 U/g e 22,9 U/g de lipase para bagaço, casca e frit, respectivamente. Comparando a mesma variedade e frações neste trabalho, foram obtidas atividades enzimáticas inferiores, provavelmente devido às diferenças entre as safras.

5.2 Caracterização de lipases presente nos resíduos de laranja

A caracterização a seguir foi realizada com os resíduos de laranja das variedades Valência e Natal. Os resíduos de Hamlin e Pêra foram caracterizados em estudos anteriores e/ou concomitantes por outros pesquisadores.

5.2.1 Influência do pH na atividade de lipase dos resíduos de laranja

Os resíduos de laranja da variedade Valência, apresentaram pH ótimo de atividade diferentes (Figura 3).

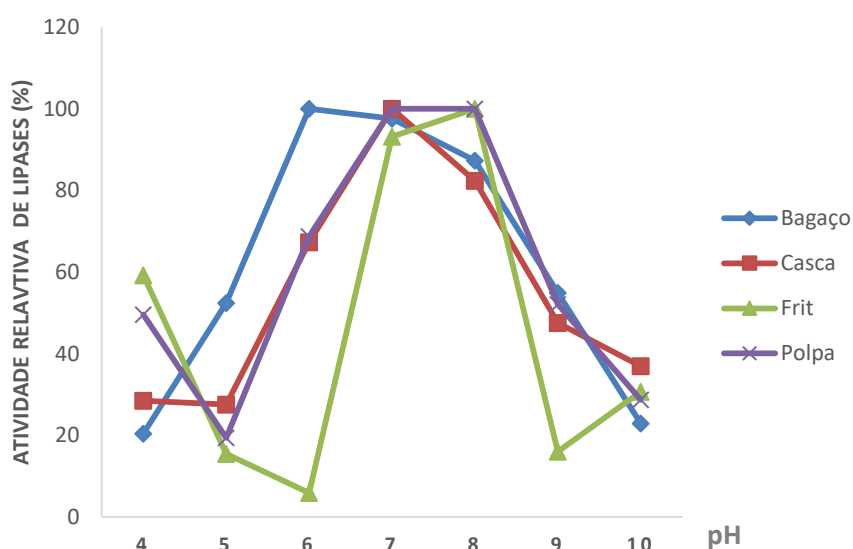


Figura 3. pH ótimo das lipases obtidas de resíduos de laranja da variedade Valência.

As lipases dos resíduos da variedade Valência mantiveram sua atividade para pH ótimo acima de 70% em pH neutro. A lipase do bagaço apresentou pH ótimo na faixa de 6 e 7, mantendo cerca de 85% da sua atividade catalítica em pH 8. A lipase da casca demonstrou atividade acima de 65% do pH 6 ao 8, sendo que sua atividade relativa máxima foi atingida em pH 7, correspondendo portanto, ao pH ótimo. A lipase do frit exibiu pH ótimo em 8, 93% de atividade relativa em pH 7 e obteve 60% de atividade em pH 4. A lipase da polpa apresentou uma semelhança com a lipase do frit, com pH ótimo entre 7 e 8, e uma atividade de quase 50% em pH 4.

As lipases de bagaço e polpa demonstraram estabilidade no pH 6. O pH 7 conferiu estabilidade para a lipase de casca e a lipase do frit apresentou estabilidade em pH 5 (Figura 4).

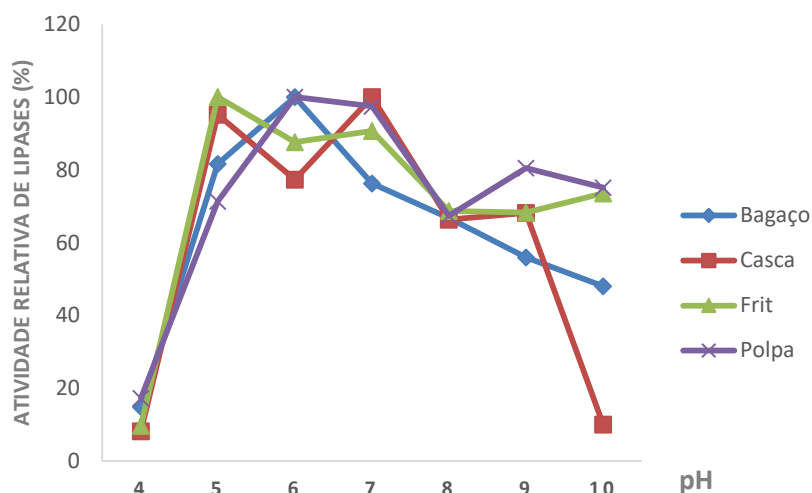


Figura 4. pH de estabilidade das lipases obtidas de resíduos de laranja da variedade Valência.

É possível observar ainda que as lipases da variedade Valência demonstraram faixas de estabilidade entre os pHs 5 e 8 com atividade acima de 65%, para todas as frações estudadas.

Os resíduos da variedade Natal, as lipases de bagaço, casca e frit apresentaram pH ótimo em 8, sendo que a lipase de polpa atingiu sua maior atividade em pH 6. (Figura 5).

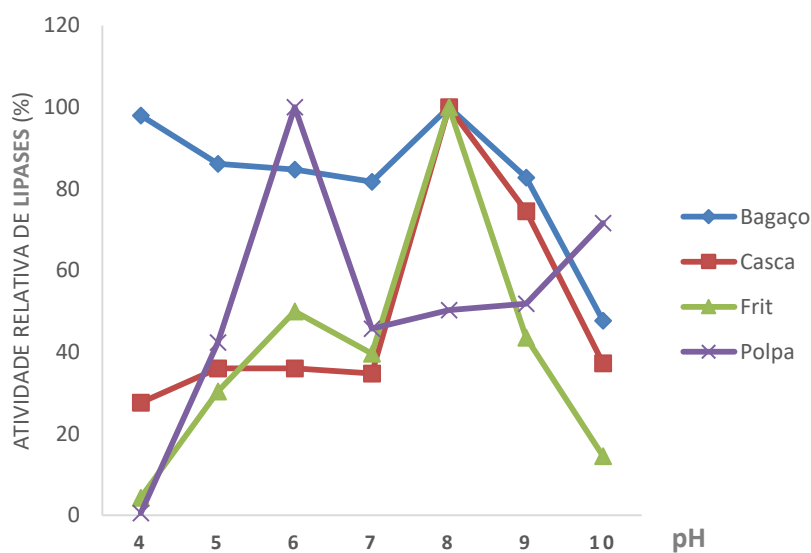


Figura 5. pH ótimo das lipases obtidas de resíduos de laranja da variedade Natal.

As lipases do bagaço de laranja Natal apresentaram uma faixa de pH ótimo do 4 ao 9 com atividades de lipase acima de 80%, demonstrando a presença de lipases com capacidade de atuar em diversos pHs.

O pH de estabilidade foi variado: a lipase do bagaço apresentou 100% de atividade relativa em pH 4 e 81% de atividade em pH 7. A lipase da casca apresentou estabilidade em pH 7. O pH 6 conferiu estabilidade para a lipase de frit. A lipase de polpa demonstrou sua estabilidade em pH 9 (Figura 6).

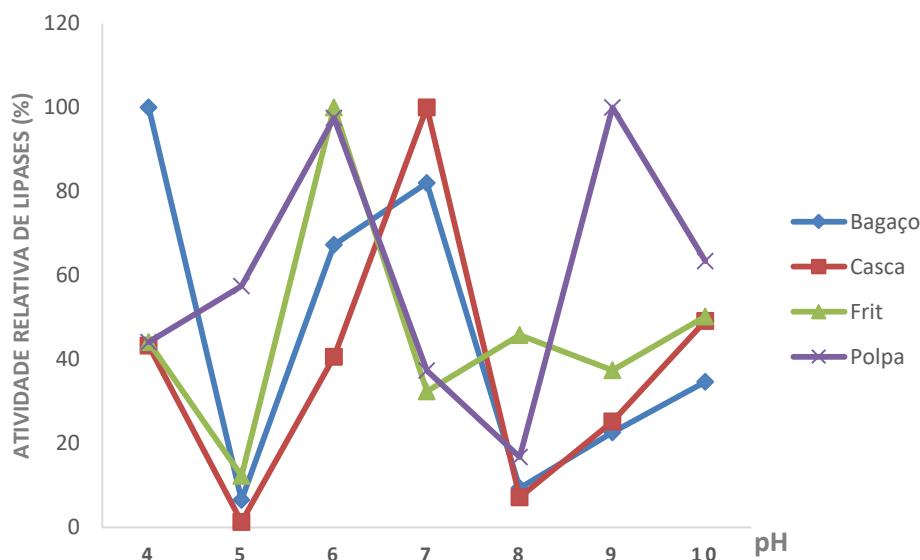


Figura 6. pH de estabilidade das lipases obtidas de resíduos de laranja da variedade Natal.

Os resíduos da laranja Valência apresentaram comportamento bem distinto dos resíduos da laranja Natal quanto à estabilidade. O primeiro apresenta uma faixa de estabilidade do pH 4 ao pH 8 acima de 60% de atividade relativa, enquanto o segundo registra picos isolados de estabilidade, o que sugere a presença de isoformas de lipases.

A lipase presente na semente de canola (*Brassica Napus* L.) apresentou seu pH ótimo em 7 (SANA et al. 2004), sendo o mesmo pH ótimo encontrado para as lipases presentes na casca e polpa da laranja Valência. A enzima lipolítica caracterizada por Weerasooriya e Gunasekara (2011) de semente de seringueira (*Hevea brasiliensis*) exibiu pH ótimo 8, como as lipases encontradas no bagaço, casca e frit da laranja Natal.

A lipase fúngica *Rhizomucor miehei* comercialmente disponível (*Lipozyme–Novozymes*) apresentou atividade máxima em pH 7,5 (RODRIGUES e FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010; CROOKS et al., 1995), característica semelhante às encontradas nas lipases presentes nos resíduos de laranja.

Enzimas lipolíticas estudadas por Kouteu et al. (2016) presentes em quatro espécies de árvores (*Adansonia grandidieri*, *Adansonia suarezensis*, *Jatropha curcas* e *Jatropha mahafalensis*), apresentaram pH ótimo em 8, similares as lipases registradas nos resíduos de laranja Valência (frit) e de laranja Natal (bagaço, casca e frit). No

entanto, essas árvores são bastante restritas à algumas regiões e contam com mais uma desvantagem, são espécies ameaçadas de extinção, o que limita seu uso para a produção de um biocatalisador comercial.

5.2.2 Influência da temperatura na atividade de lipase dos resíduos de laranja

As lipases dos resíduos da laranja Valência apresentaram temperatura ótima em uma faixa de 30°C a 60°C. Nesse intervalo de temperatura as lipases de todas as frações residuais mantiveram atividade relativa acima de 70%. As lipases do bagaço, casca, frit e polpa, apresentaram temperaturas ótimas, respectivamente, a 30°C, 50°C, 60°C e 60°C (Figura 7).

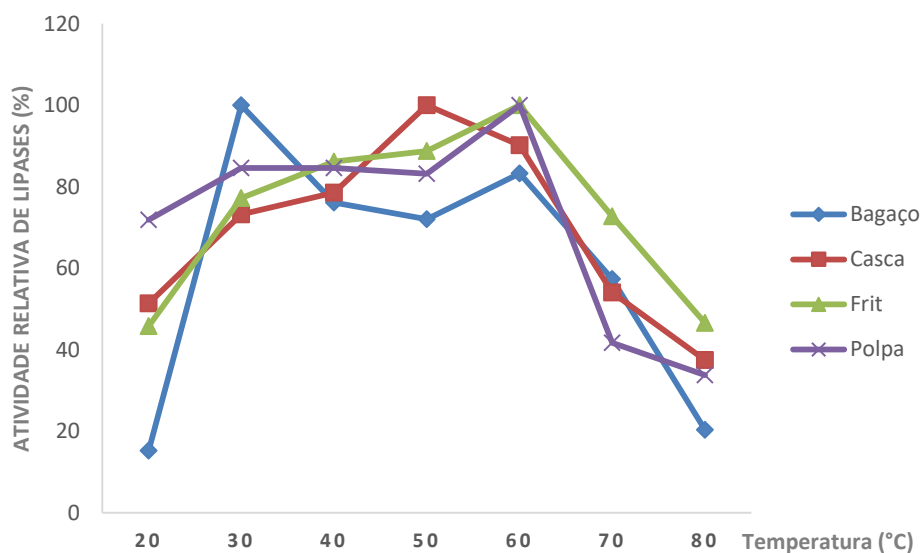


Figura 7. Temperatura ótima das lipases obtidas de resíduos de laranja da variedade Valência.

A temperatura de estabilidade para as lipases do bagaço e frit ocorreu a 30°C, para as lipases de casca e polpa as temperaturas de estabilidade foram a 50°C e 20°C, respectivamente (Figura 8).

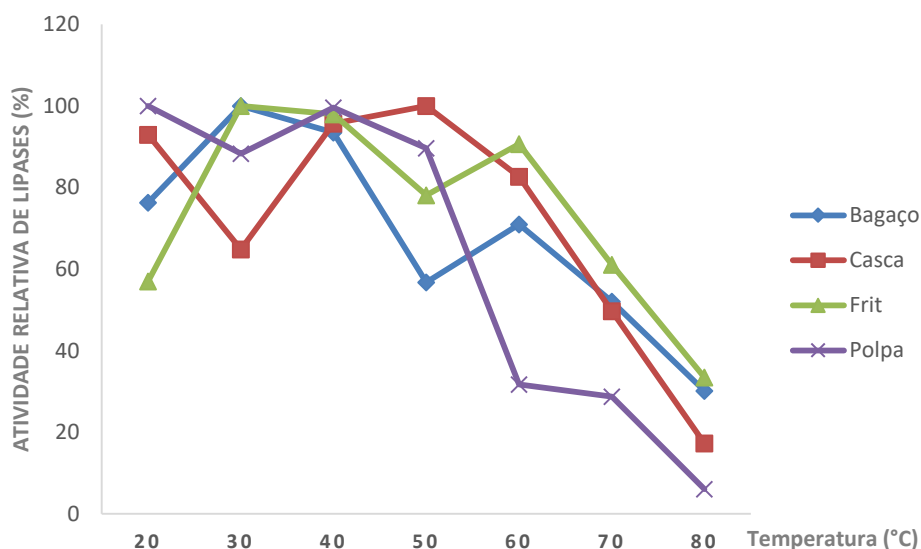


Figura 8. Temperatura de estabilidade das lipases obtidas de resíduos de laranja da variedade Valência.

As lipases do bagaço de laranja Valência ainda exibiram uma atividade acima de 90% entre 30° e 40°C, as lipases de casca apresentaram estabilidade com atividades acima de 80% na faixa de 20 a 60°C, as lipases de frit apresentaram uma faixa de estabilidade com atividades acima de 70% em temperaturas mais altas (40 a 60°) e as lipases de polpa demonstraram um intervalo de atividade acima de 90% nas temperaturas de 20 a 50°C.

As lipases de todas as frações da laranja Natal demonstraram temperatura ótima a 50°C (Figura 9).

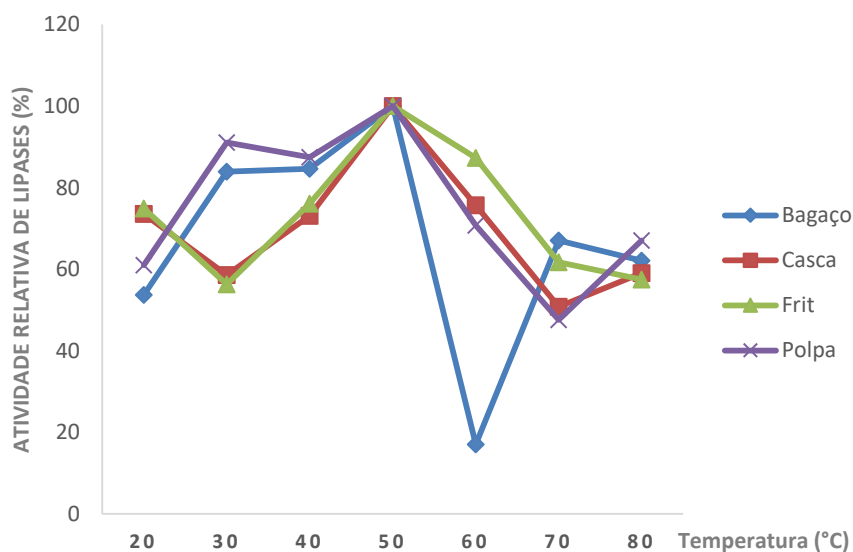


Figura 9. Temperatura ótima das lipases obtidas de resíduos de laranja da variedade Natal.

As lipases da variedade Natal de bagaço e polpa, exibiram uma faixa de temperatura ótima com atividades acima de 75% nas temperaturas de 30 a 50°C.

Já a temperatura de estabilidade para a lipase do bagaço foi a 20°C e para as lipases das demais frações a 30°C (Figura 10).

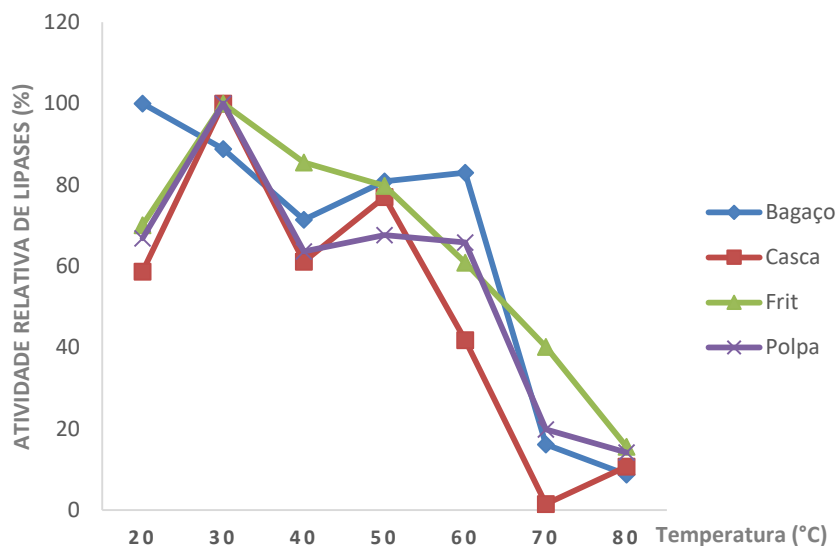


Figura 10. Temperatura de estabilidade das lipases obtidas de resíduos de laranja da variedade Natal.

As atividades lipolíticas dos resíduos de laranja Valência e Natal, revelaram um extenso intervalo (20° a 60°C) com atividade relativa acima de 50%.

Com temperatura a 40°C as lipases pertencentes a variedade Valência apresentaram o mesmo comportamento das lipases da variedade Natal, com atividades de lipase de aproximadamente 80% em todas as frações. Em temperaturas de 70 a 80°C durante 1 hora, as atividades decrescem, demonstrando que as enzimas presentes nos resíduos de laranja das variedades Valência e Natal apresentaram baixa estabilidade nessas condições.

Analisando a atividade de lipase das sementes de mamona, milho, girassol e maracujá em diferentes temperaturas, Santos et al. (2013) observaram as melhores atividades catalíticas a 40°C para semente de maracujá; 50 °C para mamona e girassol e 55°C para milho. Apenas a lipase da semente de mamona apresentou uma faixa de 40 a 55°C de atividade acima de 80% e todas apresentaram decaimento da atividade a 60°C, semelhante às lipases encontradas nos resíduos de laranja.

As lipases encontradas nos resíduos de laranja demonstraram atividade em extensas faixas de pH e temperatura, o que lhes confere diversas possibilidades de aplicação, como as sugeridas por Choi et al. (2015).

Na tabela a seguir (Tabela 4), é possível observar as atividades de lipases obtidas dos resíduos de laranja em diferentes condições de ensaio.

Tabela 4. Atividades de lipases dos resíduos de laranja em diferentes condições de ensaio.

Condições	Frações Variedades	Atividade de lipase (U/g amostra)			
		Bagaço	Casca	Frit	Polpa
Padrão	Valência	22,64 ± 1,3	17,69 ± 2,1	19,60 ± 1,7	28,80 ± 3,9
	Natal	13,87 ± 2,5	12,73 ± 4,1	11,53 ± 3,5	19,24 ± 2,1
pH ótimo	Valência	22,36 ± 1,4	23,35 ± 1,4	26,04 ± 0,2	25,12 ± 0,6
	Natal	14,36 ± 2,1	22,78 ± 1,7	30,71 ± 0,6	23,21 ± 0,6
pH ótimo e Temperatura ótima	Valência	27,88 ± 7,8	31,70 ± 1,5	37,86 ± 1,3	41,25 ± 1,2
	Natal	20,17 ± 2,9	27,31 ± 1,3	36,58 ± 3,4	34,82 ± 1,5

± Desvio padrão.

Padrão (pH 7, 40°C); pH ótimo (Valência: bagaço pH 6, casca pH 7, frit pH 8 e polpa pH 7 e 8), (Natal: bagaço, casca e frit pH 8 e polpa pH 6); pH ótimo e temperatura ótima (Valência: bagaço pH 6, 30°C; casca pH 7, 50°C; frit pH 8, 60°C e polpa pH 7, 60°C), (Natal: bagaço, casca e frit pH 8, 50°C e polpa pH 6, 50°C).

Otimizando as condições de ensaio foi possível detectar aumento na atividade catalítica das lipases de todas as frações residuais, primeiro definindo o pH ótimo e em seguida, combinando esse parâmetro à temperatura ótima. As lipases do frit da laranja Natal, por exemplo, em condições ótimas triplicaram sua atividade em relação à atividade nas condições padrões.

Quando se pensa em aplicar uma biomolécula em grande escala, existem alguns fatores que precisam ser levados em consideração. A produção de laranja para suco utiliza diferentes variedades de laranja ao longo do ano, para que seu ciclo seja completo e tenham o produto durante o ano todo. O interesse é utilizar os resíduos dessas laranjas, para obter um biocatalisador com potencial comercial, portanto, é preciso saber se todas as variedades oferecem essas lipases para possibilitar uma oferta contínua. Por isso, analisar as quatro principais variedades de laranja comerciais e seus diferentes resíduos separadamente, confere-nos a possibilidade de vislumbrar quais são as particularidades de cada variedade e resíduo, assim como, identificar de qual biocatalisador se trata e prever uma possível aplicação, que envolve os parâmetros bioquímicos que foram estudados.

5.3 Especificidade das lipases dos resíduos de laranja quanto ao tamanho de cadeia do substrato

As lipases dos resíduos de laranja demonstraram as maiores atividades enzimáticas na hidrólise do substrato *p*-NPB ácido graxo de cadeia curta (Figura 11).

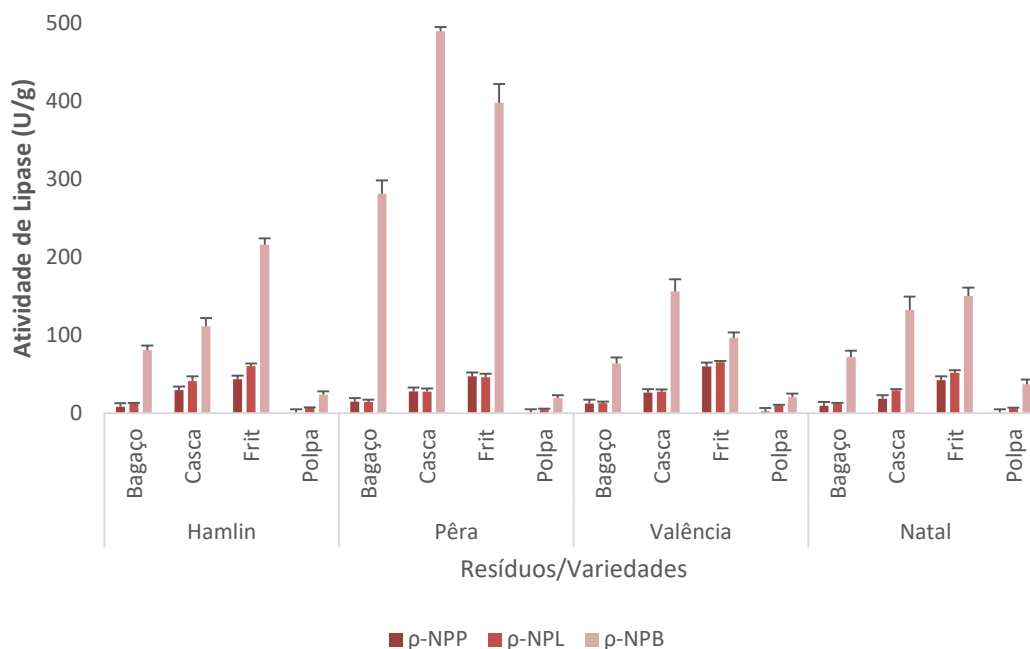


Figura 11. Especificidade das lipases sobre substratos sintéticos de diferentes tamanhos de cadeia carbônica. Sendo *p*-nitrofenil palmitato (*p*-NPP), *p*-nitrofenil laurato (*p*-NPL) e *p*-nitrofenil butirato (*p*-NPB).

As enzimas dos resíduos da laranja da variedade Pêra, bagaço, casca e frit apresentaram atividades de 281,2 U/g; 489,7 U/g e 397,6 U/g, respectivamente, na hidrólise do *p*-NPB. As lipases presentes nas outras variedades, apesar de exibirem menores atividades, também demonstraram especificidade por este substrato.

Lipases fúngicas de *Aspergillus* sp. obtidas a partir de diferentes meios de cultura como farelo de trigo (LWB), farelo de soja (LSB) e farelo de soja + bagaço de cana-de-açúcar (LSBBC) por Fleuri et al. (2014a) apresentaram atividades sobre os diferentes substratos sintéticos de ácido graxo *p*-NPB, *p*-NPL e *p*-NPP. A lipase LWB apresentou 2,84 U/mL; 0,99 U/mL e 0,24 U/mL, respectivamente; enquanto que a LSB demonstrou 1,53 U/mL; 0,60 U/mL e 0,18 U/mL para *p*-NPB, *p*-NPL e *p*-NPP, nessa ordem. Já a lipase LSBBC exibiu atividades sobre o *p*-NPB, *p*-NPL e *p*-NPP 4,05 U/mL; 0,39 e 1,36 U/mL, respectivamente. Observando os dados, essas lipases fúngicas também apresentaram suas maiores atividades de hidrólise pelo substrato *p*-NPB.

Alguns pesquisadores definem enzimas que hidrolisam exclusivamente ácidos graxos de cadeia curta como esterases (CHAHINIAN e SARDA, 2009). No caso das enzimas encontradas nos resíduos de laranja, não podemos atribuir essa classificação, pois apesar de exibir maiores atividades de hidrólise sobre o substrato de cadeia curta *p*-NPB, elas também hidrolisaram outros substratos (*p*-NPL e *p*-NPP). Além disso, segundo Fleuri (2016) essa definição de esterases e lipases não deve ser unicamente determinada pela atuação das lipases em substratos sintéticos, e sim por uma análise global utilizando procedimentos mais acurados.

Apesar das lipases obtidas dos resíduos de laranja estarem em seu estado bruto, podendo, portanto, apresentar diferentes lipases, Fleuri (2016) sugere que há possibilidade de que uma mesma enzima possa exercer diversas ações sobre diferentes substratos.

Lipases que hidrolisam ácidos graxos de cadeia curta são bastante interessantes para a indústria alimentícia. Ferreira-Dias et al. (2013) salientam que enzimas com essa característica são empregadas na modificação do aroma e sabor dos alimentos originando um gosto agudo e picante, principalmente a derivados de leite como queijos e manteiga.

5.4 Regioespecificidade das lipases dos resíduos de laranja

As enzimas presentes nos resíduos de laranja demonstraram comportamentos parecidos entre as frações residuais e variedades de que são provenientes (Tabela 5).

Tabela 5. Regioespecificidade de lipases obtidas de resíduos do processamento de laranja.

Legenda	Lipases	Monoleína	Dioleína	Trioleína	Ác. Oleico	Ác. Esteárico	Especificidade
1	Bagaço Hamlin	++	+++	+++	+	+++	1,3
2	Casca Hamlin	++	+++	+++	++	++	1,3
3	Frit Hamlin	++	++	++	++	-	1,3
4	Polpa Hamlin	++	++	+++	+	+++	1,3
5	Bagaço Pêra	++	+++	+++	++	+++	1,3
6	Casca Pêra	++	+++	+++	+++	++	1,3
7	Frit Pêra	++	+++	+++	++	-	1,3
8	Polpa Pêra	++	+++	+++	++	+++	1,3
9	Bagaço Valência	++	+++	+++	++	+++	1,3
10	Casca Valência	++	++	+++	+	+	1,3
11	Frit Valência	+	+	++	-	-	1,3
12	Polpa Valência	+	+++	+++	+	+++	1,3
13	Bagaço Natal	++	+	++	+	+	1,3
14	Casca Natal	++	++	+++	+	+	1,3
15	Frit Natal	++	++	+++	+	-	1,3
16	Polpa Natal	++	+++	+++	++	++	1,3
17	<i>Rhizomucor miehei</i> *	++	++	++	+	+	1,3

* Padrão comercial.

(+) Intensidade visual do *spot* na CCD, sendo quando maior o número, maior a intensidade.

(-) Intensidade não sinalizada.

A placa de cromatografia em camada delgada (Figura 12), relacionada com a legenda apresentada na Tabela 6, identifica os *spots* formados pelos produtos de reação de cada resíduo de laranja e sua variedade. As literaturas consultadas Meghwanshi et al. (2006) e Lanser et al. (2002), também apresentaram produtos de hidrólise da trioleína e padrões que auxiliaram na identificação da regioespecificidade das lipases.

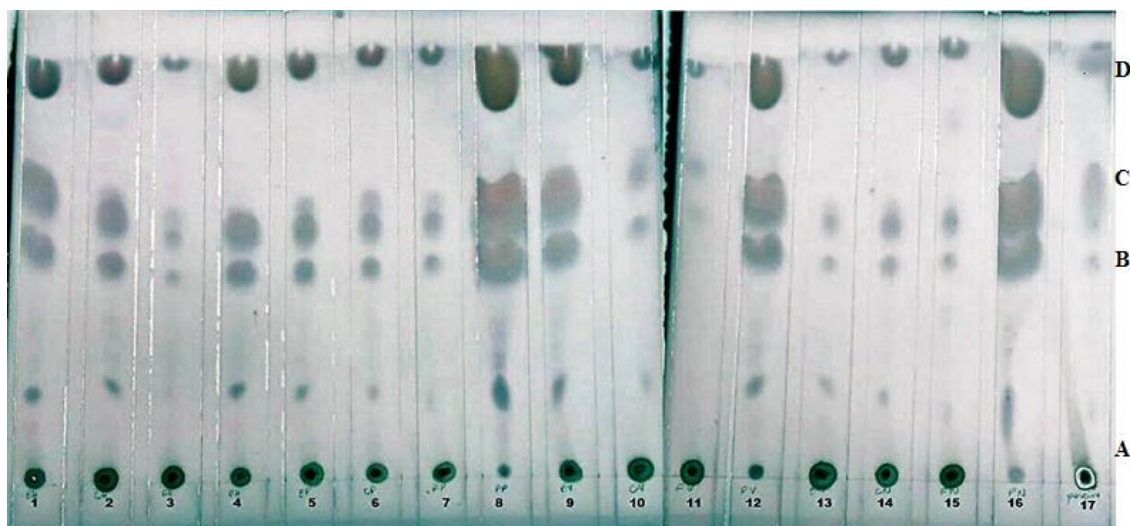


Figura 12. Produtos de reação da hidrólise da trioleína realizada por lipases de diferentes resíduos de laranja e lipase comercial.

Sendo: bagaço Hamlin (1), casca Hamlin (2), frit Hamlin (3), polpa Hamlin (4), bagaço Pêra (5), casca Pêra (6), frit Pêra (7), polpa Pêra (8), bagaço Valência (9), casca Valência (10), frit Valência (11), polpa Valência (12), bagaço Natal (13), casca Natal (14), frit Natal (15), polpa Natal (16) e lipase comercial *Rhizomucor miehei* (17). *Spots* referentes aos produtos de degradação da trioleína pela lipase 1,3 específica de *Rhizomucor miehei*: Monoleína (A), Dioleína (B), Ácido oleico (C) e Trioleína (D).

A enzima comercial *Rhizomucor miehei* foi utilizada como padrão para lipase 1,3 regioespecífica e os *spots* apresentados foram correspondentes aos demonstrados por Meghwanshi et al. (2006) que também utilizou esta lipase como padrão.

Os produtos de hidrólise da trioleína por todas as lipases dos resíduos de laranja mostraram *spots* correspondentes aos padrões monoleína, dioleína, ácido oleico e trioleína, compatíveis com o produto de hidrólise da enzima comercial utilizada como padrão, indicando que as enzimas oriundas dos descartes de laranja são lipases 1,3 específicas.

As amostras de bagaço, casca e polpa de todas as variedades apresentaram *spots* iniciais ausentes na fração frit. Esses *spots* comparados com os padrões propostos por Lanser et al. (2002), sugerem que sejam o ácido esteárico (ácido graxo de cadeia longa com 18 carbonos) que é comum entre óleos vegetais.

Saxena et al. (2010) e Meghwanshi et al. (2006) estudaram a regioespecificidade de lipases provenientes de *Bacillus* sp. de diferentes espécies, e Lanser et al. (2002) analisaram a especificidade de algumas espécies de fungos. Todas lipases se comportaram como 1,3 específicas, corroborando a análise de Mhetras et al. (2009), de que a maioria das lipases microbianas demonstram especificidade pela posição 1,3;

característica compartilhada com as lipases de origem vegetal obtidas dos resíduos de laranja.

Lipases 1,3 regioespecíficas têm sido aplicadas com sucesso na síntese de lipídios estruturados (FERREIRA-DIAS et al., 2013), uma aposta para produzir lipídios com atividades biológicas e industriais eficientes.

Os resíduos de laranja mostraram-se uma fonte de lipases com características regioespecíficas semelhantes às lipases já comercializadas.

5.5 Atividade de protease dos resíduos de laranja

Utilizando as metodologias descritas não foi obtido atividade de protease nos resíduos de laranja.

A presença de proteases em citros foi observada por Mazorra-Manzano et al. (2013) que utilizaram as proteases presentes na flor de *Citrus aurantium* L. (laranja azeda) para a coagulação do leite. Os resíduos que foram testados quanto à atividade de proteases nesse presente estudo, são provenientes do fruto, provavelmente, nessa fase da vida da planta as proteases não estejam mais presentes.

Atallah et al. (2016) observaram o mecanismo de proteases em *Citrus macrophylla* infectadas por *Citrus tristeza virus*, Fedatto et al. (2006), identificaram a presença de serina-proteases em citros contaminados pela bactéria *Xylella fastidiosa*.

Cisteínas-proteases foram registradas por Fan et al. (2009) na casca de laranjas (*Citrus sinensis* L. Osbeck) após a indução de senescência do fruto utilizando etileno, Lee et al. (2015) observaram a presença de proteases no pepino (*Cucumis sativus* L.), quando o fruto já alcançava um estágio de senescência e a elevadas quantidades de etileno.

Não registrar atividade de protease nos resíduos de laranja fomenta possibilidades como o emprego de outras metodologias para sua determinação, aponta uma característica dessas variedades de laranja estudadas sadias, sem contaminação microbiana e com estágio não condizente com a floração e/ou senescência.

5.6 Teor de umidade dos resíduos de laranja

A quantidade de água presente, nesse caso nos resíduos também serve como um padrão de caracterização. Na Tabela 6 estão as porcentagens do teor de umidade dos resíduos de laranja.

Tabela 6. Teor de umidade dos resíduos de laranja de diferentes variedades.

Variedades	Teor de umidade (%)			
	Hamlin	Pêra	Valência	Natal
Frações				
Bagaço	80,6 ± 0,3 aB	74,1 ± 0,7 cB	75,6 ± 0,6 bC	76,8 ± 1,8 bB
Casca	75,9 ± 0,6 aC	69,6 ± 0,6 cC	72,2 ± 0,4 bD	65,1 ± 0,3 dC
Frit	77,3 ± 1,0 aC	74,8 ± 0,2 bB	78,3 ± 0,1 aB	77,4 ± 0,4 aB
Polpa	85,3 ± 0,2 aA	82,2 ± 0,1 bA	83,3 ± 0,1 bA	83,1 ± 0,3 bA

Médias seguidas de letra maiúscula verticalmente e minúscula horizontalmente, iguais não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

± Desvio padrão.

O teor de umidade das frações residuais foi bastante parecido entre as variedades, sendo que na fração bagaço houve uma variação de pouco mais de 5% entre as variedades. Para a casca essa variação foi de aproximadamente 10%. As frações residuais frit e polpa demonstraram, respectivamente, as menores variações no teor de umidade entre variedades ficando entre 4% e 3%.

Comparando à literatura, Mendonça et al. (2006), analisaram os resíduos do limão Tahiti (*Citrus latifolia*) e registraram um teor de umidade do bagaço de 81% e para casca de 71%. O bagaço de laranja doce, avaliado por Silva et al. (2014a), apresentou 85% de umidade. Cascas de laranja provenientes de processos industriais também foram analisadas por Curto et al. (1992) que determinaram 82% de teor de umidade para essa fração. Esses resultados são similares para o de bagaço e casca de laranja das variedades estudadas.

5.7 Teor dos fenóis totais dos resíduos de laranja

Baseado no estudo de identificação de ácidos fenólicos de Wang et al. (2008) com casca de laranja doce (*C. sinensis* L. Osbeck) que revelou elevadas quantidades do ácido *p*-cumárico, foi proposto que os resíduos de laranja fossem quantificados por equivalente de ácido *p*-cumárico, como hipótese de que o mesmo seria eficiente para determinação dos fenóis totais em tais amostras. Portanto, os resultados foram expressos em equivalente de ácido *p*-cumárico (ACE/100g⁻¹) por estar presente em maior quantidade na espécie analisada e em equivalente de ácido gálico (AGE/100g⁻¹) por ser o mais comum na literatura.

Na Figura 13, é possível avaliar a diferença entre a concentração dos fenóis totais nas amostras quando expressos em equivalente de ácidos *p*-cumárico e gálico.

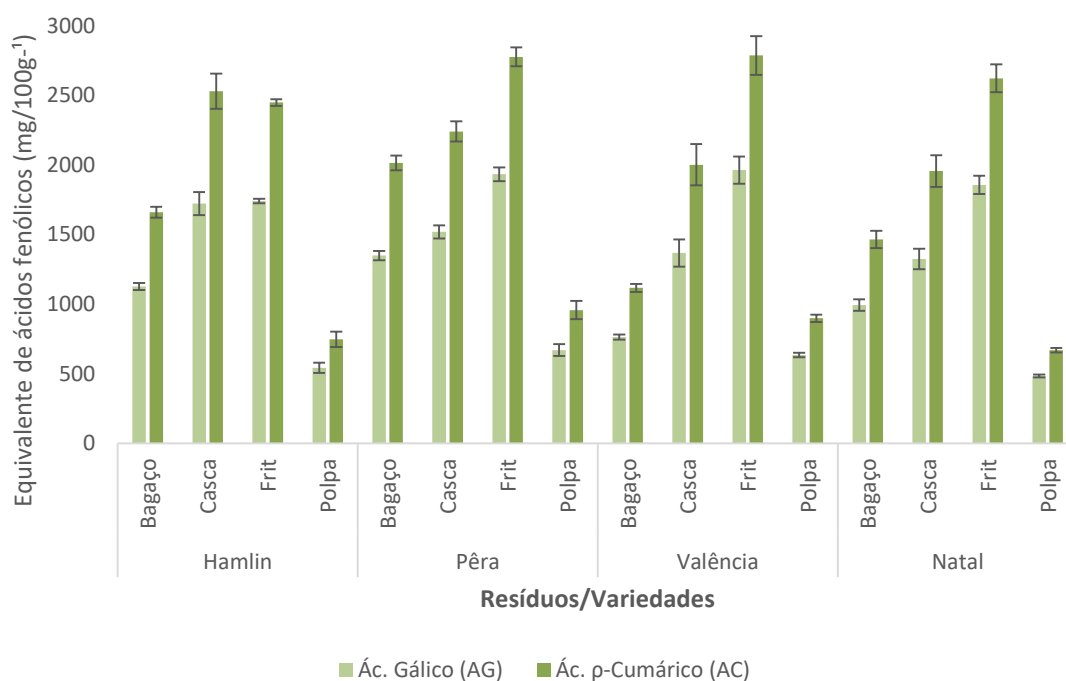


Figura 13. Teor de fenóis totais expressos em (ACE/100g⁻¹) e (AGE/100g⁻¹). Médias seguidas de letra maiúscula (frações residuais) e minúscula (variedades) iguais não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

O resultado expresso em (ACE/100g⁻¹) se mostrou mais abrangente na quantificação de fenóis totais dos resíduos de laranja doce. Os ácidos fenólicos são divididos entre ácidos hidroxibenzoicos (6 átomos de carbono) e ácidos hidroxicinâmicos (9 átomos de carbono) (SOARES, 2002). Provavelmente, os resíduos de laranja possuem em maior quantidade ácidos fenólicos hidroxicinâmicos, por isso, o

ácido *p*-cumárico que faz parte desse grupo, retratou de forma mais adequada os ácidos fenólicos presentes nos resíduos.

O bagaço Hamlin e Pêra apresentaram um teor maior de fenóis totais, comparados com o bagaço de Valência e Natal. A casca Hamlin também demonstrou maior quantidade de fenóis, comparada à mesma fração das demais variedades. O frit, dentre as frações estudadas, foi o que exibiu o maior teor de compostos fenólicos totais para todas as variedades. Em contrapartida, a fração polpa foi a que demonstrou o menor teor de fenóis entre os resíduos de todas as variedades.

O bagaço de maçã, segundo Ferrandin (2014) apresentou (177,2 mg AGE/100g⁻¹) de fenóis totais, valor abaixo dos encontrados para o bagaço de laranja Hamlin (1126,6 mg AGE/100g⁻¹) e Pêra (1348,6 mg AGE/100g⁻¹). Assim sendo, podemos inferir que os resíduos do processamento de laranja para suco fornecem maiores quantidades de compostos fenólicos comparados aos teores contidos nos resíduos de maçã, os quais também são resultantes da indústria alimentícia.

Uma espécie de laranja azeda (*C. aurantium*) apresentou (3162 mg AGE/100g⁻¹) de fenóis totais em sua casca, segundo Lagha-Benamrouche e Madani (2013), representando aproximadamente o dobro da quantidade encontrada em casca Hamlin (*C. sinensis*) (1721,4 mg AGE/100g⁻¹), indicando diferença desses compostos entre as espécies e variedades.

5.8 Teor de flavonoides totais dos resíduos de laranja

As frações residuais bagaço e polpa, de todas as variedades, apresentaram os menores valores para flavonoides totais (Figura 14). A casca demonstrou maior teor de flavonoides na variedade Natal, com 2209,6 mg HE/100g⁻¹; sendo que o frit da mesma variedade apresentou 2846,7 mg HE/100g⁻¹, correspondendo ao maior teor de flavonoides entre os resíduos de laranja.

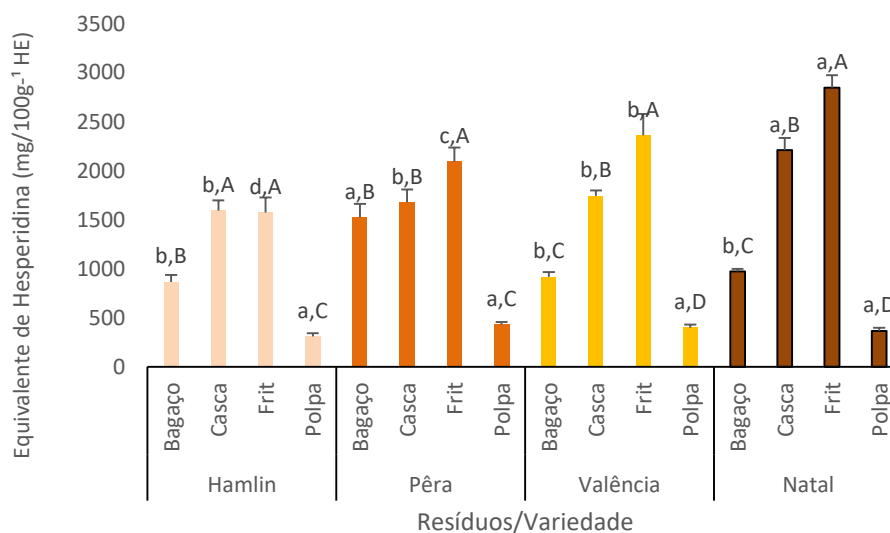


Figura 14. Teor de flavonoides totais nos resíduos de laranja (mg HE/100g⁻¹).

Médias seguidas de letra maiúscula (frações residuais) e minúscula (variedades) iguais não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Dentre os bagaços, o bagaço de laranja Pêra apresentou o maior teor de flavonoides totais, enquanto os bagaços das variedades Hamlin, Valência e Natal, foram estatisticamente iguais entre si. As polpas de todas as variedades mostraram teor de flavonoides iguais entre si estatisticamente.

5.9 Perfil dos constituintes químicos dos resíduos de laranja

A análise comparativa dos espectros UV-visível dos padrões e literatura (FRUTOS, 2007) com as amostras de laranja permitiu detectar a presença de ácidos fenólicos, flavonas, flavanonas e flavonas polimetoxiladas (Tabela 7).

Tabela 7. Principais classes de substâncias presentes nos resíduos de laranja.

Variedades	Frações	Classes de substâncias (% área relativa)				Outras substâncias
		Ácidos fenólicos	Flavonas	Flavanona	Flavona polimetoxiladas	
Hamlin	Bagaço	3,7	2,7	88,1	0,6	4,9
	Casca	2,9	1,4	90,5	3,7	2,0
	Frit	9,8	5,2	74,9	8,7	1,3
	Polpa	4,6	3,7	85,9	0,1	5,7
Pêra	Bagaço	3,7	0,2	87,7	0,4	8,0
	Casca	2,0	0,3	94,6	1,6	1,7
	Frit	7,0	4,9	81,0	5,1	2,0
	Polpa	5,3	3,1	86,7	0,1	4,8
Valência	Bagaço	3,7	3,3	87,7	0,6	4,7
	Casca	5,1	1,9	88,3	2,6	2,2
	Frit	18,9	7,0	61,3	10,2	2,5
	Polpa	3,2	3,6	89,5	0,1	3,6
Natal	Bagaço	2,9	0,4	92,5	0,3	3,9
	Casca	4,2	0,6	88,6	4,1	2,5
	Frit	20,7	4,5	61,9	10,1	3,3
	Polpa	7,5	6,3	78,9	0,8	6,4

Os compostos fenólicos são substâncias que compõe o metabolismo secundário dos vegetais, estão presentes em quase todos os alimentos derivados de plantas, portanto, fazem parte da dieta humana e contribuem positivamente no metabolismo (HELENO et al., 2015). Dentre esses, as flavanonas encontram-se em maior abundância em todas as variedades e frações residuais de laranja estudadas, o que corrobora com a literatura que afirma que as flavanonas são os polifenóis majoritários em citros (KHAN et al., 2014).

As frações casca das laranjas Pêra e Hamlin, e bagaço da Natal, apresentaram as maiores porcentagens relativas de flavanonas (acima de 90%).

O frit das variedades Valência e Natal, apresentaram as maiores porcentagens de ácidos fenólicos, cerca de 10% maior do que o frit das variedades Hamlin e Pêra.

“Outras substâncias” da Tabela 8 agrupam compostos que não foram identificados por seus espectros e não se encaixaram nas classes definidas.

Dentre as frações avaliadas, o frit apresentou maior número de substâncias em seus cromatogramas comparado às demais frações bagaço, casca e polpa. O perfil químico do frit foi similar para todas as variedades, conforme demonstrado na Figura 15.

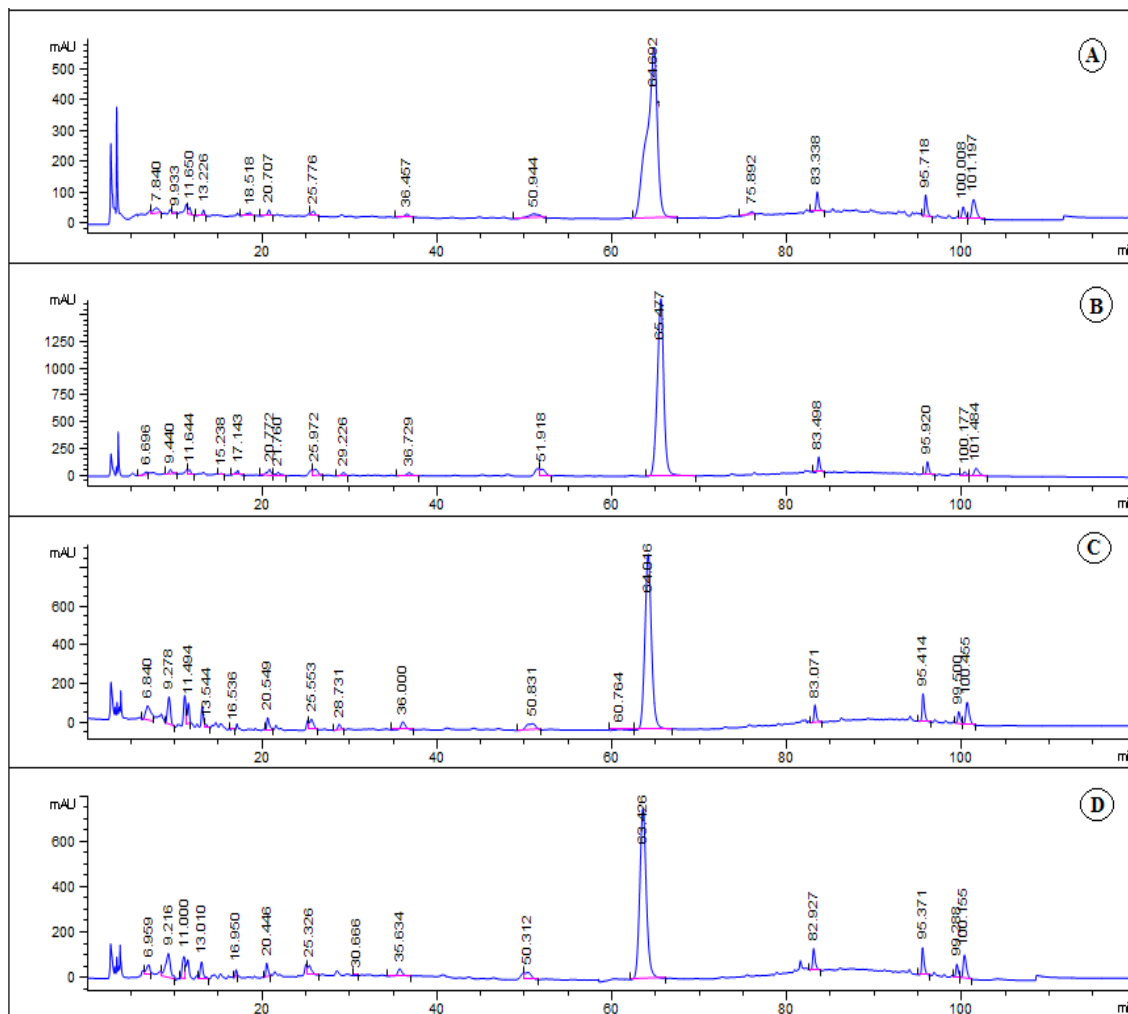


Figura 15. Perfil químico do frit de laranja das variedades Hamlin (A), Pêra (B), Valência (C) e Natal (D).

Para todas as variedades e frações residuais o constituinte mais abundante foi a hesperidina, não sendo observada a presença de (catequina, rutina, naringina e naringenina) nas amostras pelo método utilizado, diferente do descrito por Chen et al. (2011) que observaram a presença de rutina e naringina na casca de laranja (*C. sinensis*).

A concentração de hesperidina foi menor para polpa Natal (213,7 mg) e maior para casca Hamlin (1450,2 mg) (Tabela 8).

Tabela 8. Concentração de hesperidina nos resíduos de laranja (mg/100g amostra).

HESPERIDINA (mg/100g de amostra)				
Variedades	Hamlin	Pêra	Valência	Natal
Frações				
Bagaçõ	420,7	332,9	456,6	564,9
Casca	1450,2	1439,6	1251,2	1375,6
Frit	790,9	1162,9	780,3	731,7
Polpa	241,4	359,2	392,1	213,7
TOTAL	2903,2	3294,6	2880,2	2885,9

Somando a quantidade de hesperidina de todas as frações residuais de uma mesma variedade, a variedade Pêra é que apresenta a maior quantidade de mg/100g de hesperidina.

A hesperidina vem sendo bastante estudada e relacionada com diversas atividades biológicas benéficas. Por ser uma substância bastante comum no metabolismo secundário de plantas, acaba sendo bastante consumida através de alimentos de origem vegetal (KHAN et al., 2014). Há registros da hesperidina como anticancerígeno contra diversos tipos de câncer (DEVI et al., 2016), como antioxidante, antidiabético (UMENO et al., 2016), anti-inflamatório, antifúngico e antibacteriano contra bactérias gram-positivas (IRANSHAHI et al., 2015) e na prevenção de doenças cardiovasculares (KHAN et al., 2014).

Os resíduos de laranja demonstraram ser ricos em hesperidina, um composto com diversas aplicabilidades e que agrega valor a esses resíduos do processamento do suco.

5.10 Atividade antioxidante dos resíduos de laranja

Os resíduos de laranja demonstraram capacidade antioxidante, sendo que a fração frit das variedades Pêra, Valência e Natal atingiu mais de 70% da capacidade de redução do radical DPPH. A casca das variedades Hamlin, Pêra e Natal, apresentaram uma capacidade de sequestro de radicais acima de 60%. O bagaço demonstrou capacidade de redução do radical de 25 a 50%, dependendo da variedade. A polpa das variedades Hamlin, Valência e Natal, apresentou taxas de redução do radical acima de 60%, ficando abaixo desse percentual apenas a variedade Pêra (Figura 16).

Utilizando o mesmo método de sequestro de radicais DPPH, Melo et al. (2008) classificou extratos de frutas com capacidade de redução dos radicais livres superiores a 70% como extratos de frutas com forte capacidade antioxidante, incluindo os extratos de goiaba, caju e acerola. Nesse contexto, a fração frit apresentou forte capacidade antioxidante reduzindo aproximadamente 70% do radical.

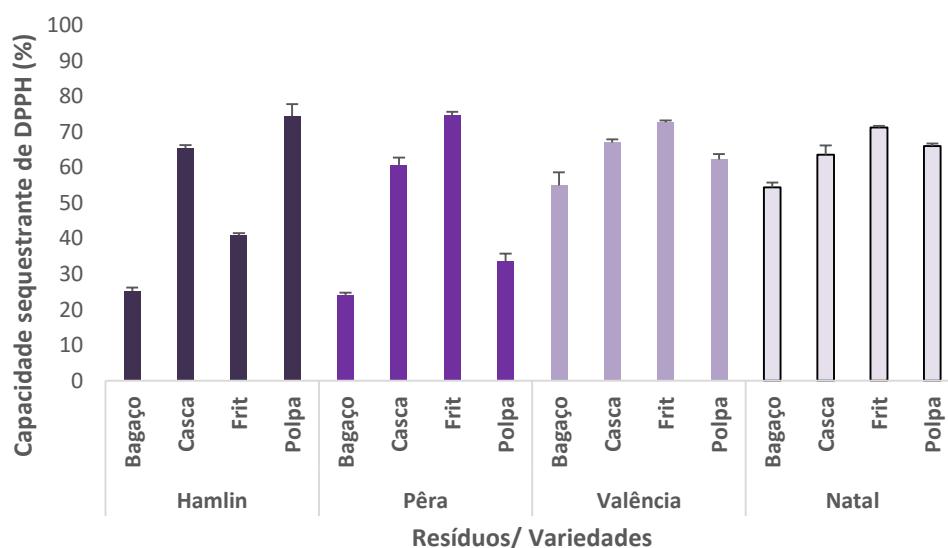


Figura 16. Capacidade sequestrante do radical DPPH (%) dos resíduos de laranja de diferentes variedades.

Araújo et al. (2015), ao analisarem as folhas de laranjeiras (*Citrus sinensis*), obtiveram capacidade máxima de redução dos radicais DPPH de 50%. A polpa da laranja (*C. sinensis*) também foi analisada por Valente (2015) e apresentou capacidade de inibição do radical DPPH de 49%, abaixo dos resultados obtidos para a polpa de Hamlin, Valência e Natal do presente estudo.

Comparando a ação antioxidante dos resíduos com as folhas de laranjeira, a casca e frit de todas as variedades apresentaram 20% mais capacidade de redução dos radicais livres, tornando-os atrativos e promissores para diferentes aplicabilidades.

Ainda referente à metodologia de sequestro de radicais DPPH, também podemos obter os resultados expressos em $\mu\text{mol (TE)/g}$ (Tabela 9).

Tabela 9. Redução de radicais DPPH pelos resíduos de laranja expressos em $\mu\text{mol TE/g}$ de amostra.

Variedade	Atividade antioxidante ($\mu\text{mol TE/g}$)			
	Hamlin	Pêra	Valência	Natal
Frações				
Bagaço	504,1 \pm 1,0 b	484,0 \pm 0,6 c	1098,1 \pm 3,7 a	1088,0 \pm 1,3 a
Casca	1308,5 \pm 0,9 b	1214,8 \pm 2,0 d	1340,2 \pm 0,9 a	1271,0 \pm 2,6 c
Frit	817,6 \pm 0,6 d	1494,3 \pm 0,9 a	1454,0 \pm 0,5 b	1425,1 \pm 0,4 c
Polpa	1488,5 \pm 3,3 a	674,8 \pm 1,9 d	1244,3 \pm 1,5 c	1320,7 \pm 0,6 b

Médias seguidas da mesma letra na horizontal não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

\pm Desvio padrão.

Observando a Figura 16 em comparação com a Tabela 9, o bagaço de laranja das variedades Valência e Natal, demonstraram maiores porcentagens de sequestro de radicais livres e também exibiram maior capacidade antioxidante expressos em $\mu\text{mol TE/g}$. A fração casca entre as variedades se mostraram estatisticamente diferentes, sendo a casca da Valência a que demonstrou a maior atividade antioxidante (1340,2 $\mu\text{mol TE/g}^{-1}$). O frit apresentou os maiores valores de $\mu\text{mol TE/g}$ de capacidade antioxidante, para as variedades Pêra, Valência e Natal. Para a fração polpa o maior potencial antioxidante ocorreu na variedade Hamlin e o menor na variedade Pêra.

Analisando os resíduos do abacate, Daiuto et al. (2014) observaram atividade antioxidante na casca (310,0 $\mu\text{mol TE/g}^{-1}$), semente (410,7 $\mu\text{mol TE/g}^{-1}$) e polpa (8,1 $\mu\text{mol TE/g}^{-1}$). A capacidade antioxidante dos resíduos de abacaxi, caju, maracujá e manga também foram avaliados por Infante et al. (2013) que obtiveram 5,6 $\mu\text{mol TE/g}^{-1}$; 68,6 $\mu\text{mol TE/g}^{-1}$; 10,3 $\mu\text{mol TE/g}^{-1}$ e 33,0 $\mu\text{mol TE/g}^{-1}$, respectivamente; valores estes inferiores aos encontrados no resíduo do abacate e nos resíduos de laranja.

Os resíduos de laranja podem ser considerados potenciais antioxidantes, em comparação com outros resíduos de frutas.

5.11 Atividades antimicrobiana dos resíduos de laranja

Utilizando a metodologia apresentada os resíduos de laranja não demonstraram atividade antimicrobiana.

O bagaço de laranja (*C. sinensis*) foi avaliado por Benelli (2010) quanto à sua atividade antimicrobiana contra as bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, os quais também não observaram atividade antimicrobiana.

Sousa (2013), que testou extratos etanólicos de casca e polpa de laranja (*C. sinensis*) das variedades Pêra e Navel, também não observou atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, *Candida glabrata* e *Candida tropicalis*, corroborando os resultados obtidos com os resíduos de laranja das variedades Hamlin, Pêra, Valência e Natal.

Em pesquisa recente, cascas de laranja passaram por despolimerização catalisada por uma enzima fúngica, gerando oligossacarídeos pectíneos que, segundo Li et al. (2016), demonstraram atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Bacillus subtilis*. Nanopartículas de prata contendo casca de *Citrus sinensis* também apresentaram atividade antibacteriana contra *Bacillus subtilis* (KONWARH et al., 2011), atividade essa atribuída à prata que interage com a membrana celular da bactéria facilitando a inibição.

Resíduos de diferentes espécies de citros após passarem por um tratamento de alta pressão (MPa) foram testados por Casquete et al. (2015) contra bactérias Gram-positivas e negativas. Após esse processo a casca de limão (*C. limon*) e a casca de tangerina (*C. reticulata*) apresentaram atividade antibacteriana com maior concentração de extrato e, principalmente, contra bactérias Gram-positivas. Só o extrato de casca de laranja (*C. sinensis*) apresentou atividade antibacteriana com menores concentrações e suprimiu o crescimento de bactérias gram-positivas e negativas.

As bactérias *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* e *Listeria monocytogenes* foram inibidas pelo extrato hidrolisado da casca de *Citrus unshiu* estudado por Min et al. (2014). Esse extrato ainda foi testado como antibacteriano em diferentes amostras de leite contaminados por *Listeria monocytogenes* e apresentou redução da bactéria.

Alguns flavonoides isolados de diferentes espécies de citros e modificados por enzimas, demonstraram segundo Salas et al. (2011) atividade antifúngica na presença *Aspergillus parasiticus*, *Aspergillus flavus*, *Penicillium expansum* e *Fusarium semitectum*, em condições de ensaio. Os pesquisadores destacam a importância de

estudos ao redor dessa atividade biológica que ainda não tem seu mecanismo de ação desvendado.

A hesperidina, flavanona encontrada nos resíduos de laranja do processamento de suco neste trabalho, apresenta atividades antimicrobianas segundo Iranshahi et al. (2015). A hesperidina isolada é bastante eficiente na inibição de bactérias gram-positivas e Salas et al. (2011) evidenciam sua atividade antifúngica contra *Penicillium expansum*. Nos resíduos de laranja estudados, a hesperidina está em meio a muitas outras substâncias o que, provavelmente, nos impediu de observar sua atividade antimicrobiana. Pode ainda estar ligada à outras biomoléculas, não apresentando portanto, atividade biológica.

Nas literaturas estudadas onde resíduos de citros apresentaram ação antimicrobiana, os mesmos passaram por algum tratamento; enzimático, mecânico ou físico. Os resíduos de laranja oriundos do processamento de suco utilizados nesse trabalho, foram testados em seu estado bruto, sem nenhum pré-tratamento que evidenciasse alguma substância que pudesse exercer o papel antimicrobiano.

5.12 Avaliação da citotoxicidade – teste de viabilidade celular por meio da redução de MTT

Os resíduos de laranja das variedades estudadas foram testados quanto à sua citotoxicidade sobre três linhagens celulares (Figuras 17, 18 e 19).

Na Figura 17 a fração casca de todas as variedades de laranja foi testada quanto à sua capacidade de inibir ou estimular o crescimento de 3 tipos celulares. A casca das variedades Hamlin, Valência e Natal inviabilizaram o crescimento de células NHI-3t3. Já a casca da variedade Pêra para a mesma linhagem de célula aumentou o metabolismo em todas as concentrações. A viabilidade da HaCat foi diminuída na presença das cascas de todas as variedades de laranja. O metabolismo da célula cancerígena SCC9 foi aumentado pela casca de todas as variedades testadas, com exceção das concentrações de 10% e 20% da casca de laranja Hamlin, a qual diminuiu a viabilidade das células cancerígenas.

A casca da laranja da variedade Hamlin apresentou dentre essas frações estudadas, a segunda maior atividade antioxidante; bem como a maior quantidade de hesperidina. É provável que a concentração de hesperidina possa estar associada à redução da viabilidade celular observada nas células SCC9.

Na Figura 18 é possível observar que a fração frit de laranja de todas as variedades inviabilizou o crescimento das células NHI-3t3 e HaCat. O metabolismo da célula cancerígena SCC9 foi aumentado nas concentrações de 5% para todas as variedades e em todas concentrações do frit de laranja da variedade Pêra. Porém, para as demais variedades nas concentrações de 10% e 20%, o frit inviabilizou o crescimento dessas células cancerígenas, principalmente, o frit da variedade Hamlin que na concentração de 20%, diminuiu essa viabilidade celular à praticamente zero. Os frits das variedades Hamlin, Valência e Natal, apresentaram uma concentração de hesperidina menor do que a encontrada no frit da variedade Pêra, entretanto, essas variedades (Hamlin, Valência e Natal) apresentam uma maior porcentagem de ácidos fenólicos, que neste caso, podem estar relacionados com a ação mencionada. É possível também inferir que os extratos de frit só foram eficazes contra as células SCC9 a partir da concentração de 10%.

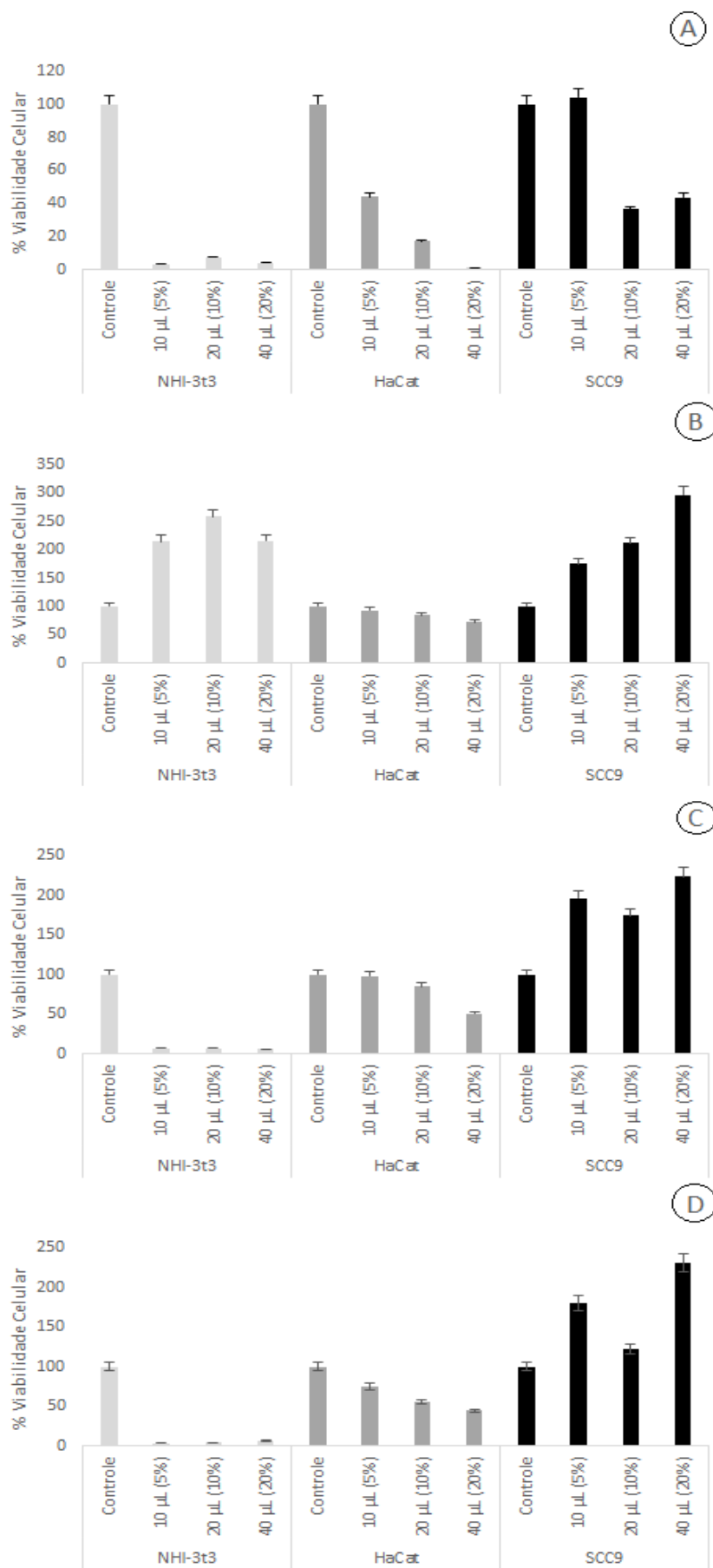


Figura 17. Viabilidade das células NHI-3t3, HaCat e SCC9 em teste com casca de laranja das variedades Hamlin (A), Pera (B), Valência (C) e Natal (D).

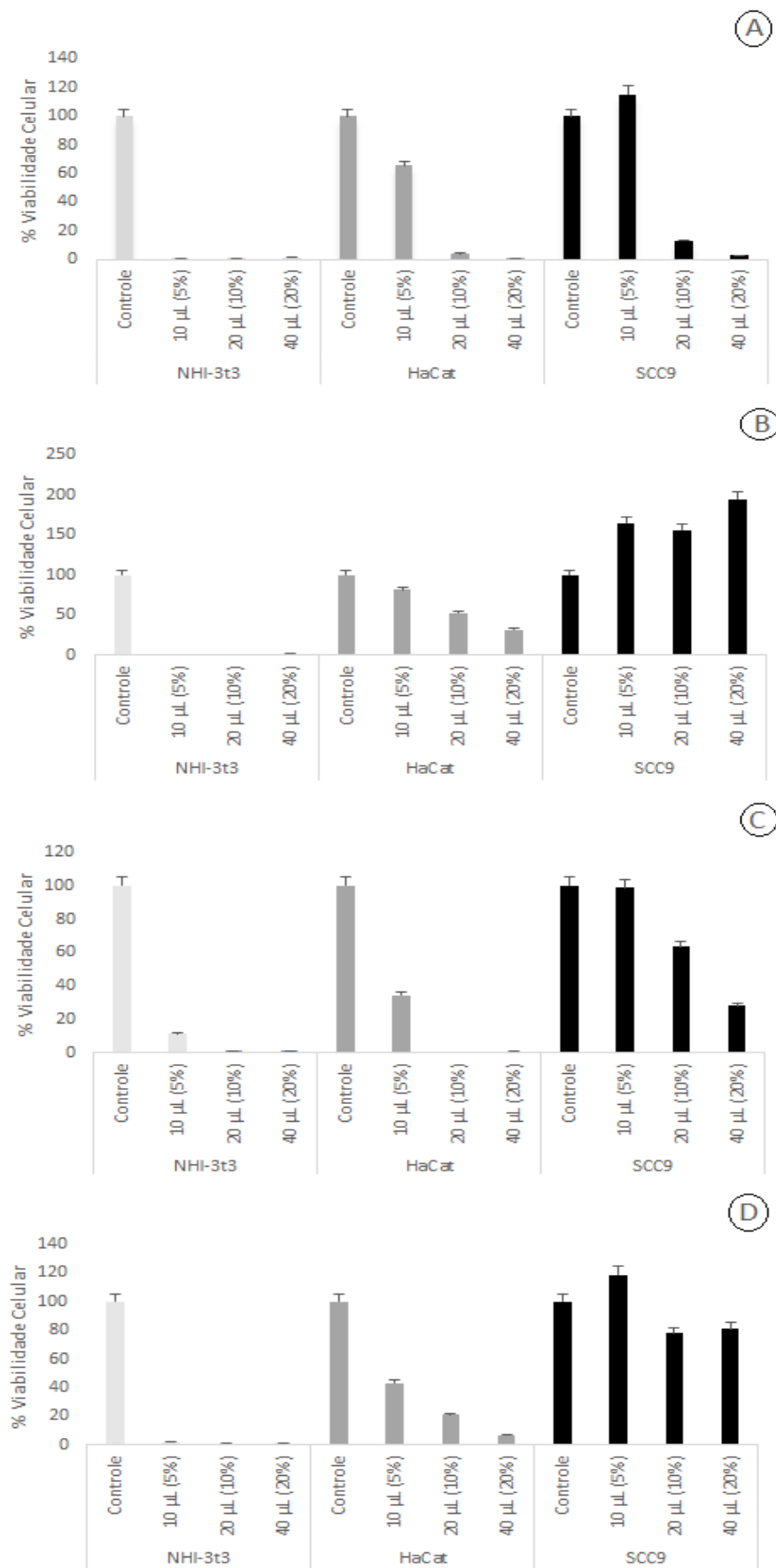


Figura 18. Viabilidade das células NHI-3t3, HaCat e SCC9 em teste com frit de laranja das variedades Hamlin (A), Pêra (B), Valência (C) e Natal (D).

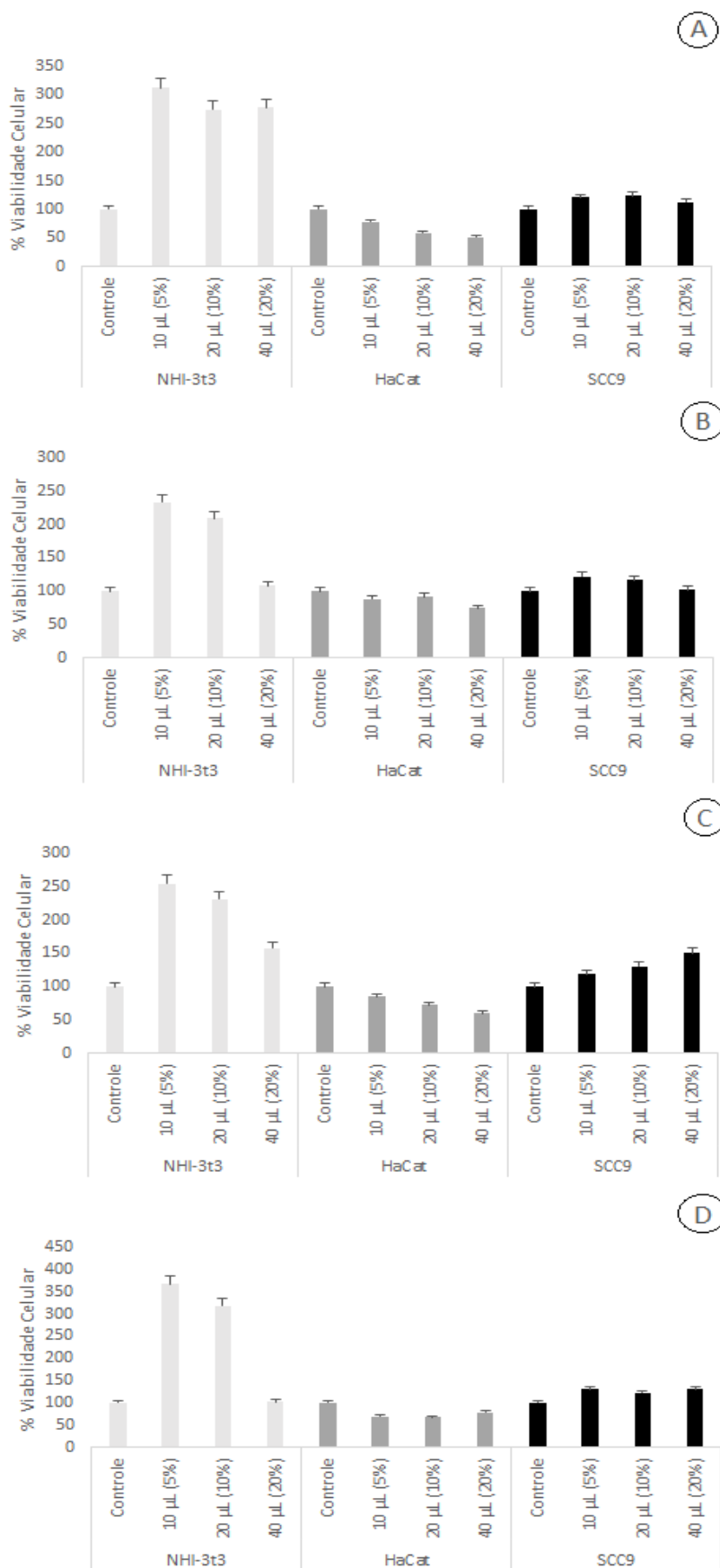


Figura 19. Viabilidade das células NHI-3t3, HaCat e SCC9 em teste com polpa de laranja das variedades Hamlin (A), Pêra (B), Valência (C) e Natal (D).

As polpas de todas as variedades aumentaram o metabolismo das células NHI-3t3 na concentração de 5%. Para as células HaCat e SCC9, as amostras de polpa estudadas não apresentaram diferença relevante em relação ao controle (Figura 19).

As culturas de células de fibroblastos NIH-3t3 têm sido amplamente utilizadas como um modelo para testar a atividade de cicatrização de feridas *in vitro*. Kuonen et al. (2013) testaram a viabilidade celular dos fibroblastos frente ao extrato vegetal do visco (*Viscum album* L) que aumentaram o metabolismo das células NHI-3t3. Diante dessa premissa, os resíduos casca da laranja Pêra e polpa de todas as variedades de laranja, podem significar uma nova vertente para essa aplicação.

Uma linhagem cancerígena que codifica a leucemia (Molt-3) foi testada quando à sua viabilidade na presença de extratos de polpa de duas espécies de citros, limão doce (*C. limetta*) e laranja doce (*C. sinensis*) por Iswariya et al. (2016). Nas concentrações de 50 a 1000 $\mu\text{L/mL}$ de amostra, observou-se diminuição da viabilidade celular dessa linhagem cancerígena. Foi constatado para os resíduos de laranja da casca e frit da variedade Hamlin e frit das variedades Valência e Natal, citotoxicidade para as células de câncer de boca (SCC9), o que sugere que esses resíduos devem ser testados contra outras linhagens de células tumorais.

A flavanona hesperidina demonstrou segundo Devi et al. (2015) ocasionar apoptose em diversos tipos de câncer como de estômago, intestino, pulmão e fígado. Os resíduos de laranja estudados demonstraram possuir altas concentrações de hesperidina, condição que pode estar relacionada com a citotoxicidade que alguns resíduos demonstraram para a linhagem celular SCC9.

A fração bagaço de laranja de todas as variedades estudadas foi descartada dessa análise em testes preliminares, pois seu extrato não foi homogêneo para a aplicação nas placas de cultivo celular, além de apresentar atividade antioxidante mais baixa que as outras frações.

Os resíduos de laranja das diferentes variedades de laranja estudadas apresentaram atividade no aumento do metabolismo celular e na inibição de linhagens celulares, ampliando seu campo de aplicações.

6 CONCLUSÃO

Os resíduos de laranja provenientes do processamento de suco são bastante promissores na obtenção de enzimas e compostos bioativos.

As principais variedades de laranjas brasileiras demonstraram a presença de lipases, que apresentaram atividade em diferentes condições como faixas extensas de pH e temperatura, tornando-as ainda mais interessantes para processos industriais. Essas enzimas foram testadas em seu estado bruto, deixando em aberto a possibilidade de mais estudos em torno de sua aplicabilidade.

Proteases não foram encontradas nos resíduos de laranja nas metodologias utilizadas, esse dado direciona para novas metodologias e serve como registro científico dessa espécie, nas condições testadas.

Os compostos bioativos foram delineados neste estudo, evidenciando a presença da hesperidina, uma flavanona com diversas aplicações na indústria farmacêutica e alimentícia, bem como o perfil geral de compostos fenólicos presentes nesses resíduos.

Os resíduos de laranja demonstraram atividade antioxidante, no entanto, não apresentaram atividade antimicrobiana. Além disso, aumentaram o metabolismo de linhagens celulares, fato este importante em processos de regeneração e cicatrização; e inibiram o crescimento de uma linhagem celular cancerígena.

Portanto, os resíduos de laranja oriundos de uma indústria de grande porte e bem estabelecida, oferecem novas moléculas e inúmeras substâncias que podem ser utilizadas em outros processos e agregar valor a um resíduo que é descartado.

Diante dos resultados obtidos nesse trabalho, é possível salientar a necessidade de mais estudos em torno dos resíduos de laranja e das biomoléculas encontradas, a purificação das lipases obtidas, outros testes antioxidantes para avaliar potenciais aplicações desses resíduos e aplicação desses resíduos em mais linhagens celulares.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDELMOEZ, W.; MOSTAFA, N. A.; MUSTAFA, A. Utilization of oleochemical industry residues as substrates for lipase production for enzymatic sunflower oil hydrolysis. **Journal of Cleaner Production**, v. 59, p. 290–297, 2013.
- AGUIEIRAS, E. C. G.; CAVALCANTI-OLIVEIRA, E. D.; FREIRE, D. M. G. Current status and new developments of biodiesel production using fungal lipases. **Fuel**, v. 159, p. 52–67, 2015.
- ALMEIDA, C. C.; MONTEIRO, M. L. G.; COSTA-LIMA, B. R. C.; ALVARES, T. S.; CONTE-JUNIOR, C. A. In vitro digestibility of commercial whey protein supplements. **LWT - Food Science and Technology**, v. 61, p. 7–11, 2015.
- ALPAY, P. e UYGUN, D. A. Usage of immobilized papain for enzymatic hydrolysis of proteins. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 111, p. 56–63, 2015.
- AMIOT, M. J.; RIVA, C.; VINET, A. Effects of dietary polyphenols on metabolic syndrome features in humans: a systematic review. **Obesity Reviews**, v. 17, p. 573–586, 2016.
- ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária, consulta pública nº27, de 21 de maio de 2009.
- ARANHA, C. P. M. Caracterização de óleos extraídos de sementes de laranjas (*Citrus sinensis*) como aproveitamento de resíduos agroindustriais. 20/12/2011. 76f. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto, 2011.
- ARSHAD, Z. I. M.; AMID, A.; YUSOF, F.; JASWIR, I.; AHMAD, K.; LOKE, S. P. Bromelain: an overview of industrial application and purification strategies. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, p. 7283–7297, 2014.
- ARAÚJO, E. I. M.; MONTEIRO, L. C. C. F.; OLIVEIRA, A. M. S.; ALVES, L. A.; BERTINI, L. M. Caracterização da atividade antioxidante, teor de fenóis totais e atividade larvicida frente ao *Aedes aegypti* de *Citrus sinensis* L. (Laranja). **Blucher Chemistry Proceedings**, v. 3, 2015.
- ATALLAH, O. O.; KANG, S.-H.; EL-MOHTAR, C. A.; SHILTS, T.; BERGUA, M.; FOLIMONOVA, S. Y. A 5'-proximal region of the *Citrus tristeza* vírus genome encoding two leader proteases is involved in vírus superinfection exclusion. **Virology**, v. 489, p. 108–115, 2016.

- AVELAR, M. H. M.; CASSIMIRO, D. M. J.; SANTOS, K. C.; DOMINGUES, R. C. C.; CASTRO, H. F.; MENDES, A. A. Hydrolysis of vegetable oils catalyzed by lipase extract powder from dormant castor bean seeds. **Industrial Crops and Products**, v. 44, p. 452–458, 2013.
- BABBAR, N. e OBEROI, H.S. Enzymes in value-addition of agricultural and agro-industrial residues. In: Brar, S.K., Verma, M. (Eds.), *Enzymes in Value-Addition of Wastes*. Nova Publishers, p. 29–50, 2014.
- BALA, M.; ISMAIL, N. A.; MEL, M.; JAMI, M. S.; SALLEH, H. M.; AMID, A. Bromelain Production: Current Trends and Perspective. **Archives Des Sciences**, v. 65, n. 11, 2012.
- BAEYENS-VOLANT, D.; MATAGNE, A.; MAHYAOUI, R. E.; WATTIEZ, R.; AZARKAN, M. A novel form of ficin from *Ficus carica* latex: Purification and characterization. **Phytochemistry**, v. 177, p. 154–167, 2015.
- BAKER, E.N. e DRENTH, J. The cysteine proteinases structure and mechanism. In: Jurnak, F., McPherson, A. (Eds.), *Biological Macromolecules and Assemblies*, v.3. John Wiley and Sons, New York, p. 313–368, 1987.
- BARBOSA, O.; ORTIZ, C.; BERENQUER-MURCIA, A.; TORRES, R.; RODRIGUES, R. C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Strategies for the one-step immobilization-purification of enzymes as industrial biocatalysts. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 5, 435–456, 2015.
- BENELLI, P. Agregação de valor ao bagaço de laranja (*Citrus sinensis* L. Osbeck) mediante obtenção de extratos bioativos através de diferentes técnicas de extração. 2010. 233f. Dissertação de Mestrado em Engenharia de Alimentos – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2010.
- BERK, Z. Introduction: history, production, trade and utilization. *Citrus Fruit Processing*, Academic press, 1 – 8, 2016.
- BEYNON, R. J. e BOND, J. S. *Proteolytic Enzymes: A practical approach*. Oxyford University Press, New York, p. 257, 1996.
- BRACKETT, G. M.; LEWIS, J. B.; KIOUS, A. R.; MESSER, R. L. W; LOCKWOOD, P. E.; BRACKETT, W. W.; WATAHA J. C. Cytotoxicity of endodontic sealers after one year of aging *in vitro*. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, v.100B, p. 1729–1735, 2012.
- CALADO, C. R. C.; MONTEIRO, S. M. S.; CABRALI, J. M. S.; FONSECA L. P. Effect of pre-fermentation on the production of cutinase by a recombinant

- Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 93, p. 354, 2002.
- CARVALHO, C. R. L.; MANTOVANI, D. M. B.; CARVALHO, P. R. N.; MORAES, R. M. Análises químicas de alimentos. **Instituto de Tecnologia de Alimentos**, p. 121, 1990.
- CASQUETE, R.; CASTRO, S. M.; MARTIN, A.; RUIZ-MOYANO, S.; SARAIVA, J. A.; CÓRDOBA, M. G.; TEIXEIRA, P. Evaluation of the effect of high pressure on total phenolic content, antioxidant and antimicrobial activity of citrus peels. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 31, p. 37–44, 2015.
- CASTRO, H. F.; MENDES, A. A.; DOS SANTOS J. C.; DE AGUIAR, C. L. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. **Química Nova**, v. 27, p. 146–156, 2004.
- CASTRO, R. J. S. Production, biochemical characterization of a protease from *Aspergillus oryzae* and its application to protein hydrolysis for obtaining hydrolysates with antioxidant activity. 31/08/2012. 181f. Dissertação de Mestrado em Ciência dos Alimentos - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 2012.
- CASTRO, R. J. S. e SATO, H. H. Synergistic effects of agroindustrial wastes on simultaneous production of protease and alfa-amylase under solid state fermentation using a simplex centroid mixture design. **Industrial Crops and Products**, v. 49, p. 813–821, 2013.
- CHAHINIAN H. e SARDA L. Distinction between esterases and lipases: comparative biochemical properties of sequence-related carboxylesterases. **Protein & Peptide Letters**, v. 16, p. 1149–1161, 2009.
- CHARNEY, J. e TOMARELLI, R. M. A colorimetric method for the determination of the proteolytic activity of duodenal juice. **Journal of Biological Chemistry**, v. 171, p. 501–505, 1947.
- CHEN, J.; LINDMARK-MANSSON, H.; GORTON, L.; AKESSON, B. Antioxidant capacity of bovine milk assayed by spectrophotometric and amperometric methods. *Int Dairy J.*, v. 13, p. 927–935, 2003.
- CHEN, M. L.; YANG, D. J.; LIU, S. C. Effects of drying temperature on the flavonoid, phenolic acid and antioxidative capacities of the methanol extract of citrus fruit (*Citrus sinensis* L. Osbeck) peels. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 46, p. 1179–1185, 2011.

- CHOI, J-M.; HAN, S-S.; KIM, H-S. Industrial applications of enzyme biocatalysis: Current status and future aspects. **Biotechnology Advances**, v. 33, p. 1443–1454, 2015.
- CITRUSBR – Associação Nacional dos Exportadores de Sucos Cítricos. O retrato da citricultura brasileira. Disponível em: <http://www.citrusbr.com/#> Acessado em 28 de Abril, 2015.
- COELHO, M. A. Z.; LEITE, S. G. F.; ROSA, M. F.; FURTADO, A. A. L. Aproveitamento de resíduos agroindustriais: Produção de enzimas a partir da casca de coco verde. **B.CEPPA**, Curitiba, v. 19, p. 3342, 2001.
- COLLA, L. M.; FICANHA, A. M. M.; RIZZARDI, J.; BERTOLIN, T. E.; REINEHR, C. O.; COSTA, J. A. V. Production and characterization of lipases by two new isolates of *Aspergillus* through solid-state and submerged fermentation. **BioMed Research International**, p. 1–9, 2015.
- COSTA, T. e JORGE, N. Beneficial bioactive compounds present in nut and walnuts. **UNOPAR Científica: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 3, p. 195–203, 2011.
- CROOKS, G. E.; REES, G. D.; ROBINSON, B. H.; SVENSSON, M.; STEPHENSON, G. R. Comparison of hydrolysis and esterification behavior of *Humicola lanuginosa* and *Rhizomucor miehei* lipases in AOT-stabilized water-in-oil microemulsions: I. Effect of pH and water content on reaction kinetics. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 48, p. 78–88, 1995.
- CURTO, R. L.; TRIPODO, M. M.; LEUZZI, U.; GIUFFRÈ, D.; VACCARINO, C. Flavonoids recovery and SCP production from Orange peel. **Bioresource Technology**, v. 42, p. 83–87, 1992.
- DAIUTO, E. R.; TREMOCOLDI, M. A.; ALENCAR, S. M.; VIEITES, R. L.; MINARELLI, P. H. Composição química e atividade antioxidante da polpa e resíduos de abacate ‘Hass’. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 36, p. 417–424, 2014.
- DAY L., AUGUSTIN M. A., BATEY I. L., WRIGLEY C. W. Wheat-gluten uses and industry needs. **Trends in Food Science & Technology**, v. 17, p. 82–90, 2006.
- DEMAJORIVIC, J. Da política tradicional de tratamento do lixo à política de gestão de resíduos sólidos: as novas prioridades. **Revista de Administração de Empresas**, v. 35, p. 88–93, 1995.

- DEVARAJ, K. B.; KUMAR, P. R.; PRAKASH, V. Comparison of activity and conformational changes of ficin during denaturation by urea and guanidine hydrochloride. **Process Biochemistry**, v. 46, p. 458–464, 2011.
- DEVASAGAYAM, T. P. A.; TILAK, J. C.; BOLOOR, K. K.; SANE, K. S.; SAROJ, S.; GHASKADBI, S. S.; LELE, R. D. Free Radicals and Antioxidants in Human Health: Current Status and Future Prospects. **Journal of the Association of Physicians of India**, v. 52, p. 794–804, 2004.
- DEVI, K. P.; RAJAVEL, T.; NABAVI, S. F.; SETZER, W. N.; AHMADI, A.; MANSOURI, K.; NABAVI, S. M. Hesperidin: A promising anticancer agente from nature. **Industrial Crops and Products**, v. 76, p. 582–589, 2015.
- DHUIQUE-MAYER, C.; CARO, Y.; PINA, M.; RUALES, J.; DORNIER, M., GRAILLE, J. Biocatalytic properties of lipase in crude latex from babaco fruit (*Carica pentagona*). *Biotechnology Letters*, v. 23, p. 1021–1024, 2001.
- DONADIO, L. C.; FIGUEIREDO, J. O.; PIO, R. M. Variedades cítricas brasileiras. **Boletim agrícola**, UNESP/FUNEP/EECB, Jaboticabal, v. 1, p. 228–229, 1995.
- DOS ANJOS, M. M.; SILVA, A. A.; PASCOLI, I. C.; MIKCHA, J. M. G.; MACHINSKI JR, M.; PERALTA, R. M.; ABREU FILHO, B. A. Antibacterial activity of papain and bromelain on *Alicyclobacillus* spp. **International Journal of Food Microbiology**, v. 216, p. 121–126, 2016.
- DUBEY, V. K.; PANDE, M.; SINGH, B. K.; JAGANNADHAM, M. V. Papain-like proteases: applications of their inhibitors. **African Journal of Biotechnology**, v. 9, p. 1077–1086, 2007.
- EASTMOND, P. J. Cloning and characterization of the acid lipase from Castor Beans. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, p. 45540–45545, 2004.
- EJEDEGBA, B. O.; ONYENEKE, E. C.; OVIASOGIE, P. O. Characteristics of lipases isolated from coconut (*Cocos nucifera* linn) seed under diferent nutrient treatments. **African Journal of Biotechnology**, v. 6, n. 6, p. 723–727, 2007.
- EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Considerações sobre a produção de laranja no Estado de São Paulo. 2013 Disponível em <http://www.alice.cnptia.embrapa.br>, acessado em Novembro de 2015.
- EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Produção de mamão no Brasil. Disponível em http://www.cnpmf.embrapa.br/index.php?p=pesquisaculturas_pesquisadasmamao.php&menu=, acessado em Maio de 2014.

- EMBUSCADO, M. E. Spices and herbs: Natural sources of antioxidants – a mini review. **Journal of Funtional Foods**, v. 18, p. 811–819, 2015.
- EPA - United States Environmental Protection Agency. Land, waste and cleanup science. Disponível em: www.epa.gov/, acessado em Agosto de 2013.
- ESHAMAH, H.; HAN, I.; NAAS, H.; ACTON, J.; DAWSON, P. Antibacterial effects of natural tenderizing enzymes on different strains of *Escherichia coli* O157: H7 and *Listeria monocytogenes* on beef. **mESC: Biochemical Journal**, v. 96, p. 1494–1500, 2014.
- FAN, J.; YANG, Y. W.; GAO, X.; DENG, W.; FALARA, V.; KANELLIS, A. K.; LI, Z. G. Expression of a senescence-associated cysteine protease gene related to peel pitting of navel orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 98, 281–289, 2009.
- FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations, database statistical. 2012. Disponível em <http://fao.org>, acessado em Julho de 2013.
- FARQUHARSON, C.; MILNE, J.; LOVERIDGE, N. Mitogenic action of insulin-like growth factor-I on human osteosarcoma MG-63 cells and rat osteoblasts maintained in situ: the role of glucose-6-phosphate dehydrogenase. **Bone Miner**, v. 22, p. 105–115, 1993.
- FEDATTO, L. M.; SILVA-STENICO, M. E.; ETCHEGARAY, A.; PACHECO, F. T. H.; RODRIGUES, J. L. M.; TSAI, S. M. Detection and characterization of protease secreted by the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. **Microbiological Research**, v. 161, p. 263–272, 2006.
- FEIJOO-SIOTA, L. e VILLA, T. G. Native and biotechnologically engineered plant proteases with industrial applications. **Food Bioprocess Technology**, v. 6, p. 1066–1088, 2011.
- FERNANDES, B. C. Desenvolvimento histórico da citricultura. 2010. 43f. Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências Econômicas) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências e Letras de Araraquara, 2010.
- FERRANDIN, G. Avaliação do potencial antioxidante e produção do fermentado alcoólico a partir do bagaço de maçã. 2014. 45f. Projeto referente ao trabalho de conclusão de curso para Bacharelado em Química, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, 2014.

- FERREIRA-DIAS, S.; SANDOVAL, G.; PLOU, F.; VALERO, F. The potential use of lipases in the production of fatty acid derivatives for the food and nutraceutical industries. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 16; p. 3, 2013.
- FLEURI, L. F. Resíduos como fontes diretas e indiretas de enzimas. Tese de livre docência – Universidade Estadual “Júlio de Mesquita Filho” – Instituto de Biociências, Botucatu, 2016.
- FLEURI, L. F.; NOVELLI, P. K.; DELGADO, C. H. O.; PIVETTA, M. R.; PEREIRA, M. S.; ARCURI, M. L. C.; CAPOVILLE, B. L. Biochemical characterization and application of lipases produced by *Aspergillus* sp. on solid-state fermentation using three substrates. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 49, p. 2585–2591, 2014a.
- FLEURI, L. F.; OLIVEIRA, M. C.; ARCURI, M. L. C.; CAPOVILLE, B. L.; PEREIRA, M. S.; OKINO-DELGADO, C. H.; NOVELLI, P. K. Production of fungal lipases using wheat bran and soybean bran incorporation of sugarcane bagasse as a co-substrate in solid-state fermentation. **Food Science and Biotechnology**, v. 23, n. 4, p. 1199–1205, 2014b.
- FOGLIA, T. A. e VILLENEUVE, P. *Carica papaya* latex-catalyzed synthesis of structured triacylglycerols. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 74, p. 1447– 450, 1997.
- FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Partial list of enzyme preparations that are used in foods. Washington, D.C.: U.S. Food and Drug Administration, Center of Food Safety and Applied Nutrition, Office of Food Additive Safety. Disponível em http://www.cfsan.fda.gov/_dms/opa-enz.html, acessado em Outubro de 2015.
- FREEMAN, H. M. Industrial pollution prevention handbook. Mc GrawHill, New York, p. 935, 1995.
- FRUTOS, A. R. B. Resistencia frente a la infección por *Penicillium digitatum* durante la postcosecha de los frutos cítricos. Bases moleculares y metabolismo de fenilpropanoides. 27/09/2007. 329f. Tesis para optar al grado de Doctor por la Universidad de Valencia, Espanha, 2007.
- GAGAOUA, M.; BOUCHERBA, N.; BOUANANE-DARENFED, A.; ZIANE, F.; NAIT-RABAH, S.; HAFID, K.; BOUDECHICHA, H. R. Three-phase partitioning as an efficient method for the purification and recovery of ficin from Mediterranean fig (*Ficus carica* L.) latex. **Separation and Purification Technology**, v. 132, p. 461–467, 2014.

- GIORDANI, R.; MOULIN, A.; VERGER, R. Tributylglycerol hydrolase activity in *Carica papaya* and other lattices. **Phytochemistry**, v. 30, p. 1069–1072, 1991.
- GOH, T. B.; KOH, R. Y.; YAM, M. F.; AZHAR, M. E.; MORDI, M. N.; MANSOR S. M. 5-Methoxytryptamine reacts with natural food flavour to produce 6-methoxy tetrahydro-b-carbolines: In vitro investigation of their antioxidant and cytotoxicity properties. **Food Chemistry**, v. 183, p. 208-216, 2015.
- GÖKBULUT, A. A.; KIRAZ, Y.; BARAN, Y. Cell Proliferation and Cytotoxicity Assays. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, 2016.
- GOLAKI, B. P.; AMINZADEH, S.; KARKHANE, A. A.; YAKHCHALI, B.; FARROKH, P.; KHALEGHINEJAD, S. H.; TEHRANI, A. A.; MEHRPOOYAN, S. Cloning, expression, purification, and characterization of lipase 3646 from thermophilic indigenous *Cohnella* sp. A01. **Protein Expression and Purification**, v. 109, p. 120–126, 2015.
- GOULA, A. M. e LAZARIDES, H. N. Integrated processes can turn industrial food waste into valuable food by-products and/or ingredients: The cases of olive mill and pomegranate wastes. **Journal of Food Engineering**, v. 167, p. 45–50, 2015.
- GUPTA, R. K.; PATEL, A. K.; SHAH, N.; CHOUDHARY, A. K.; JHA, U. K.; YADAV, U. C.; GUPTA, P. K.; PAKUWAL, U. Oxidative stress and antioxidants in disease and câncer: A review. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 15, p. 4405– 4409, 2014.
- GUSMÃO, R. O., FERRAZ, L. M., RÊGO, A. P. B., ASSIS, F. G. V., LEAL, P. L. Produção de enzimas por *Aspergillus* spp. sob fermentação em estado sólido em casca de café. **Scientia plena**, v. 10:11 – Disponível em: www.scientiaplenu.org.br, 2014.
- GUTARRA, M. L. E.; GODOY, M. G.; MAUGERI, F.; RODRIGUES, M. I.; FREIRE, D. M. G.; CASTILHO, L. R. Production of an acidic and thermostable lipase of the mesophilic fungus *Penicillium simplicissimum* by solid-state fermentation. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 5249, 2009.
- HEBBAR, H. U.; SUMANA, B.; RAGHAVARAO, K. S. M. S. Use of reverse micellar systems for the extraction and purification of bromelain from pineapple wastes. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 4896–4902, 2008.
- HELENO, S. A.; MARTINS, A.; QUEIROZ, M. R. P.; FERREIRA, I. C. F. Bioactivity of phenolic acids: metabolites versus parent compounds: a review. **Food Chemistry**, v. 173, p. 501–513, 2015.

- HOMAEI, A. Enhanced activity and stability of papain immobilized on CNBr-activated sepharose. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 75, p. 373–377, 2015.
- IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística 2012. Disponível em www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/agropecuaria/, acessado em Julho de 2013.
- IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística 2015. Disponível em <http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/prevsaf/default.asp?t=1&z=t&o=26&u1=1&u2=1&u3=1&u4=1>, acessado em Novembro de 2015.
- INFANTE, J.; SELANI, M. M.; TOLEDO, N. M. V.; SILVEIRA-DINIZ, M. F.; ALENCAR, S. M.; SPOTO, M. H. F. Atividade antioxidante de resíduos agroindústrias de frutas tropicais. **Brazilian Journal Food Nutrition**, v. 24, p. 87–91, 2013.
- IRANSHAHI, M.; REZAEI, R.; PARHIZ, H.; ROOHBAKHSH, A.; SOLTANI, F. Protective effects of flavonoids against microbes and toxins: The cases of hesperidin and hesperetin. **Life Sciences**, v. 137, p. 125–132, 2015.
- ISWARIYA, G. T.; SUGANYA, V.; PADMA, P. R.; NIRMALADEVI, R. Cytotoxic effect of *Citrus limetta* and *Citrus sinensis* on Molt-3 Cell Line. **International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research**, v. 41, p. 111–115, 2016.
- ITABAIANA JR, I.; MARIZ E MIRANDA, L. S.; SOUZA, R. O. M. A. Towards a continuous flow environment for lipase-catalyzed reactions (review). **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 85–86, p. 1–9, 2013.
- JBT – FoodTech – A leading supplier of integrated food processing solutions. Ready to help with all of your Citrus Processing needs, 2016. Disponível em <http://www.jbtfoodtech.com/en/Solutions/Processes/Citrus-Processing>, acessado em Julho de 2016.
- JBT – FoodTech – Procedures for analysis of citrus products, sixth edition, 2011. Disponível em <http://www.jbtfoodtech.com/en/Solutions/Applications/Citrus/Citrus-Procedures>, acessado em Julho de 2016.
- JINKA, R.; RAMAKRISHNA, V.; RAO, S.; RAO, R. P. Purification and characterization of cysteine protease from germinating cotyledons of horse gram. **BMC Biochemistry**, v. 10, p. 1–11, 2009.

- JOMORI, M. L. L. Métodos de desverdecimento pós-colheita de tangor ‘Murcott’ e laranja ‘Valência’. 2011.137f. Tese de Doutorado em Ciências Fitotécnicas – Universidade de São Paulo, Escola superior de agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2011.
- KAPOOR, M.; PANWAR, D.; KAIRA, G. S. Bioprocesses for enzyme production using agro-industrial wastes: Technical challenges and commercialization potential. **Agro-Industrial wastes as feedstock for enzyme production**, Elsevier, chapter 3, p. 61-83, 2016.
- KHAN, M. K.; HUMA, Z. E.; DANGLES, O. A comprehensive review on flavanones, the major citrus polyphenols. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 33, p. 85–104, 2014.
- KOBLITZ, M. G. B. Bioquímica dos alimentos: Teoria e prática. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 2, 2010.
- KONNO, K.; HIRAYAMA, C.; NAKAMURA, M.; TATEISHI, K.; TAMURA, Y.; HATTORI, M.; KOHNO, K. Papain protects papaya trees from herbivorous insects: role of cysteine proteases in latex. **Plant Journal**, v. 37, p. 370–378, 2004.
- KONWARH, R.; GOGOI, B.; PHILIP, R.; LASKAR, M. A.; KARAK, N. Biomimetic preparation of polymer-supported free radical scavenging, cytocompatible and antimicrobial “green” silver nanoparticles using aqueous extract of *Citrus sinensis* peel. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 84, p. 338–345, 2011.
- KOUTEU, P. A. N.; BARÉA, B.; BAROUH, N.; BLIN, J.; VILLENEUVE, P. Lipase activity of tropical oilseed plants for ethyl biodiesel synthesis and their typos- and regioselectivity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 64, n. 46, p. 8838–8847, 2016.
- KUONEN, R.; WEISSENSTEIN, U.; URECH, K.; KUNZ, M.; HOSTANSKA, K.; ESTKO, M.; HEUSSER, P.; BAUMGARTNER, S. Effects of Lipophilic Extract of *Viscum album* L. and Oleanolic Acid on Migratory Activity of NIH/3T3 Fibroblasts and on HaCat Keratinocytes. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, p. 1–7, 2013.
- LAGHA-BENAMROUCHE, S. e MADANI, K. Phenolic contents and antioxidant activity of Orange varieties (*Citrus sinensis* L. and *Citrus aurantium* L.) cultivated in Algeria: Peels and leaves. **Industrial Crops and Products**, v. 50, p. 723–730, 2013.

- LANSER, A. C.; MANTHEY, L. K.; HOU, C. T. Regioselectivity of new bacterial lipase determined by hydrolysis of triolein. **Current Microbiology**, v. 44, p. 336–340, 2002.
- LANZA, C. M. Processed and Derived Products of Oranges. Chapter of Citrus Fruits/Processed and Derived Products of Oranges, Elsevier Science Ltd., University of Catania, Catania, p.1346–1348, 2003.
- LEE, J. S.; HURR, B. M.; HUBER, D. J.; VALLEJOS, C. E.; SARGENT, S. A. Characterization of proteases and nucleases associated with ethylene-induced programmed cell death in immature cucumber fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v. 110, p. 190–196, 2015.
- LI, P. J.; XIA, J. I.; NIE, Z. Y.; SHAN, Y. Pectic oligosaccharides hydrolyzed from orange peel by fungal multi-enzyme complexes and their prebiotic and antibacterial potentials. **LWT – Food Science and Technology**, v. 69, p. 203–210, 2016.
- LIN, J-T.; LIU, S-C.; TSAY, G. J.; YANG, D-J. Composition of flavonoids and phenolic acids in *Glycin tomentella* Hayata cultivated in various soils. **Food Chemistry**, v. 121, p. 659–665, 2010.
- LOPES, D. B.; FRAGA, L. P.; FLEURI, L. F.; MACEDO, G. A. Lipase and esterase - to what extent can this classification be applied accurately? **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 31, p. 1, 2011a.
- LOPES, J. M. S.; DÉO, T. F. G.; ANDRADE, B. J. M.; GIROTO, M.; FELIPE, A. L. S.; JUNIOR, C. E. I.; BUENO, C. E. M. S.; SILVA, T. F.; LIMA, F. C. C. Importância econômica do citros no Brasil. **Revista Científica Eletrônica de Agronomia**, v. 10, 2011b.
- MACEDO, G. A.; PASTORE, G. M.; PARK, Y. K. Partial purification and characterization of an extracellular lipase from a newly isolated strain of *Geotrichum* sp. **Revista Brasileira de Microbiologia**, v. 28, p. 90–95, 1997.
- MAHAJAN, R. T. e MADGUJAR, S. B. Biological aspects of proteolytic enzymes: a review. **Journal of Pharmacy Research**, v. 9, p. 2048–2068, 2010.
- MARTÍNEZ, R.; TORRES, P.; MENESES, M. A.; FIGUEROA, J. G.; PÉREZ-ÁLVAREZ, J. A.; VIUDA-MARTOS, M. Chemical, technological and *in vitro* antioxidant properties of mango, guava, pineapple and passion fruit dietary fibre concentrate. **Food Chemistry**, v. 135, p. 1520–1526, 2012.

- MARTINS, M. T. C. S.; PÔRTO, N. A.; CANUTO, M. F. S.; BRUNO, R. L. A. Composição química de sementes de espécies de *Manihot* Mill (Euphorbiaceae). **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, p. 621–623, 2007.
- MATTOS JUNIOR, D. M.; DE NEGRI, J. D.; JORGINO, J. O. F.; JUNIOR, P. Citros: principais informações e recomendações de cultivo. **Boletim técnico 200**, Instituto Agrônômico de Campinas, 2005.
- MAZORRA-MANZANO, M. A.; MORENO-HERNÁNDEZ, J. M.; RAMÍREZ-SUAREZ, J. C.; TORRES-LLANEZ, M. J.; GONZÁLEZ-CÓRDOVA, A. F.; VALLEJO-CÓRDOBA, B. Sour orange *Citrus aurantium* L. flowers: A new vegetable source of milk-clotting proteases. **LWT- Food Science and Technology**, v. 54, p. 325–330, 2013.
- MEGHWANSHI, K. G.; AGARWAL, L.; DUTT, K.; SAXENA, R. K. Characterization of 1,3-regiospecific lipases from new *Pseudomonas* and *Bacillus* isolates. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 40, p. 127–131, 2006.
- MELO, E. A.; MACIEL, M. I. S.; LIMA V. L. A G.; NASCIMENTO, R. J. Capacidade antioxidante de frutas. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 44, p. 193–201, 2008.
- MELO, P. S.; BERGAMASCHI, K. B.; TIVERON, A. P.; MASSARIOLI, A. P.; OLDONI, T. L. C.; ZANUS, M. C.; PEREIRA, G. E.; ALENCAR, S. M. Composição fenólica e atividade antioxidante de resíduos agroindustriais. **Ciência Rural**, v. 41, p. 1088–1093, 2011.
- MENDES, A. A.; OLIVEIRA, P. C.; DE CASTRO, H. F. Properties and biotechnological applications of porcine pancreatic lipase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. v. 78, p. 119–134, 2012.
- MENDONÇA, L. M. V. L.; CONCEIÇÃO, A.; PIEDADE, J.; CARVALHO, V. D.; THEODORO, V. C. A. Caracterização da composição química e do rendimento dos resíduos industriais do limão Tahiti (*Citrus latifolia* Tanaka). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, p. 870–874, 2006.
- MHETRAS, N. C.; BASTAWDE, K. B.; GOKHALE, D. V. Purification and characterization of acidic lipase from *Aspergillus niger* NCIM 1207. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 1486–1490, 2009.
- MIN, K. Y.; KIM, J. H.; LEE, K. A.; KIM, K. T.; PAIK, H. D. Antimicrobial activity of acid-hydrolyzed *Citrus unshiu* peel extract in milk. **Journal Dairy Science**, v. 97, p. 1955–1960, 2014.

- MIRANDA, I. K. S. P. B. Obtenção, caracterização e atividade antitumoral in vitro de bromelina de diferentes partes de abacaxizeiros. 2014. 78f. Dissertação de Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais – Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana – Bahia, 2014.
- MIRANDA, A. S.; MIRANDA, L. S. M.; SOUZA, R. O. M. A. Lipases: valuable catalysts for dynamic kinetic resolutions. **Biotechnology Advances**, v. 33, p. 372–393, 2015.
- MOLINA, G.; PRAZERES, J. N.; BALLUS, C. A. Aplicações de enzimas na indústria de alimentos. Capítulo de Biotecnologia de Alimentos, Coleção Ciência, tecnologia, engenharia de alimentos e nutrição, editora Atheneu, São Paulo, Rio de Janeiro e Belo Horizonte, v. 12, p. 343–363, 2013.
- NAKAO, K.; MURATA, K.; ITOH, K.; HANAMOTO, Y.; MASUDA, M.; MORIYAMA, K. Anti-hyperuricemia effects of extracts of immature *Citrus unshiu* fruit. **Journal of Traditional Medicines**, v. 28, p. 10–15, 2011.
- NASCIMENTO FILHO, W. B. e FRANCO, C. R. Potential assessment of waste produced through the agro-industrial processing in Brazil. **Química Nova**, v. 6, p. 1968–1987, 2015.
- NAWAR, W. W. Lipids. In R. O. Fennema (Ed.), **Food chemistry**, p. 225–320. Marcel Dekker, New York, 1996.
- NEETHU, C. S.; MUJEEB-RAHIMAN, K. M.; ROSMINE, E.; SARAMMA, A. V.; MOHAMED—ATHA, A. A. Utilization of agro-industrial wastes for the production of lipase from *Stenotrophomonas maltophilia* isolated from Arctic and optimization of physical parameters. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 4, p. 703–709, 2015.
- NEVES, K. C. S. Produção de proteases coagulantes por espécies de *Pleurotus* em resíduos vegetais da Amazônia. 19/03/2014. 97f. Tese de Doutorado em Biotecnologia – Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2014.
- NEVES, M. F.; TROMBIN, V. G.; MILAN, P.; LOPES, F. F.; CRESSONI, F.; KALAKI, R. O retrato da citricultura brasileira. Disponível em http://www.citrusbr.com/download/Retrato_Citricultura_Brasileira_MarcosFava.pdf, acessado em Julho de 2016.
- NOGUEIRA, F. M. S. Brasil e Estados Unidos: embate na OMC pelo suco de laranja. 2012. 49f. Monografia apresentada ao curso de graduação em Relações

- Internacionais da Faculdade de Economia da Fundação Armando Alvares Penteado, São Paulo, 2012.
- OBATA, T.; IWATA, H.; NAMBA, Y. Proteolytic enzyme from *Oerskovia* sp CK lysing viable yeast cells. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 41, n. 12, p. 2387–2394, 1977.
- OKINO-DELGADO, C. H. Obtenção, caracterização e aplicação de lipases vegetais – Utilizando subprodutos do processamento de laranja e manga para suco. 21/02/2014. 89f. Dissertação de Mestrado em Botânica - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Instituto de Biociências de Botucatu, 2014.
- OKINO-DELGADO, C. H. e FLEURI, L. F. Obtaining lipases from byproducts of orange juice processing. **Food Chemistry**, v. 163, p. 103–107, 2014.
- OKINO-DELGADO, C. H. E FLEURI, L. F. Orange and mango byproducts: agro-industrial waste as source of bioactive compounds and botanical versus commercial description - A review. **Food Reviews International**, v. 32, p. 1–14, 2016.
- OSATO, J. A.; SANTIAGO, L. A.; REMO, G. M.; CUADRA, M. S.; MORI, A. Antimicrobial and antioxidante activities of unripe papaya. **Life Science**, v. 53, p. 1383–1389, 1993.
- PALOCCHI, C.; SORO, S.; CERNIA, E.; PASQUA, G. Lipolytic isoenzymes from *Euphorbia latex*. **Plant Science**, v. 165, n. 3, p. 577–582, 2003.
- PERES, R. S.; ARMELIN, E.; MORENO-MARTÍNEZ, J. A.; ALEMÁN, C.; FERREIRA, C. A. Transport and antifouling properties of papain-based antifouling coatings. **Applied Surface Science**, v. 341, p. 75–85, 2015.
- POZA, M.; SIEIRO, C.; CARREIRA, L.; BARROS-VALÁZQUEZ, J.; VILLA, T. G. Production and characterization of the milk clotting protease of *Myxococcus xanthus* strain 442. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 30, p. 691–698, 2003.
- QUETTIER, A. L. e EASTMOND, P. J. Storage oil hydrolysis during early seedling growth. **Plant Physiology and Biochemistry**, p. 485–490, 2009.
- QIU, C., ZHAO, M. E.; MCCLEMENTS, D. J. Improving the stability of wheat protein-stabilized emulsions: Effect of pectin and xanthan gum addition. **Food Hydrocolloids**, v. 43, p. 377–387, 2015.
- RAMAKRISHNA, V.; RAJASEKHAR, S.; REDDY, L. S. Identification and purification of metalloprotease from dry grass pea (*Lathyrus sativus* L.) seeds. **Applied Biochemistry Biotechnology**, v. 160, p. 63–71, 2010.

- RAO, M. B.; TANKSALE, A. M.; GHATGE, M. S.; DESHPANDE, V. V. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. **Microbiology and Molecular Biology**, v. 62, p. 597–635, 1998.
- RASKOVIC, B.; POPOVIC, M.; OSTOJIC, S.; ANDELKOVIC, B.; TESEVIC, V.; POLOVIC, N. Fourier transform infrared spectroscopy provides an evidence of papain denaturation and aggregation during cold storage. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 150, p. 238–246, 2015.
- RODRIGUES, R. C. e FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Lipase from *Rhizomucor miehei* as a biocatalyst in fats and oils modification. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 66, p. 15–32, 2010.
- ROWLEY, B.I. e BULL, A.T. Isolation of a yeast-lysing *Arthrobacter* species and production of the lytic enzyme complex in batch and continuous-flow fermentors. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 19, p. 879–899, 1977.
- SAGIROGLU, A. e ARABACI, N. Sunflower seed lipase: Extration, purification and characterization. **Preparative Biochemistry e Biotechnology**, v. 35, p. 37–51, 2005.
- SALAS, M. P.; CÉLIZ, G.; GERONAZZO, H.; DAZ, M.; RESNIK, S. L. Antifungal activity of natural and enzymatically-modified flavonoids isolated from citrus species. **Food Chemistry**, v. 124, p. 1411–1415, 2011.
- SANA, N. K.; HOSSIN, I.; HAQUE, E. M.; SHAHA, R. K. Identification, purification and characterization of lipase from germinating oil seeds (*Brassica napus L.*). **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v.2, n.7, p. 246–252, 2004.
- SANTOS, K. C.; CASSIMIRO, D. M. J.; AVELAR, M. H. M.; HIRATA, D. B.; CASTRO, H. F.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; MENDES, A. A. Characterization of the catalytic properties of lipases from plant seeds for the production of concentrated fatty acids from diferente vegetable oils. **Industrial Crops and Products**, v. 49, p. 462–470, 2013.
- SANTOS, L. F. Produção, purificação, caracterização e estudo da aplicação de uma protease alcalina produzida por *Cellulosimicrobium cellulans* 191. 2004. 97f. Tese de Doutorado em Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.
- SANZ, L. C. e OLIAS, J. M. Characterization of lupin seed lipase. **Food Chemistry**, v. 37, p. 221–228, 1990.
- SEABRA, F.; DARÓS, L. L.; PEREIRA, M. F. A. ISO 14000 e a competitividade da indústria têxtil no Mercosul: o caso da Hering S.A. In: Simpósio internacional de

- qualidade ambiental: Gerenciamento de resíduos e certificação ambiental, v. 2, p. 2431, 1998.
- SHAHIDI, F. e ZHONG, Y. Lipid oxidation and improving the oxidative stability. **Chemical Society Reviews**, v. 39, p. 4067–4079, 2010.
- SHAHIDI, F. e ZHONG, Y. Measurement of antioxidante activity. **Journal of Funtional Foods**, v. 18, p. 757–781, 2015.
- SHARMA, R.; OBEROI, H. S.; DHILLON, G. S. Fruit and vegetable processing waste: Renewable feedstocks for enzyme production. Agro-industrial wastes as feedstock for enzyme production, Academic press, p. 23-59, 2016.
- SILVA, C. E. F.; GOIS, G. N. S. B.; SILVA, I. C. C.; SILVA, L. M. O.; ALMEIDA, R. M. R. G.; ABUD, A. K. S. Avaliação do potencial de uso do bagaço de laranja visando a produção de etanol 2G. **Congresso Brasileiro de Engenharia Química**, 2014a.
- SILVA, L. C. R. C. Desenvolvimento de estratégias analíticas para determinação de flavononas e psoraleno por CLAE-DAD em sucos de laranjas de diferentes procedências. 16/07/2009. 126f. Tese de Doutorado em Química, Programa de pós-graduação em química, Instituto de química – Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2009.
- SILVA, L. M. R.; FIGUEIREDO, E. A. T.; RICARDO, N. M. P. S.; VIEIRA, I. G. P.; FIGUEIREDO, R. W.; BRASIL, I. M.; GOMES, C. L. Quantification of bioactive compounds in pulps and by-products of tropical fruits from Brazil. **Food Chemistry**, v. 143, p. 398–404, 2014b.
- SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTOS, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. **Methods in Enzymology**, v. 299, p. 152–178, 1999.
- SOARES, E. S.; SILVA, A. C.; QUEIROZ, F. S. E. A.; GOMES, J. E. G.; HERCULANO, P. N.; MOREIRA, K. A. Potencial do latex da fruta pão (*Artocarpus altilis*) como agente coagulante do leite. **Ciência Rural**, v. 45, n. 1, 2015.
- SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutrição**, v. 15, p. 71–81, 2002.
- SOUSA, M. C. Avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos alcóolicos preparados a partir dos frutos (casca e polpa) de *Citrus sinensis* L Osbeck – variação pêra e navel – frente a bactérias e fungos patogênicos. 2013. 33f. Trabalho de

- Conclusão de Curso em Farmácia – Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2013.
- SPADA, L. Danos causados pela podridão floral dos citros em diferentes variedades de laranja doce. 28/10/2011. 28f. Dissertação de Mestrado em Fitossanidade – Fundo de Defesa da Citricultura, Araraquara, 2011.
- SUZUKI, T.; HONDA, Y.; MUKASA, Y. Purification and characterization of lipase in buckwheat seed. **Agricultural and Food Chemistry**. v. 52, p. 7407–7411, 2004.
- SWINGLE, W.T. The botany of citrus and its wild relatives. In: Reuther, W., Webber, H. J., Batchelor, L. D. (Ed.) *The Citrus industry*. 2^aed. Berkeley: University of California, v. 1, p. 190-430, 1967.
- TAN-WILSON, A.; BANDAK, B.; PRABU-JEYABALAN, M. The PA domain is crucial for determining optimum substrate length for soybean protease C1: Structure and kinetics correlate with molecular function. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 53, p. 27–32, 2012.
- TIMOFIECSYK, F. R. e PAWLOWSKY, U. Minimização de resíduos na indústria de alimentos: revisão. **B.CEPPA**, v. 18, p. 221–236, 2000.
- UMENO, A.; HORIE, M.; MUROTOMI, K.; NAKAJIMA, Y.; YOSHIDA, Y. Antioxidative and antidiabetic effects of natural polyphenols and isoflavones. **Molecules**, v. 21, p. 708, 2016.
- VALENTE, D. M. C. Pesquisa da atividade antioxidante em subprodutos alimentares. 2015. 57f. Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas, Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2015.
- VESCOVI, V. Extração, purificação e imobilização de lipases vegetais destinadas à síntese de biodiesel e ésteres. (2012) 79f. Dissertação de mestrado – Programa de Pós Graduação em Engenharia Química – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos – São Paulo, 2012.
- VIJAYAKUMAR, K. A. e GOWDA, L. R. Rice (*Oryza sativa*) lipase: Molecular cloning, functional expression and substrate specificity. **Protein Expression and Purification**, v. 88, 67–79, 2013.
- WADHWA, M. e BAKSHI, M.P.S. Utilization of fruit and vegetable wastes as livestock feed and as a substrate for generation of other value added products. In: Makkar, H.P.S. (Ed.), *Food and Agriculture Organization of United Nations*, v. 4, p. 56, 2013.

- WAN, J.; GUO, J.; MIAO, Z.; GUO, X. Reverse micellar extraction of bromelian from pineapple peel – Effect of surfactant structure. **Food Chemistry**, v. 197, p. 450–456, 2016.
- WANG, Y-C.; CHUANG, Y-C.; HSU, H-W. The flavonoid, carotenoid and pectin content in peels of citrus cultivated in Taiwan. **Food Chemistry**, v. 106, p. 277–284, 2008.
- WEERASOORIYA, M. K. B. e GUNASEKARA, O. S. W. Partially purified rubber seed lipase for eficiente removal of fatty soil. **Journal of the National Science Foundation of Sri Lanka**, v. 39, n. 1, p. 69–76, 2011.
- WILKINS, M. R.; WIDMER, W. W.; GROHMANN, K.; CAMERON, R. G. Hydrolysis of grapefruit peel waste with cellulase and pectinase enzymes. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 1596–1601, 2007.
- WOICIECHOWSKI, A. L.; CARVALHO, J. C.; SPIER, M. R.; HABU, S.; YAMAGUISHI, C. T.; GHIGGI, V.; SOCCOL, C. R. Emprego de resíduos agroindustriais em bioprocessos alimentares. Capítulo de Biotecnologia de Alimentos, Coleção Ciência, Tecnologia, Engenharia de alimentos e Nutrição, editora Atheneu, São Paulo, Rio de Janeiro e Belo Horizonte, v. 12, p. 143–172, 2013.
- ZHISHEN, J.; MENGCHENG, T.; JIANMING, W. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. **Food Chemistry**, v. 64, p. 555–559, 1999.
- ZHOU, Z. Q. Citrus fruits nutrition. Beijing, China: Science Press, 2012.
- ZHU, Q.Y.; HACKMAN, R. M.; ENSUNSA, J. L.; HOLT, R. R.; KEEN, C. L. Antioxidative activities of oolong tea. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 50, p. 692–699, 2002.
- ZOU, Z.; XI, W.; HU, Y.; NIE, C.; ZHOU, Z. Antioxidant activity of Citrus fruits. **Food Chemistry**, v. 196, p. 885–896, 2016.