

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE ARARAQUARA

LIDIANE PATRICIA DE ANDRADE

**EXTRAÇÃO E BIOTRANSFORMAÇÃO DE FLAVONOIDES A PARTIR
DE RESÍDUO DE INDÚSTRIA CÍTRICA**

Araraquara-SP

2019

LIDIANE PATRICIA DE ANDRADE

**EXTRAÇÃO E BIOTRANSFORMAÇÃO DE FLAVONOIDES A PARTIR
DE RESÍDUO DE INDÚSTRIA CÍTRICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Biomateriais e Bioprocessos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas como requisito necessário à obtenção do título de Mestre em Engenharia de Biomateriais e Bioprocessos

Área de Concentração: Biomateriais e Bioprocessos

Orientador: Prof. Dr Guilherme Peixoto
Coorientadora: Profa. Dra. Juliana Cristina Bassan

Araraquara-SP
2019

Ficha Catalográfica

Elaborada Por Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

A553e Andrade, Lidianie Patricia de.
Extração e biotransformação de flavonoides a partir de resíduo de indústria cítrica / Lidianie Patricia de Andrade. – Araraquara, 2019.
74 f. : il.

Dissertação (Mestrado Profissional) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós- Graduação em Engenharia de Biomateriais e Bioprocessos. Área de Concentração: Biomateriais e Bioprocessos.

Orientador: Guilherme Peixoto.
Coorientadora: Juliana Cristina Bassan.

1. Flavanonas. 2. Hidrólise enzimática. 3. Atividade antioxidante. 4. Resíduos. I. Peixoto, Guilherme, orient. II. Bassan, Juliana Cristina, coorient. III. Título.

CAPES: 33004030170P0



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Araraquara



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

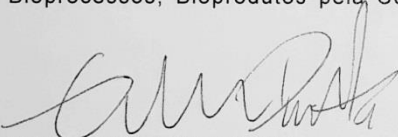
TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: EXTRAÇÃO E BIOTRANSFORMAÇÃO DE FLAVONÓIDES A PARTIR DE RESÍDUO DE INDÚSTRIA CÍTRICA

AUTORA: LIDIANE PATRÍCIA DE ANDRADE

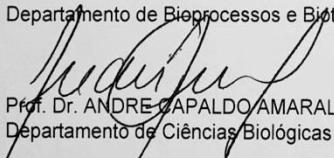
ORIENTADOR: GUILHERME PEIXOTO

COORIENTADORA: JULIANA CRISTINA BASSAN

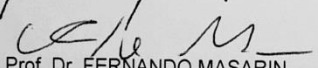
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em ENGENHARIA DE BIOMATERIAIS E BIOPROCESSOS (MESTRADO PROFISSIONAL), área: Biomateriais, Bioprocessos, Bioprodutos pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. GUILHERME PEIXOTO

Departamento de Bioprocessos e Biotecnologia / Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP - Araraquara


Prof. Dr. ANDRÉ CAPALDO AMARAL

Departamento de Ciências Biológicas e da Saúde / Universidade de Araraquara - UNIARA


Prof. Dr. FERNANDO MASARIN

Departamento de Bioprocessos e Biotecnologia / Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP - Araraquara

Araraquara, 28 de janeiro de 2019

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus que através das minhas crenças me proporcionou paz e serenidade para esta fase tão importante.

Ao meu querido marido João Bolzan Filho, com muita gratidão por todo o companheirismo, apoio e dedicação com que se prontificou a me ajudar por todo esse período.

Ao Prof. Dr. Guilherme Peixoto que foi orientador do meu trabalho, proporcionou verbas para que o mesmo fosse realizado.

A profa. Dra. Juliana Cristina Bassan, que me orientou no desenvolvimento deste trabalho com conhecimentos e informações que me permitiram compreender e desenvolver essa proposta.

Ao Prof. Dr. Rubens Monti pela disponibilização de equipamentos e do laboratório de enzimologia industrial onde foi realizado grande parte da pesquisa experimental.

Ao Prof. Dr. Fernando Masarin pela disponibilização de equipamentos para realização de parte das extrações.

Ao Departamento de Bioprocessos de Biotecnologia UNESP-FCFAR-DBB que me permitiu usar laboratórios e equipamentos para desenvolver a pesquisa.

Ao programa do Mestrado Profissional em Engenharia de Biomateriais e Bioprocessos pela oportunidade de fazer parte do conselho de Pós Graduação.

À Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal do Ensino Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Ao Programa de Apoio ao Desenvolvimento Científico (PADC-Súmula 245- Processo 23/2017).

RESUMO

ANDRADE.P.L. **Extração e biotransformação de flavonoides á partir de resíduo de indústria cítrica.** Dissertação (Mestrado em Engenharia de Biomateriais e Bioprocessos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Departamento Engenharia de Biomateriais e Bioprocessos, Universidade Estadual Paulista (Unesp) Araraquara, 2019.

O Brasil foi considerado o maior produtor mundial de laranja, no qual a maior parte desta produção foi destinada para a produção de suco, classificando-o como maior produtor e exportador da bebida. Porém associado a alta produção de suco está o grande volume de resíduos orgânicos gerados que traz à indústria a preocupação com o aproveitamento e/ou descarte desse material. Atualmente grande parte dos resíduos é descartada em aterros e apenas uma parte é reaproveitada para ração animal e extração de pectina. Nesses resíduos descartados podem ser encontrados compostos de alto valor agregado, entre eles uma diversidade de compostos fenólicos, com destaque para os flavonoides. Bioquimicamente, esses fitoquímicos ocupam um papel significativo na dieta humana, pois são reconhecidos por apresentarem atividades biológicas como excelente capacidade antioxidante, atividade anticarcinogênica, anti-inflamatória, etc. Diante do exposto, o projeto teve como objetivo principal a valorização dos resíduos gerados pela indústria citrícola, visando sua biotransformação em produtos com valor agregado. Para que tal mudança de paradigma seja possível, esse projeto propôs a extração de flavonoides de resíduos do processamento de suco de laranja com foco nas flavanonas, naringina, hesperidina e naringenina. Na primeira etapa do projeto, foram realizadas extrações para obter um melhor método de extração de flavonoides e os resultados apresentados demonstram que a extração utilizando o tratamento trituração água apresentou melhor rendimento (0,26g/L) para flavanonas totais considerando o resíduo casca, para o resíduo “frit”, o tratamento alcoólico apresentou maiores rendimentos 26% maior comparado ao tratamento água. Nas análises realizadas em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), considerando a somatória do rendimento dos compostos de interesse para a hidrólise (naringina, narirutina e hesperidina), o tratamento alcoólico apresentou o maior rendimento 1,02 g/L, seguido do tratamento Trituração água com rendimento de 0,25 g/L e o tratamento prensagem que apresentou um rendimento de 0,19 g/L. A partir desse resultado, esses tratamentos foram usados para o processo de biotransformação pela enzima naringinase, onde conseguimos demonstrar que após a hidrólise houve a liberação de flavanonas não glicosiladas, naringenina e heperetina que contribuíram significativamente para o aumento da capacidade antioxidante, com um aumento de 8% para o tratamento trituração água e 19% para a prensagem considerando o resíduo casca e 1% e 16% para o resíduo “frit” respectivamente. Dessa forma podemos concluir que os métodos de extração além de influenciarem na eficiência de extração das flavanonas, também interferem na conversão enzimática das formas glicosiladas para as formas não glicosiladas e que a escolha do método de extração deve levar em consideração o produto pretendido e a viabilidade técnica e econômica.

Palavras- Chave: Flavanonas. Hidrólise enzimática. Atividade antioxidante. Resíduos.

ABSTRACT

ANDRADE.P.L. **Extraction and biotransformation of flavonoids from the chemical of citrus industry.** Dissertation (Master in Biomaterials and Bioprocess Engineering) - School of Pharmaceutical Sciences, Araraquara, Department of Biomaterials and Bioprocesses, São Paulo State University (Unesp), Araraquara, 2019.

Brazil was considered the world's largest orange producer, in which most of this production was destined for juice production, ranking it as the largest producer and exporter of the beverage. However associated to the high production of juice is the large volume of organic waste generated that brings to the industry the concern with the use and / or disposal of this material. Currently much of the waste is discarded in landfills and only part is reused for animal feed and pectin extraction. In these discarded residues can be found compounds of high added value, among them a diversity of phenolic compounds, especially the flavonoids. Biochemically, these phytochemicals play a significant role in the human diet, as they are recognized for their biological activities as excellent antioxidant capacity, anticarcinogenic, anti-inflammatory activity, etc. In view of the above, the main objective of the project was the valorization of the waste generated by the citrus industry, aiming at its biotransformation in products with added value. In order to make such a paradigm shift possible, this project proposed the extraction of flavonoids from processing residues of orange juice with focus on flavanones, naringin, hesperidin and naringenin. In the first stage of the project, extractions were carried out to obtain a better flavonoid extraction method and the results showed that the extraction using the water grinding treatment presented a better yield (0.26 g / L) for total flavanones considering the shell residue, for the “*frit*” residue (bark fragment) presented higher yields 26% higher compared to the water treatment, however, ethanol acted as an inhibitor of the naringinase enzyme. In the analyzes performed in High Performance Liquid Chromatography (HPLC), considering the sum of the yield of the compounds of interest for the hydrolysis (naringin, narirutine and hesperidin), the alcohol treatment had the highest yield 1.02 g / L, followed by the treatment Water grinding at 0.25 g / L yield and the press treatment yielded a yield of 0.19 g / L. From this result, these treatments were used for the biotransformation process by the enzyme naringinase, where we were able to demonstrate that after the hydrolysis there was the release of non-glycosylated flavanones, naringenin and heperetin that contributed significantly to the increase of the antioxidant capacity, with an increase of 8% for the treatment crushing water and 19% for the pressing considering the residues peel and 1% and 16% for the “*frit*” residue (shell fragment) respectively. In this way we can conclude that the extraction methods besides influencing the extraction efficiency of flavanones also interfere in the enzymatic conversion of the glycosylated forms to the non-glycosylated forms and that the choice of the extraction method must take into account the desired product and the viability technical and economic.

Key words: Flavanones. Enzymatic hydrolysis. Antioxidant activity. Residues.

Lista de figuras

Figura 1. Morfologia da laranja	16
Figura 2. Distribuição da área plantada por variedade e quantidade de árvores.	18
Figura 3. Laranjas: Área de pomares em formação e adultos por região (Hectares).	18
Figura 4. Fluxograma simplificado do processo de produção de suco de laranja em indústria cítrica.	20
Figura 5. Estrutura básica dos flavonoides.....	21
Figura 6. Estrutura química dos flavonoides e flavanonas.	23
Figura 7. Medicamentos comerciais que contem Hesperidina.	27
Figura 8. Reação e transformação por meio da Hidrólise da naringina pela enzima naringinase.....	33
Figura 9. Extratoras: Centro de Tecnologia de Pesquisa para Processamento de Frutas e Vegetais <i>Jhon Bean Technologies</i> (JBT).	35
Figura 10. Amostras dos resíduos gerados pela extratora de copos modelo JBT e utilizadas no projeto.	35
Figura 11. Fluxograma genérico de processamento de citros.....	37
Figura 12. Mecanismo de determinação de atividade antioxidante. Estabilização do radical ABTS•+ por um antioxidante e sua formação pelo persulfato de potássio. ...	42
Figura 13. Reação da atividade antioxidante utilizando o método ABTS	42
Figura 14. Perfil colorimétrico para açúcares totais redutores (DNS).....	43
Figura 15. Perfil colorimétrico de fenólicos totais e flavanonas totais. <i>Análise dos resultados dos fenólicos totais.</i>	45
Figura 16. Perfil colorimétrico de fenólicos totais e flavanonas totais. <i>Análise dos resultados das flavanonas totais.</i>	46
Figura 17. Consolidado perfil colorimétrico Flavanonas totais	47
Figura 18. Perfil cromatográfico para Curva Padrão	49
Figura 19. Cromatograma da amostra de resíduo laranja Pera Rio	49
Figura 20. Teores de flavanonas glicosiladas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Pré- hidrólise.	50
Figura 21. Tratamentos selecionados para etapa de hidrólise enzimática.....	52
Figura 22. Teores de flavanonas glicosiladas naringina, naringina e hesperidina após modificação pela naringinase nos tempos de 1 e 3 horas. <i>Resíduo casca.</i>	53
Figura 23. Teores de flavanonas glicosiladas naringina, naringina e hesperidina após modificação pela naringinase nos tempos de 1 e 3 horas. <i>Resíduo "Frit".</i>	54
Figura 24. Capacidade antioxidante dos extratos antes e após modificação enzimática.	57

Lista de tabelas

Tabela 1. Tipos de Laranja Doce: Distribuição das árvores de laranja produtivas e não produtivas.	17
Tabela 2. Valor médio dos teores de hesperidina e naringina encontrados em sucos de laranja.....	22
Tabela 3. Exportações da cadeia produtiva Brasileira - Medicamentos e Insumos...	29
Tabela 4. Capacidade antioxidante dos extratos antes e após modificação enzimática. Análise estatística entre os tempos pré-hidrolise, 1 e 3 horas.	57
Tabela 5. Rendimento/tonelada e estimativa para a obtenção de prunina, com valor de compra aplicado ao mercado atual.....	59
Tabela 6. Rendimento/tonelada e estimativa para a hesperidina considerando o valor de compra aplicado no mercado atual.....	60
Tabela 7. Rendimento/tonelada e estimativa para a naringina considerando o valor de compra aplicado no mercado atual.....	61

Lista de quadros

Quadro 1. Composição da laranja.....	15
Quadro 2. Importantes propriedades biológicas de compostos bioativos presentes em resíduos cítricos.	25
Quadro 3. Estudos sobre a aplicação farmacológica das flavanonas hesperidina e naringina.....	26
Quadro 4. Diferentes métodos aplicados para a extração de flavonoides	38

Sumário

RESUMO
ABSTRACT
LISTA DE FIGURAS
LISTA DE TABELAS
LISTA DE QUADROS

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRAFICA	13
1.1. Os Cítricos	14
1.2. Composição Química e morfológica da laranja	15
1.3. Variedades de Laranjas doce produzidas no Brasil	16
1.4. Laranja doce (<i>Citrus Sinensis</i>): Variedade Pera Rio.....	18
1.5. Geração de Resíduos Cítricos e Impactos Ambientais	19
1.6. Flavonoides	20
1.6.1. Naringina.....	21
1.6.2. Hesperidina.....	22
1.7. Bioatividade dos flavonoides e sua aplicação nas Indústrias Farmacêutica e Alimentícia.....	24
1.7.1. Aplicações no Mercado Farmacêutico.....	27
1.8. Extração de Compostos fenólicos	29
1.9. Biotransformação de substâncias por enzimas.....	31
1.9.1. Enzima Naringinase	32
2. OBJETIVOS	34
2.1. Objetivo Geral.....	34
2.2. Objetivos Específicos	34
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	35
3.1. Material	35
3.2. FLUXOGRAMA EXPERIMENTAL	36
3.3. Métodos de extração dos flavonoides.....	37
3.4. Determinação dos flavonoides.....	38
3.4.1. Determinação dos compostos fenólicos totais pelo método de <i>Folin-Ciocalteu</i> ..	39
3.4.2. Determinação de flavanonas pelo método de Davis.....	39

3.4.3.	Determinação de açúcares redutores totais	39
3.4.4.	Determinação do perfil de flavonoides por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência- CLAE	39
3.5.	Biotransformação dos flavonoides: Hidrólise Enzimática das Flavanonas e atividade enzimática.	40
3.5.1.	Modificação enzimática das flavanonas naringina, narirutina e hesperidina.	41
3.6.	Atividade Antioxidante	41
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
4.1.	Extração de compostos fenólicos e caracterização dos extratos obtidos a partir dos resíduos cítricos da Variedade Pera Rio Meia Estação – Safra 2018.....	43
4.1.1.	Determinação de açúcares redutores totais para os resíduos casca, <i>frit</i> e bagaço.	43
4.1.2.	Determinação de fenólicos totais para os resíduos casca, <i>frit</i> e bagaço.....	44
4.1.3.	Determinação de flavanonas totais para os resíduos casca, <i>frit</i> e bagaço.....	46
4.2.	Determinação da concentração de flavanonas glicosiladas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) - Seleção dos resíduos	48
4.2.1.	Determinação da concentração de flavanonas glicosiladas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) Pré da hidrólise.	49
4.3.	Biotransformação de substâncias por enzimas: Hidrólise Enzimática.	51
4.3.1.	Concentração de flavanonas glicosiladas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) após hidrólise enzimática.....	52
4.4.	Determinação da atividade antioxidante dos extratos antes e após modificação enzimática	56
4.5.	Rendimento dos produtos por tonelada de laranja processada <i>versus</i> valor estimado de mercado	58
5.	CONCLUSÃO.....	62
6.	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	63
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	64
 ANEXO 1		
ANEXO 2		

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRAFICA

A cultura de citros está entre as mais populares em regiões tropicais e subtropicais de todo o mundo. Entre os mais variados tipos de frutas cítricas, a laranja doce (*Citrus sinensis*) representa cerca de 70 % da produção e consumo, sendo considerada o principal fruto desse grupo. Além da laranja doce, a tangerina (*Citrus reticulata*), grapefruit (*Citrus vitis*), lima (*Citrus aurantifolia*) e limão (*Citrus limonum*) são largamente cultivados e consumidos (SHARMA *et al.*, 2017). No que diz respeito à produção, o Brasil se destaca por ser o maior produtor mundial de laranja doce (área plantada de 800 mil hectares) produzindo na safra 2015/2016 aproximadamente 12.266.520 toneladas das quais, cerca de 90% foram destinadas para produção de suco (CITRUS BR, 2016).

Dentro desse cenário o Brasil desponta como o maior produtor e exportador de suco de laranja (SANTOS *et al.*, 2015). Dados fornecidos pelo Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA) mostraram que o Brasil alcançou 61,3% da produção mundial de suco de laranja, considerando a safra de 2015/2016, e liderou o *ranking* de exportações com 75,3% do mercado. Associado à elevada produção de suco de laranja está a geração de grandes volumes de resíduos, dos quais do total de fruta processada, cerca de 50% correspondem ao material residual (SANTOS *et al.*, 2015). Em âmbito mundial aproximadamente 30 milhões de toneladas de laranja são processadas resultando nesses resíduos que são denominados como resíduos de processamento de citros CPW (*citrus processing waste*).

De acordo com sua constituição química, os CPW *ainda* apresentam potencial econômico, pois contém uma variedade de fitoquímicos como flavonoides, carotenoides, fibras dietéticas, açúcares fermentescíveis, óleos essenciais, polifenóis e quantidades consideráveis de alguns elementos como minerais e vitaminas (SHARMA *et al.*, 2017). Entretanto, os resíduos gerados pela indústria citrícola tem se tornado um grande problema de âmbito social e ambiental. Normalmente as indústrias de cítricos secam uma pequena parte do resíduo e vendem como matéria prima para extração de pectina e/ou peletizam para uso em alimentação animal (PURI *et al.*, 2008). Contudo, uma grande parte é ainda descartada em aterros o que pode gerar graves problemas ambientais associados a decomposição de sua matéria orgânica (95% de sólidos totais) (SANTOS *et al.*, 2015).

Os flavonoides são um grande grupo de compostos fenólicos que estão amplamente distribuídos em plantas e, de acordo com sua estrutura química e grau de oxidação, podem ser divididos em diferentes classes, nas quais estão incluídas as flavonas (HAVSTEEN, 2002). Esses compostos ocupam um papel significativo na dieta humana e são encontrados em uma variedade de alimentos (incluindo frutas, vegetais, nozes, cacau, sementes e soja) e bebidas (incluindo café, chá e vinho) (MULVIHILL; BURKE; HUFF, 2016).

São uma importante classe de fitoquímicos reconhecidos por apresentarem atividades biológicas como excelente capacidade antioxidante e atividades anticancerígena e anti-inflamatória (RAJENDRAN *et al.*, 2014; SHARMA *et al.*, 2017). Com relação às frutas cítricas, os flavonoides podem ser divididos em cinco classes que incluem as flavonas, flavanonas, flavonóis, flavanas e antocianinas (essa última apenas em laranjas sanguíneas) (TRIPOLI *et al.*, 2007).

Diante do exposto, esse trabalho justificou-se pelo objetivo de valorização dos resíduos gerados pela indústria citrícola, de forma que o reaproveitamento gere produtos com valor agregado para anular ou converter os atuais custos de descarte em lucro para a indústria processadora de *citros*. Para que tal mudança de paradigma seja possível, foi proposta a extração de flavonoides de resíduos do processamento de suco de laranja doce considerando a variedade Pera rio, com foco nas flavanonas naringina, hesperidina e sua biotransformação em naringenina e hesperetina.

1.1. Os Cítricos

Os citros fazem parte do grupo de plantas da família Rutaceae, representados por laranja, tangerina, limões, limas ácidas como o thaiti e o galego, lima da pérsia, pomelo, cidra, laranja azeda e toranja. Os citros tem sua origem das regiões subtropicais do sul da Ásia (Índia e China) e também da Austrália e África e chegaram ao Brasil trazido pelos Portugueses no século XVI (QUINTERO *et al.*, 2004).

Como o suco é a forma mais comum de consumo, a bebida obtida a partir da laranja está entre as mais consumidas em todo mundo. Devido ao alto consumo atualmente cerca de 70% do total de produção de laranja destina-se para o processamento industrial de suco, para obtenção de sucos espremidos são destinado cerca de 29%. Cerca de 6% é destinado para suco por máquinas tipo *fresh-in squeeze* e/ou para consumo *in natura*. Cabe ressaltar que além de ser uma bebida refrescante e relativamente barata, o suco de laranja é considerada a principal fonte

de flavonoides da dieta humana, com destaque para as flavanonas glicosiladas hesperidina e naringina (NEVES *et al.*, 2010) sendo a laranja doce a que apresenta as maiores concentrações de hesperidina (JUSTESEN; KNUTHSEN; LETH, 1997).

1.2. Composição Química e morfológica da laranja

A laranja é caracterizada por apresentar uma variedade de compostos. As principais substâncias encontram-se discriminadas no quadro 1:

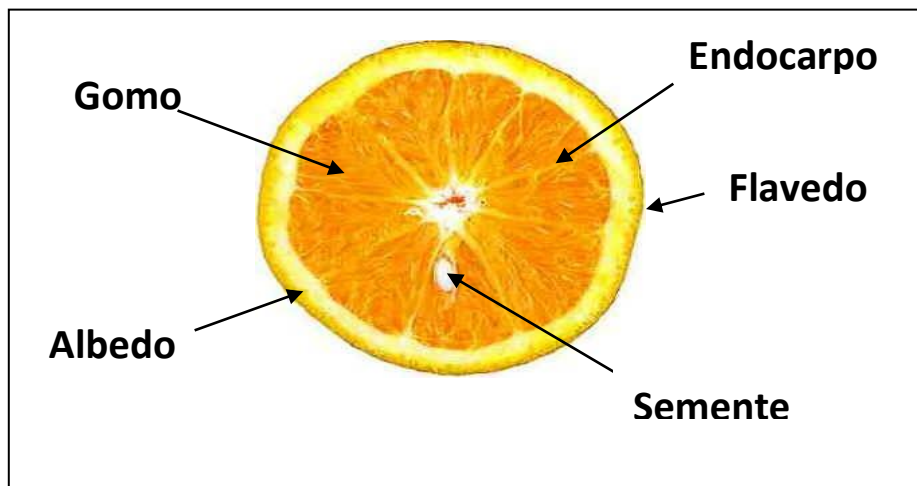
Quadro 1. Composição da laranja

COMPOSTOS	
Minerais	Cálcio, Fósforo, Ferro
Vitaminas	A, complexo B e vitamina C
Nitrogênio	1-2 g/kg em base úmida
Lipídios	Oleico, linoleico, linolênico, palmítico, esteárico, glicerol
Açúcares	Glicose, frutose, sacarose
Ácidos	Cítrico, Málico
Carboidratos	Celulose, pectina
Enzimas	Pectinesterase, fosfatase, peroxidase
Flavonoides	Hesperidina, Naringina
Compostos Amargos	Limonina, isolimonina
Óleo essencial	d-limoneno
Constituintes voláteis	Álcoois, aldeídos, cetonas, ésteres, hidrocarbonetos e ácidos
Pigmentos	Carotenos, xantofilas
Carotenoides	Potássio

Fonte: Adaptação de (Bampidis e Robinson, 2006)

Atualmente, as laranjas são cultivadas em climas tropicais e subtropicais (AWAN, 2013) sendo morfológicamente composta por gomo, endocarpo, albedo, flavedo e semente, conforme Figura 1.

Figura 1. Morfologia da laranja



Fonte: <http://www.portalsaofrancisco.com.br/alimentos/laranja> (acessado em 27/11/2017).

1.3. Variedades de Laranjas doce produzidas no Brasil

De acordo com dados do Fundo de Defesa da Citricultura - FUNDECITRUS, as variedades de laranjas doces que constituem praticamente todo o cinturão citrícola brasileiro são: laranja Pera Rio (meia-estação) com 35% da produção total, Valência (tardia) com 27%, Hamlin (precoce) com 11%, Natal (tardia) com 11% e Valência Folha Murcha (tardia) com 4%. A Tabela 1 traz a distribuição completa do volume de árvores por variedade e suas participações em relação ao total de árvores de laranjas (FUNDECITRUS, 2018). No Brasil existe em torno de 194 milhões de árvores numa área total de 400.470 hectares, distribuídas nas regiões Norte, Nordeste, Centro, Sul e Sudoeste do estado de São Paulo que se refere ao levantamento de áreas de plantio de laranja doce nas regiões de São Paulo e Triângulo/Sudoeste Mineiro realizado pela Fundecitrus e publicado no ano de 2018.

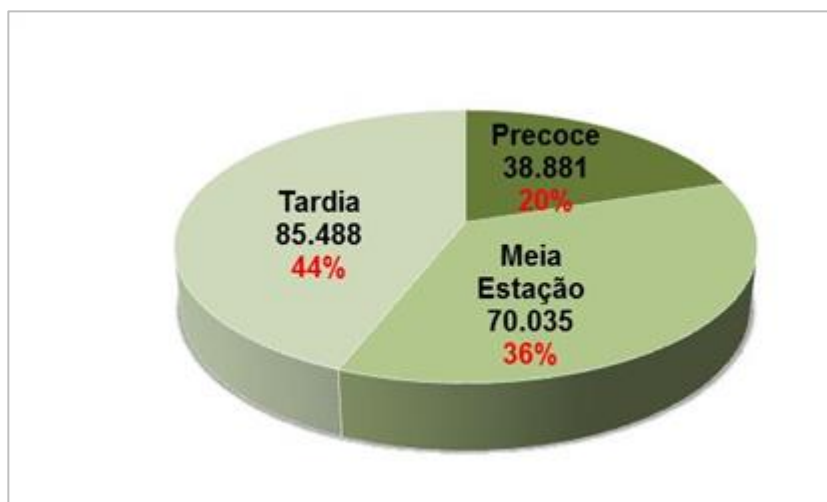
Tabela 1. Tipos de Laranja Doce: Distribuição das árvores de laranja produtivas e não produtivas.

Setor	Precoce						Meia Estação	Tardia		
	Hamlin	Westin	Rubi	Valência Americana	Seleta	Pineapple	Pera Rio	Valência	V.Folha Murcha	Natal
Norte	6.338,01	662,07	756,15	2.016,27	0,93	126,96	13.612,00	13.102,89	1.501,78	4.129,04
Noroeste	2.121,99	128,71	477,56	1.300,38	-	87,07	9.689,60	3.234,01	1.022,85	1.997,08
Centro	6.802,43	228,37	1.059,14	3.124,46	39,78	464,56	20.450,84	15.603,96	2.544,14	5.370,27
Sul	3.419,14	1.313,78	705,88	529,41	33,75	6,09	14.931,03	11.384,82	2.385,63	3.722,57
Sudoeste	4.041,37	508,89	1.139,06	982,66	11,13	455,27	11.351,78	11.797,10	1.245,52	6.447,08
Total	22.722,94	2.841,82	4.137,79	7.953,18	85,59	1.139,95	70.035,25	55.122,78	8.699,92	21.666,04

Fonte: Adaptado de (FUNDECITRUS, 2018).

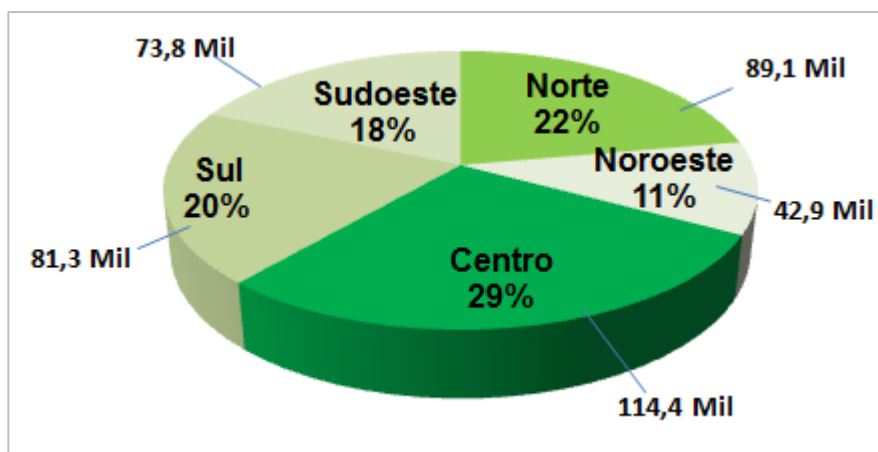
Conforme informações apresentadas na Tabela 1, observa-se que a variedade Hamlin, considerada precoce, apresenta maiores quantidades de árvores plantadas, já a variedade Pera Rio é a única variedade de meia estação que foi considerada no estudo. A variedade Valência, considerada Tardia, apresenta uma ampla quantidade de árvores plantadas. Esses dados contribuem significativamente para uma previsão das variedades que serão utilizadas em maiores quantidades pelas indústrias cítricas na produção de sucos e consequentemente a geração de resíduos. Esta estimativa realizada pela FUNDECITRUS em 2018 disponibiliza informações importantes quanto ao percentual das variedades disponíveis na colheita de laranja da safra prevista para 2018/2019, conforme apresentado nas Figuras 2 e 3.

Figura 2. Distribuição da área plantada por variedade e quantidade de árvores.



Fonte: Adaptado de (FUNDECITRUS, 2018)

Figura 3. Laranjas: Área de pomares em formação e adultos por região (Hectares).



Regiões: NORTE: Triângulo mineiro, Bebedouro e Altinópolis. NOROESTE: Votuporanga e S.J. Rio Preto. CENTRO: Matão, Duartina e Brotas. SUL: Porto Ferreira e Limeira. SUDOESTE: Avaré e Itapetininga.

Fonte: Adaptado de (FUNDECITRUS, 2018)

1.4. Laranja doce (*Citrus Sinensis*): Variedade Pera Rio

A variedade de laranja Pera Rio é considerada a mais importante variedade cítrica no Brasil, sendo amplamente utilizada pela indústria cítrica para produção de suco. Mesmo antes do período de industrialização a variedade Pera Rio já tinha destaque no consumo e cultivo. No Brasil essa variedade é considerada Semi Tardia ou Meia Estação e apresenta frutos medianos estando entre as variedades Hamlin (os menores) e a Natal e Valencia (os maiores). O período de colheita deste fruto ocorre de julho a dezembro onde se encontra nas condições ideais de qualidade para

produção industrial de suco (DONADIO, 1999). Algumas condições consideradas ideais de clima e solo para o cultivo de laranjeiras:

- **Clima:** A faixa de temperatura para vegetação está entre 22°C e 33°C (nunca acima de 36°C e nunca abaixo de 12°C) com média anual em torno de 25°C. O ideal anual de chuvas está em 1.200mm bem distribuídos ao longo do ano e o déficit hídrico deve ser corrigido com irrigação artificial e a umidade do ar deve estar em 80%. Essas características climáticas influem diretamente na qualidade e composição do fruto (teor de suco, de sólidos, maturação, volume de frutos, outros) da espécie.
- **Solos:** Apesar de a laranjeira conseguir se desenvolver em vários tipos de solo, como arenosos á argilosos, desde que sejam profundos e permeáveis, a laranjeira preferem os solos areno-argilosos e até argilosos porosos, profundos e bem drenados. Evitar solos rasos e sujeitos a encharcamentos; pH na faixa 6,0 a 6,5 (DORNELLES, 1988).

As condições climáticas do Brasil permitem ao país desenvolver uma citricultura tropical, dos arredores do Equador onde predominam temperaturas mais altas, em uma citricultura menos tropical até no Rio Grande do Sul, de clima mais frio (EMBRAPA, 2003).

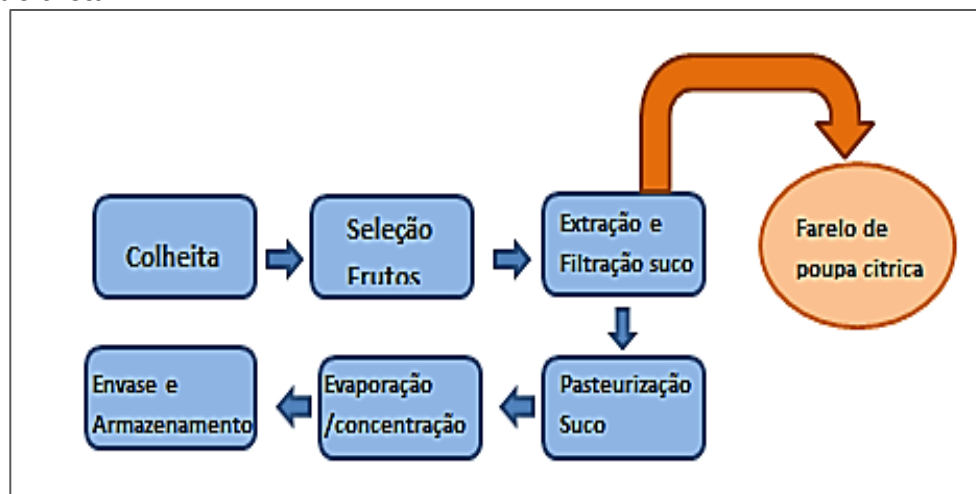
1.5. Geração de Resíduos Cítricos e Impactos Ambientais

O Brasil processa 47% das frutas cítricas do mundo, seguido pelo Reino Unido (29%) (SHARMA *et al.*, 2017). A variedade de laranja doce (*Citrus sinensis*) é a fruta processada em maior quantidade no Brasil, sendo que aproximadamente 70% dos frutos produzidos são destinados para a produção de suco (NEVES *et al.*, 2010). Na produção industrial de sucos a indústria obtém os subprodutos deste processamento, como óleos, aromas e polpa (EMBRAPA, 2014).

O resíduo industrial originado no processamento de suco de laranja também é utilizado para produção de *pellets* que são destinados a fabricação de ração animal. Geralmente, após a extração do suco, gera-se 50% de resíduo constituído por casca, semente e membranas, que são secos e comercializados, (POURBAFRANI *et al.*, 2010). Uma parte deste resíduo é usada como matéria prima para extração de pectina, porém a maior parte ainda é destinada para alimentação animal por meio do farelo de poupa cítrica, conforme apresentado na Figura 4 (PURI *et al.*, 2008). Além dos produtos mencionados, estes resíduos constituem uma das principais fontes de

compostos fenólicos na alimentação humana, com ênfase na naringina e hesperidina, que atualmente são extraídas para fins medicinais, pois são potentes antioxidantes naturais (KHAN; ZILL-E-HUMA; DANGLES, 2014).

Figura 4. Fluxograma simplificado do processo de produção de suco de laranja em indústria cítrica.

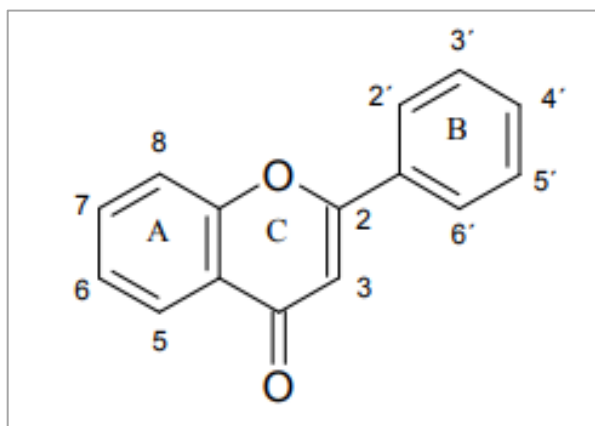


Fonte: Adaptado de (CYPRIANO *et al.*, 2017)

1.6. Flavonoides

Conforme as características químicas e biossintéticas, os flavonoides são separados em diversas classes: flavonas, flavonóis, dihidroflavonóides (flavanonas e flavanonóis), antocianidinas, isoflavonoides, auronas, neoflavonoides, biflavonoides, catequinas, flavanas e seus precursores metabólicos conhecidos como chalconas, podendo ocorrer como agliconas livres e glicosiladas e como derivados metilados (HAVSTEEN, 2002). Os principais flavonoides cítricos pertencem ao grupo das flavanonas, sendo predominantes a naringina e a hesperidina, para os quais se tem verificado sua biodisponibilidade para dieta e seu potencial antioxidante (DESIDERIO, ROSSI; SINIBALDI, 2005).

Os flavonoides são muito estudados por apresentarem atividades biológicas e aplicações farmacológicas, tais como ação antimicrobiana, anti-inflamatória, antialérgica e propriedades antioxidantes correlacionadas a efeitos protetores em doenças cardiovasculares e algumas formas de câncer. Quimicamente, são constituídos por anéis fenólicos que diferem entre si pela sua estrutura química, apresentam 15 átomos de carbono na forma C6 – C3 – C6, baseada no núcleo de dois anéis benzênicos, A e B, ligados a um anel pirano, C conforme estrutura química apresentada na figura 5.

Figura 5. Estrutura básica dos flavonoides

Fonte: (BEHLING *et al.*, 2004)

Entre as flavanonas, os glicosilados naringina e hesperidina e suas agliconas naringenina e a hesperetina são de especial interesse devido à sua alta prevalência em alimentos (Khan, Zill-E-Huma e Dangles, 2014) sendo que as concentrações mais altas de flavanonas são encontradas na casca em comparação com a parte carnosa de cítricos (KHAN; ZILL-E-HUMA; DANGLES, 2014).

1.6.1. Naringina

A naringina é o principal flavonoide encontrado em laranja azeda (*Citrus aurantium*). Sensorialmente, é responsável pelo gosto amargo da fruta e sua maior concentração está principalmente no albedo da laranja em comparação com outras partes do fruto (CACCAMESE; CHILLEMI, 2010). Tomando como base a toranja (branca, rosa e vermelha), limões e limas, verificou-se que as flavanonas representam em torno de 90% dos flavonoides citros, apresentando uma concentração de 27mg/100g da toranja branca, 18mg/100g nas toranjas rosa e vermelha, onde as flavanonas predominantes foram a naringina e neohesperidosídeo (SILVA, 2009). Na figura 6 é apresentado os valores médios encontrados em sucos de laranja.

1.6.2. Hesperidina

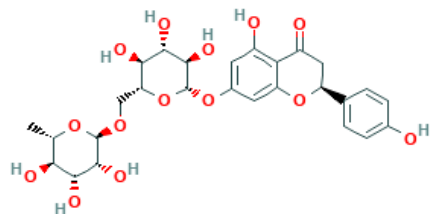
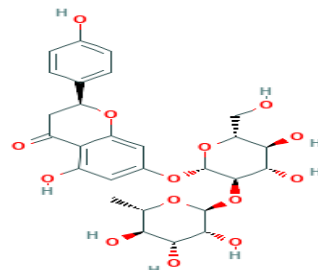
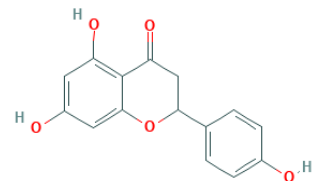
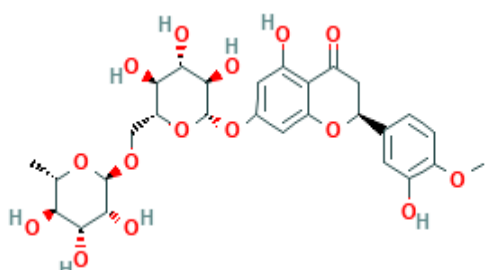
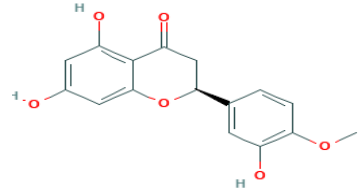
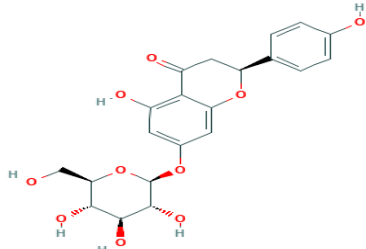
A hesperidina é encontrada em maior quantidade em limas, laranjas doces e tangerinas (KHAN; ZILL-E-HUMA; DANGLES, 2014). As amostras de frutos precoces apresentam maiores quantidades de hesperidina em torno de 65 %, já as amostras de frutos com maior maturidade apresentam percentuais em torno de 40 % de hesperidina (EL-NAWAWI, 1995). Em limões as concentrações de flavanonas são torno de 26mg/100g, em limas 17mg/100g representada em maiores proporções pela hesperidina (SILVA, 2009). Na figura 6 são apresentados os valores médios de concentrações encontradas em sucos espremidos a mão e produzidos industrialmente. A estrutura química da hesperidina está apresentada na Figura 7 onde esta apresentada à estrutura química dos flavonoides e flavanonas.

Tabela 2. Valor médio dos teores de hesperidina e naringina encontrados em sucos de laranja

Tipos de suco	Hesperidina	Naringina
Sucos de laranja espremidos a mão	12,54 mg/100g (<i>mínimo 2,64 e máximo 39,20 mg/100g</i>)	2,19mg/100g (<i>mínimo 0,01 e máximo 6,37 mg/100g</i>)
Sucos industriais	26,21mg/100g (<i>mínimo de 15,35 e máximo 32,29 mg/100g</i>)	3,27 mg/100g (<i>mínimo 2,56 e maximo 4,38 mg/100g</i>)

Fonte: Adaptado de (SILVA, 2009)

Figura 6. Estrutura química dos flavonoides e flavanonas.

Flavonoide	Formula Molecular	Peso Molecular (g/Mol)	Estrutura Molecular
Narirutina	C ₂₇ H ₃₂ O ₁₄	580,5	
Naringina	C ₂₇ H ₃₂ O ₁₄	580,5	
Naringenina	C ₁₅ H ₁₂ O ₅	272,2	
Hesperidina	C ₂₈ H ₃₄ O ₁₅	610,0	
Hesperetina	C ₁₆ H ₁₄ O ₆	302,2	
Prunina	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₀	434,3	

Fonte: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Narirutin#section=3D-Conformer>
(acessado em 19/09/2018)

1.7. Bioatividade dos flavonoides e sua aplicação nas Indústrias Farmacêutica e Alimentícia

Os flavonoides podem ser de grande interesse para a indústria de alimentos e farmacêutica, uma vez que possuem propriedades benéficas para a saúde como proteção contra doenças cardíacas e propriedades antioxidantes, melhorando a qualidade de vida e o valor nutricional dos alimentos (Escobar, 2010). Na literatura especializada são muitos os trabalhos que mostram que os compostos bioativos extraídos de frutas cítricas apresentam uma variedade de propriedades terapêuticas. Alguns exemplos dos efeitos benéficos das flavanonas e dos mecanismos envolvidos são apresentados nos quadros 2 e 3.

Quadro 2. Importantes propriedades biológicas de compostos bioativos presentes em resíduos cítricos.

Princípio composto	Função	Mecanismo de ação
Óleo essencial	Efeito Antibacteriano	Os componentes ativos influenciam certas funções metabólicas das células microbianas (Javed <i>et al.</i> , 2013)
Flavonóides, Óleos cítricos essenciais	Antifúngico, Atividade antiviral	Estimula a síntese de AMP cíclico nas células (Jing <i>et al.</i> , 2014)
Hesperidina e naringina	Atividade Antiplaquetária	Inibe a formação de tromboxano A2 (Yu <i>et al.</i> , 2011)
Hesperidina	Antiinflamatório	Inibe a síntese de eicosanóides e promove a atividade antioxidante de eliminação de radicais livres, também inibe as cinases e as fosfodiesterases essenciais para a transdução e ativação do sinal celular (Tripoli <i>et al.</i> , 2007)
Polymethoxyflavones, Flavonóides, limonoides, B-caroteno	Efeito anticancerígeno	Repressão do ciclo celular, suprime a proliferação e proapoptose, antiangiogênese (Wang <i>et al.</i> , 2014)
Flavonóides (naringenina e rutina)	Efeito antimutagênico	Absorve a luz ultravioleta e protege o DNA interagindo diretamente com os agentes tumorais, como na aberrações cromossômicas induzidas por bleomicina (Tripoli <i>et al.</i> , 2007)
Flavonas, polifenóis,	Efeito antiproliferativo	Inibe a proliferação de MDA-MB-435, MCF-7 e células de câncer de mama humano (Benavente-Garcia <i>et al.</i> , 2008)
Óleo essencial (flavonóides), Fenólicos, limonoids, Cumarinas	Atividade antioxidante	Flavonóides, limonoides, cumarinas atuam como doadores de átomos de hidrogênio ou elétrons na transformação do radical DPPH na sua forma reduzida DPPH-H (Javed <i>et al.</i> , 2013)
Extração de cascas	Antilipoperoxidação das atividades	Inibe a lactoperoxidase do tecido e reduz o nível de hormônios da tireóide e glicose no plasma, paralelamente com um aumento na concentração de insulina (Parmar e Kar, 2008)
Flavonoides	Doenças cardiovasculares	Melhora a vasodilatação coronária, diminui a atividade plaquetária para coagular o sangue e evita a oxidação de lipoproteínas de baixa densidade (Chanet <i>et al.</i> , 2012)
Flavonoides	Anti - Hiperglicêmico	Os flavonóides de citros se ligam parcialmente ao amido, aumentando a glicólise hepática e a concentração de glicogênio e reduz a hepatitegluconeogênese (Shen <i>et al.</i> , 2012)
Óleos de casca	Efeitos lipolíticos	A presença de ζ -terpineno e p-cimeno mostrou efeito lipolítico
Flavonoides	Efeitos neuroprotetores	Protege os neurônios corticais contra o estresse oxidativo, neurotoxicidade A β -associada e a excitotoxicidade induzida pelo glutamato (Choio, 2006)
Polymethoxyflavones	Inibidor de biofilme	Inibir a sinalização das célula-célula e a formação de biofilmes (Uckoo <i>et al.</i> , 2015)

Fonte: Adaptado de (Sharma *et al.*, 2017)

Quadro 3. Estudos sobre a aplicação farmacológica das flavanonas hesperidina e naringina.

Flavonoide	Publicações
Hesperidina	Hesperidina é um flavonoide cítrico de grande interesse medicinal associado à redução dos riscos de câncer, colesterol e derrames, além de atuar como agente antioxidante, anti-inflamatório, antimicrobiano e antiviral (Rivas <i>et al.</i> , 2008) (Cano, Medina e Bermejo, 2008).
	Efeito inibitório da hesperidina sobre Pleurisia (inflamação crônica dos pulmões) induzida por carragenina. Nos estudos realizados em ratos os resultados mostraram uma redução no número de leucócitos migrantes por 48% e 34%, respectivamente, o que torna hesperidina um agente anti-inflamatório.
	Atividade antiviral da hesperidina contra herpes simples, poliomielite, influenza e infecções. A hesperidina mostrou efeito antimicrobiano contra salmonela.
Naringina	A naringenina foi investigada com sucesso para a sua célula antiproliferação em uma linha celular de cancro do cólon HT-29. A proliferação celular foi medida por um ensaio colorimétrico e foi significativamente inibido especialmente quando as células HT-29 foram expostas à naringenina nas doses Superior a 0,7 mM.
	As flavanonas podem proteger os danos do DNA pela sua capacidade de absorver Luz UV. Testes revelaram um considerável efeito protetor da naringenina no UV-induzida para proteção de danos no DNA.

Fonte: Adaptado de (Khan, Zill-E-Huma e Dangles, 2014)

Outro composto de alto valor agregado que pode ser obtido a partir do bagaço de laranja é a nanocelulose, que pode ser usada em diferentes compósitos e nanocompósitos. Estas nanopartículas encontram aplicações nas áreas médicas e de cosméticos aumentando a rigidez de materiais, além de torna-los mais leves e biodegradáveis com o uso da nanocelulose (Cypriano *et al.*, 2017).

1.7.1. Aplicações no Mercado Farmacêutico

Conforme mostrado no quadro 2, os flavonoides apresentam diversas aplicações farmacológicas de seus compostos bioativos, mas apesar desta variedade de substâncias, somente o flavonoide hesperidina é comercializado em grande escala pelo mercado farmacêutico brasileiro, servindo para o tratamento de doenças crônicas de insuficiência venosa. Estes medicamentos são conhecidos comercialmente como: Daflon, Diosmin, Flavenos, Flavonoid, Venaflon e Venovaz (Figura 7) tendo valores de mercado de 60 a 120 reais a caixa. Esses medicamentos são normalmente prescritos para:

- Tratamento das manifestações da **insuficiência venosa crônica**, funcional e orgânica, dos membros inferiores.
- Tratamento dos sintomas funcionais relacionados à **insuficiência venosa do plexo hemorroidário**.
- Alívio dos sinais e sintomas **pré e pós-operatórios de safenectomia** (retirada cirúrgica da veia safena) para alívio dos sinais e sintomas resultantes deste procedimento.

Figura 7. Medicamentos comerciais que contêm Hesperidina.



A doença venosa crônica (DVC) é caracterizada por diversos sintomas entre eles podemos citar a hipertensão, alterações estruturais das veias, varizes e outros sintomas que podem estar relacionados a causa da doença. Devido a sua grande incidência, a DVC apresenta alta prevalência mundial. No Brasil sua prevalência varia

de 41,25 a 62,79% em mulheres e 13,97 a 37,9% nos homens. (Marques Lins *et al.*, 2007).

De acordo com dados da Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA, (2006), os insumos utilizados para produção de medicamentos no Brasil percorrem um longo caminho passando por uma cadeia produtiva até chegar às prateleiras das drogarias.

Visando a garantia de qualidade, a maioria dos insumos consumidos no Brasil é importada, e após chegarem ao Brasil podem ser fracionados por uma empresa, distribuídos por outra e processados por uma terceira empresa antes de chegar às indústrias farmacêuticas. A ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária é responsável por realizar com rigor a fiscalização destes insumos a fim de garantir a qualidade, considerando que o Brasil ocupa a 11^o colocação no mercado farmacêutico no mundo com 661 empresas trabalhando com importação, produção e fracionamento dos insumos de medicamentos.

O Controle de insumos importados exige maior atenção por parte dos órgãos fiscalizadores. Apesar de o Brasil importar cerca de 90% dos insumos consumidos internamente os fornecedores internacionais não são fiscalizados regularmente assim como estabelece as normas Brasileiras de boa pratica de fabricação (Said, 2006).

O Brasil iniciou em 2002 os primeiros passos para autossuficiência na produção de substâncias química de referência, com o apoio do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS), da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) e o Laboratório de Produção de Padrões Secundários da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Segundo uma reportagem publicada no ano de 2016 pela ABIFINA - Associação Brasileira de Indústrias de Química Fina, biotecnologia e suas especialidades, em seu site oficial, relata que a fundação Oswaldo cruz (Fiocruz) em parceria com a Universidade Federal do Rio de Janeiro cria o centro de referencia nacional farmoquímica com o objetivo de desenvolver insumos farmacêuticos ativos (IFAs), a fim de contribuir para o avanço do setor no Brasil (ABIFINA, 2016).

De acordo com dados da Associação Brasileira da Indústria Farmoquímica e de Insumos Farmacêuticos (ABIQUIF), as exportações brasileiras da cadeia produtiva farmoquímica está crescendo comparado aos anos anteriores. Dados da Secretaria de Comércio Exterior (SECEX) mostram que as exportações brasileiras aumentaram em 8,6% entre os anos de 2016 e 2017 (US\$ 1.758 milhões em 2017, contra US\$

1.619 milhões em 2016), por outro lado as indústrias do setor de medicamentos exportaram US\$ 1.006 milhões em 2017, contra US\$ 952 milhões em 2016 (crescimento de 5,6%) (Figura 8). Para farmoquímicos e adjuvantes farmacotécnicos, as exportações foram US\$ 752,5 milhões em 2017, contra US\$ 667 milhões em 2016 (crescimento de 12,8%).

Esse crescimento de 140 milhões nas exportações, segundo ABIQUIF, é um reflexo positivo do projeto setorial integrado denominado *Brazilian Pharm Solution* que tem o apoio do governo (APEX-Brasil) juntamente com o setor produtivo e agências de fomento visando à adequação regulatória a nível internacional a fim de facilitar a inserção das empresas brasileiras na disputa global dos exportadores de tecnologia e *know-how* farmacêutico (ABIQUIF, 2017).

Tabela 3. Exportações da cadeia produtiva Brasileira - Medicamentos e Insumos

Exportações	Milhões		Crescimento
	2016	2017	
Medicamentos	952	1006	5,70%
Farmoquímicos	667	752,5	12,80%
Total	1619	1758,5	8,60%

Fonte: Adaptado de <https://abiquifi.org.br/mercado/>

1.8. Extração de Compostos fenólicos

Existem atualmente varias técnicas de extração de compostos fenólicos. Para a realização deste projeto foram utilizados cinco métodos de extração, com o objetivo de abordar técnicas simples e viáveis economicamente e compará-las com técnicas já estabelecidas e consideradas métodos convencionais, porém, de alto custo de implantação. Foram considerados três tratamentos para extração de compostos utilizando água como solvente: Tratamento trituração água, utilizando um método simples de trituração em água e repouso com resfriamento, tratamento Hidrotérmico, utilizando banho maria com aquecimento em temperatura controlada a 65 °C e o tratamento prensagem a frio, utilizando uma prensa confeccionada sob medida para esta finalidade e repouso com resfriamento. Foram considerados também dois tratamentos para extração de compostos fenólicos utilizando etanol como solvente: Tratamento trituração etanol, utilizando uma solução hidroetanólica 70%, trituração e repouso com resfriamento e o tratamento alcoólico utilizando equipamento chamado

extrator tipo soxhlet. Considerado um método convencional, suas condições já estão bem estabelecidas em publicações científicas demonstrando a viabilidade deste método, porém, alto custo de investimento devido a utilização de equipamentos como condensadores e utilização de aquecimento em torno de 70 °C.

Para extração os solventes mais utilizados são aqueles que evaporam em temperaturas baixas, que possuam ponto de ebulição baixo e que não sejam tóxicos, justificando assim a utilização de água e etanol como solventes. Entre os diversos métodos de extração aplicados e estudados atualmente, temos alguns que se destacam, seja pela sua simplicidade na aplicação como no caso da utilização de água como solvente, ou pela sua eficiência já estabelecida em publicações científicas, como no caso da utilização do extrator de soxhlet. Entre os métodos utilizados podemos destacar:

Extração de compostos (sólido-líquido)

Este método de extração baseia-se no contato da fase sólida com a fase líquida para que o soluto se difunda da fase sólida para a líquida, permitindo a separação dos componentes originais do sólido. Este processo é também conhecido como lixiviação líquido-sólido (Escobar, 2010).

Extração por lixiviação utilizando solvente

Este processo consiste na ação de um solvente onde o solvente é transferido do volume de solução para a superfície do sólido penetrando e difundindo o sólido, dissolvendo assim o soluto no solvente para a superfície da partícula (Escobar, 2010).

Extração Hidroetanólica

Este processo consiste na utilização de diferentes soluções alcoólicas (Etanol ou Metanol) com adição de diferentes proporções de água destilada, onde estas soluções são colocadas em contato com o sólido, trituradas e mantidas em diferentes temperaturas e tempos de reação, em seguida são filtradas para obtenção de uma solução líquida. Desta forma é possível avaliar a eficiência da extração utilizando solventes em diferentes proporções (Spagolla *et al.*, 2009).

Extração utilizando lixiviação e prensagem

Consiste no preparo de uma solução de água e hidróxido de sódio (para manter o pH) adicionado o resíduo e mantido em repouso para que ocorra a liberação das partículas dos sólidos. Em seguida é realizada a extração através de processo hidráulico ou mecânico de prensagem deste soluto para a recuperação de compostos que ainda se encontram no sólido (EL-NAWAWI, 1995).

Extração convencional utilizando água quente

Consiste no preparo de uma solução de sólido e líquido, onde esta ficará por determinado tempo e temperatura em banho maria para que através do aquecimento ocorra a liberação dos compostos. Em seguida é realizada a filtração e armazenamento do líquido para análises (CHEIGH; CHUNG; CHUNG, 2012)

Extração convencional utilizando extrator tipo soxhlet

Consiste no preparo de uma solução de sólido em uma proporção de etanol, esta mistura é triturada e filtrada, onde a porção do sólido é secada em estufa e colocada em um cartucho de papel filtro para extração e o líquido filtrado é colocado num balão extrator. O período de reação é de 3 horas (DAVIS, 1966).

1.9. Biotransformação de substâncias por enzimas

A biotransformação é um processo em que as substâncias contidas no composto passa por reações químicas que no caso deste projeto são mediadas por enzimas que realizam a conversão em um composto diferente do composto original podendo realizar modificações neste composto. Uma das vantagens da utilização de biotransformação através de reações enzimáticas é a não geração de rejeitos industriais tóxicos e as reações são específicas. Entre as desvantagens está a perda da atividade enzimática com o tempo, custos mais altos envolvendo o processo de cultivo de microrganismos. Entretanto, existem vantagens na eficiência do processo aplicado para indústrias químicas farmacêuticas, que vêm desenvolvendo processos para a obtenção destes compostos bioativos. Para obtenção da reação a substância que se quer modificar é colocada em contato com a enzima por um determinado tempo e analisada por cromatografia. Com a obtenção de bons resultados as

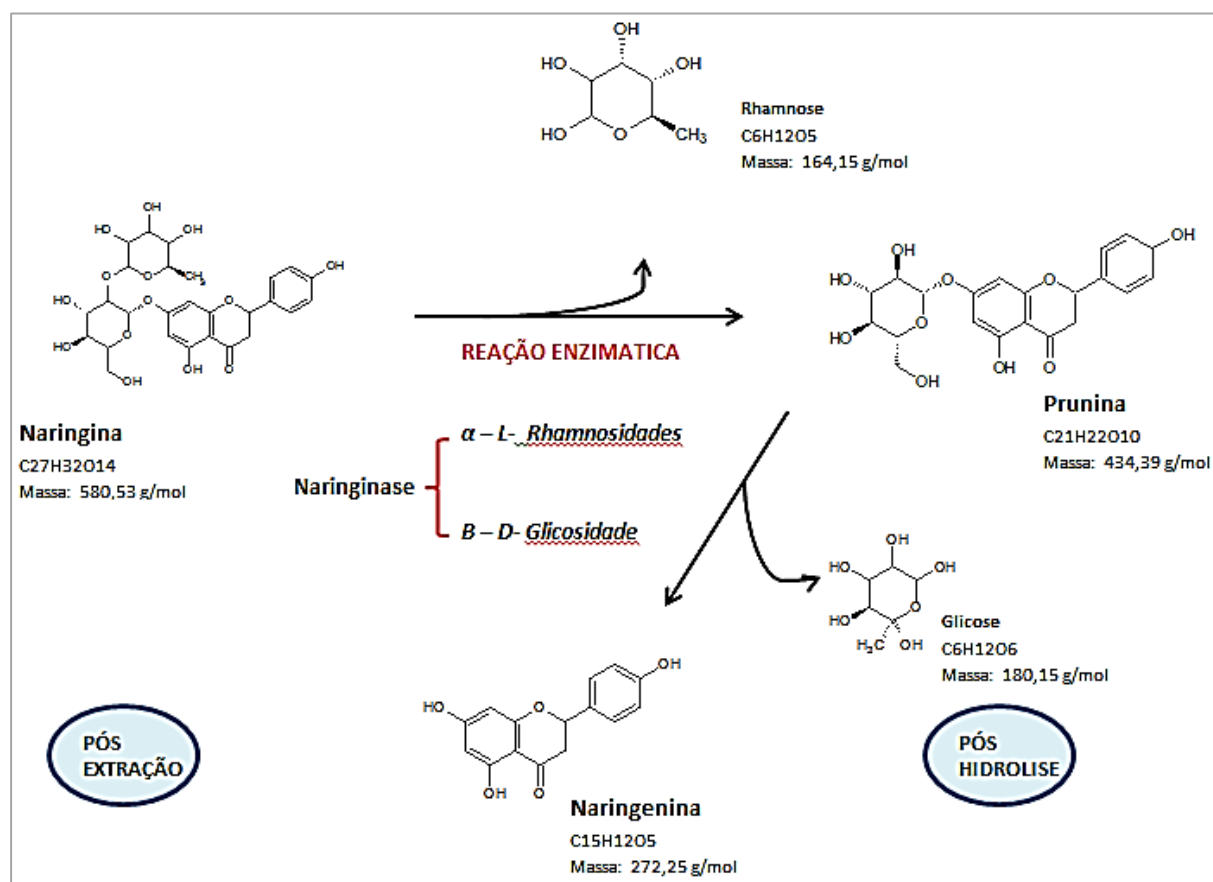
condições podem ser otimizadas para um aumento do rendimento visando uma produção comercial (OLIVEIRA; OLIVEIRA, 2012).

1.9.1. Enzima Naringinase

As enzimas são consideradas catalizadores biológicos de natureza proteica que atribuem um papel fundamental que é o controle metabólico. Nas indústrias as enzimas tem sido utilizadas devido suas características específicas. A naringinase é uma enzima que pode ser produzida a partir do fungo *Aspergillus Ninger*, é considerado um complexo enzimático constituído em rhamnosidase e glicosidase (Habelt e Pittner, 1983). Esta enzima pode realizar a degradação ou modificação no flavonoide naringina e hesperidina através de uma reação enzimática, realizando a separação dos açúcares (Ramnose e glicose).

Utilizando a enzima podemos realizar a catálise enzimática para acelerar o processo de reação química em uma determinada molécula utilizando um substrato (naringina). O mecanismo de reação da catalise enzimática se dá através da reação química realizada na molécula do substrato onde a enzima atua como catalisador para acelerar a reação e assim obter os produtos que serão os compostos formados após a reação, neste caso serão os compostos naringenina e hesperetina. Na figura 10 estão representadas as reações catalisadas pela enzima naringinase®.

Figura 8. Reação e transformação por meio da Hidrólise da naringina pela enzima naringinase



Fonte: Próprio Autor

Como pudemos observar na Figura 10, a naringinase é capaz de converter a naringina em prunina e/ou naringenina, sendo este último, um potente sequestrador de radicais livres que pode contribuir para redução do dano oxidativo ao DNA. Além disso, a rhamnose pode ser usada como precursor para a produção industrial de compostos aromáticos, bem em síntese química como indutor de expressão de proteínas recombinantes (PURI *et al.*, 2011).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Avaliar a eficiência dos métodos para a extração de flavanonas de resíduos do processamento da laranja e modificar enzimaticamente a naringina e hesperidina considerando o maior do potencial antioxidante de seus produtos.

2.2. Objetivos Específicos

- Avaliar a eficiência da extração de flavonoides por método hidrotérmico, alcoólico, trituração etanol (hidroetanólico), trituração com água, prensagem;
- Identificar e quantificar por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) os flavonoides obtidos por meio da melhor extração;
- Realizar a modificação enzimática da naringina e hesperidina;
- Identificar e quantificar por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) o perfil dos flavonoides obtidos a partir da modificação enzimática;
- Avaliar a atividade antioxidante dos flavonoides antes e após a ação enzimática.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material

Os resíduos da indústria cítrica foram doados pela empresa **Jhon Bean Technologies** - JBT (Araraquara-SP). A variedade de laranja processada foi a Pera Rio meia estação precoce (safra de 2018). A colheita foi realizada em junho de 2018 em pomar não irrigado localizado na cidade de Avaré, região Sudoeste do Estado de São Paulo. Os resíduos recolhidos foram: bagaço (*core*), “*frit*” e a casca. Também foi utilizado para os testes preliminares, resíduo da variedade de laranja Pera Rio, referente à safra de 2016/2017 que foram mantidos congelados em *freezer* horizontal (-18°C) até o momento das análises. O trabalho foi realizado no Laboratório de Enzimologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara - UNESP. A utilização dos resíduos gerados pela extratora de copos modelo JBT (Figura 11) contribui significativamente para que as amostras colhidas fossem similares aos resíduos gerados pela indústria cítrica (figura 12).

Figura 9. Extratoras: Centro de Tecnologia de Pesquisa para Processamento de Frutas e Vegetais Jhon Bean Technologies (JBT).

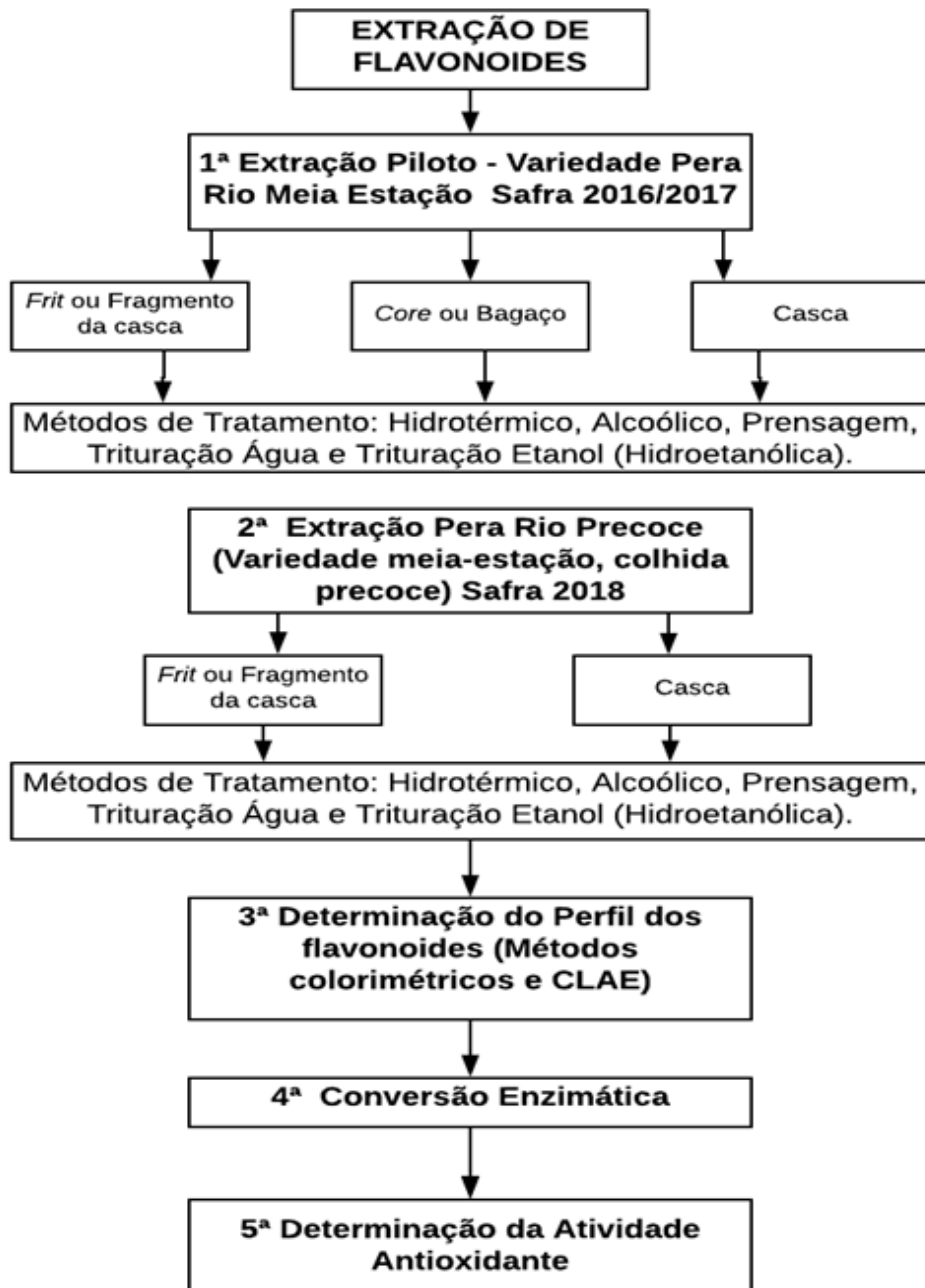


Fonte: <https://www.jbtc.com/foodtech/innovation/research-and-technology-centers/brazil-araraquara>
Acesso em 26/09/2018.

Figura 10. Amostras dos resíduos gerados pela extratora de copos modelo JBT e utilizadas no projeto.



3.2. FLUXOGRAMA EXPERIMENTAL

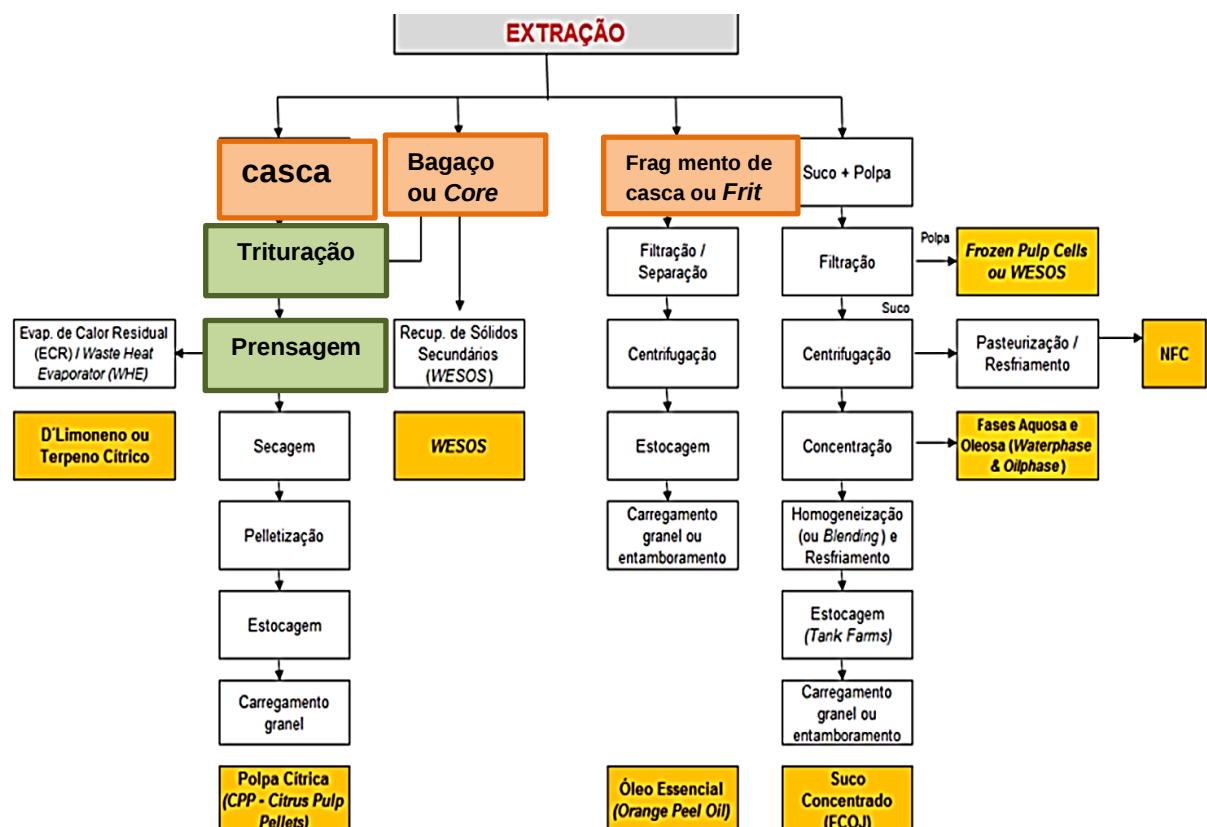


3.3. Métodos de extração dos flavonoides

Para a extração dos flavonoides foram selecionados cinco métodos, o hidrotérmico, alcoólico, prensagem a frio, trituração em água e trituração em etanol 70 % (hidroetanólica), nos quais foram definidas algumas variáveis como: temperatura, tempo de extração e viabilidade para aplicação do método em indústrias de citros. Considerando o procedimento já aplicado na indústria, é possível observar na Figura 13 que o método de trituração e prensagem já é executado para obtenção do D'limoneno ou terpeno cítrico por meio da utilização do resíduo casca.

Os extratos obtidos por meio dos métodos de extração avaliados neste estudo foram analisados de acordo com seu conteúdo de açúcares redutores (MILLER, 1959), fenólicos totais (TURKMEN; SARI; VELIOGLU, 2006), flavanonas totais (DAVIS, 1947) e cromatográfica líquida de alta eficiência CLAE.

Figura 11. Fluxograma genérico de processamento de citros.



Fonte: Adaptado de (Kharfan, 2011).

No quadro 4 estão descritos os métodos de extração realizados neste estudo.

Quadro 4. Diferentes métodos aplicados para a extração de flavonoides

Tratamento	Condições	Preparo
Resfriamento	TRITURAÇÃO ÁGUA 1:10 (m/v) Solvente: Água Liquidificador Convencional	15g do resíduo úmido foi misturado em 150mL de água e triturado por 1 minuto. A mistura foi mantida em repouso por 24h a 3°C. Após este período a mistura foi filtrada com vácuo. Método é baseado (El-Nawawi, 1995; Escobar, 2010).
	TRITURAÇÃO HIDRO ETANOLICA 1:10 (m/v) Solvente: Etanol 70% Liquidificador Convencional	15g do resíduo úmido foi misturado em 150 mL de etanol 70% e triturado por 1 minuto. A mistura foi mantida em repouso por 24h a 3°C. Após este período a mistura foi filtrada com vácuo. Método adaptado de SPAGOLLA e et al. (2009).
	PRENSAGEM 1:10 (m/v) Solvente: Água Prensa Mecânica Confeccionada	30g do resíduo úmido foi misturado em 300 mL de água e mantido em repouso por 24h a 3°C. Após este período a mistura foi prensada e a fração líquida foi centrifugada e armazenada para futuras análises. Método adaptado de Nawawi (El-Nawawi, 1995).
Aquecimento	HIDROTÉRMICO 1:10 (m/v) Solvente: Água Banho Maria	10g do resíduo úmido foi misturado em 100mL de água e triturado por 1 minuto. A mistura obtida foi transferida para um erlenmeyer e aquecida. Após este período o extrato foi resfriado por 20min e filtrado com vácuo. Método adaptado de CHEIGH e et. al (2012).
	ALCOÓLICO 1:10 (m/v) Solvente: Etanol Extrator Soxhlet	25g do resíduo úmido foi misturado em 250mL de Etanol e triturado por 1 minuto e a mistura foi filtrada com vácuo. A fração líquida foi transferida para balão de extração. A fração sólida foi seca em estufa a 50°C /3horas. O resíduo seco foi transferido para cartuchos de papel que foram acoplados ao extrator de Soxhlet. Método adaptado de Davis (Davis, 1966)

Fonte: Próprio autor.

3.4. Determinação dos flavonoides

A eficiência dos métodos de extração foi determinada usando os métodos analíticos descritos nos itens 3.4.1 a 3.4.4. Todas as curvas analíticas foram realizadas em triplicada seguindo a Lei de Lambert-Beer.

3.4.1. Determinação dos compostos fenólicos totais pelo método de *Folin-Ciocalteu*

A concentração de compostos fenólicos totais foi determinada pelo método de *Folin-Ciocalteu*, para o qual foi confeccionada uma curva analítica utilizando ácido gálico como padrão externo (ANEXO 1). Os compostos fenólicos totais foram determinados a partir da equação de regressão da reta e expressos em equivalentes de ácido gálico por grama de amostra (Turkmen, Sari e Velioglu, 2006). A adaptação desse método consistiu na mistura de 0,5 mL de extrato do resíduo, 0,5 mL do reagente de *Folin Ciocalteu* (diluído 1:3; v:v), 1 mL de carbonato de sódio a 35% e por último foi adicionado 1 mL de água para completar um volume final de 3mL. A mistura foi mantida na ausência de luz por 30 minutos. O método foi realizado em triplicata e após este período foi realizada a leitura a $\lambda = 700$ nm em espectrofotômetro.

3.4.2. Determinação de flavanonas pelo método de Davis

As flavanonas foram quantificadas pelo método de Davis (DAVIS, 1947) utilizando uma solução padrão de naringina. Para o procedimento foram utilizados 2 mL de dietilenoglicol 90%, 0,40 uL do extrato do resíduo, 0,40 uL de NaOH 4N. O método foi realizado em triplicata e a leitura foi realizada a 420 nm em espectrofotômetro após 5 minutos de reação. Para efeito de cálculo foi construída a curva analítica utilizando como padrão a naringina (Anexo 1).

3.4.3. Determinação de açúcares redutores totais

A concentração de açúcares redutores foi determinada de acordo com o método de Miller (MILLER, 1959), que consiste em uma reação colorimétrica de oxirredução do 3,5-ácido dinitrossalicílico (DNS) na presença de açúcares redutores. O ácido dinitrossalicílico é reduzido pelo açúcar redutor em meio alcalino a ácido 3-amino-5-nitrossalicílico e ácido aldônico. A curva analítica foi construída utilizando glicose como padrão (Anexo 1). A leitura foi realizada a 540 nm e os ensaios conduzidos em triplicata em experimentos independentes.

3.4.4. Determinação do perfil de flavonoides por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência- CLAE

A determinação do perfil de flavonoides foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência utilizando uma Coluna Hypersil Classic ODS C18 dimensões 250 mm x 4,0 mm, tamanho de partícula 5µm, (Thermo®) a 30°C. Foram injetados 20 µL

de cada amostra, aplicando-se um gradiente de 2 fases móveis, sendo Fase (A): água ultra purificada (H_2O) e Ácido Acético (CH_3COOH), e Fase (B): Acetonitrila. O método foi iniciado com 5% de B até atingir 60 % em 15 minutos, com as mesmas condições mantidas até 17 minutos. Posteriormente, retornou-se às condições iniciais de B no próximo minuto e manteve-se até a finalização em 20 minutos (Fluxo 0,8 mL/min. $\lambda=280nm$, $116kgf/m^2$). O método adaptado foi baseado em técnica descrita em literatura especializada (HUNLUN *et al.*, 2017). Para cada flavonoide de interesse foram construídas curvas-padrão e, de acordo com o método utilizado, foram descobertos os tempos de retenção de cada composto com leitura em 280nm (Anexo 1).

3.5. Biotransformação dos flavonoides: Hidrólise Enzimática das Flavanonas e atividade enzimática.

Os resíduos com maior liberação de flavanonas em métodos de extração para flavanonas foram utilizados para a modificação (biotransformação) enzimática da naringina e hesperidina. Para hidrólise foi utilizada a enzima naringinase[®], que trata-se de um complexo multi-enzimático, pois apresenta atividade de ramnosidase e de glicosidase.

Para a realização da atividade de naringinase foi utilizado naringina como substrato. A solução de naringina (5mg/mL) foi preparada em tampão citrato de sódio 50 mM; pH 4,5. O ensaio enzimático foi conduzido empregando 5mL de solução de naringina e 0,2mL de enzima Naringinase[®] diluída na proporção 1mg/mL. A mistura foi mantida á 50°C, onde alíquotas de 0,25mL foram retiradas nos tempos 0,15,30 e 45 minutos. A atividade enzimática foi determinada pelo método de Miller (MILLER, 1959) e foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μ mol de açúcar redutor por minuto nas condições de ensaio. Os ensaios foram realizados em duplicata e a leitura a 540nm. Para efeito de cálculo foi construída uma curva de calibração usando glicose como padrão (Anexo 1). Após a dosagem da atividade foram encontrados 2,08 U/mL de atividade enzimática.

3.5.1. Modificação enzimática das flavanonas naringina, narirutina e hesperidina.

Para o ensaio enzimático foi utilizada a enzima naringenase[®] em sua forma livre. O ensaio foi realizado usando 12 mL do extrato obtido nos tratamentos para extração de flavonoides, “trituração água”, “prensagem a frio” e “Alcoólico” para os resíduos casca e “*fri*”. Foi analisado o pH de cada amostra coletada do extrato, garantindo assim que todas as amostras ficassem em torno de 4,5. Em seguida, as amostras foram colocadas em banho maria já estabilizado a 50 °C com agitação a 120 rpm.

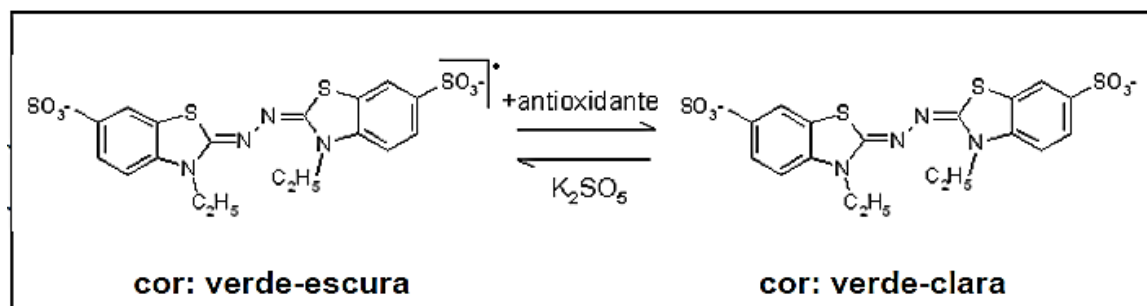
As amostras foram mantidas nessa condição durante 5min, em seguida foi adicionada a enzima naringinase e retiradas alíquotas nos tempos de reação de 1hora e 3horas. Estas alíquotas foram aquecidas por 3 min em ambos os tempos para inativação enzimática, em seguida foram filtradas em filtro 0.22 e reservadas para futuras análises por CLAE.

3.6. Atividade Antioxidante

A determinação da atividade antioxidante foi realizada antes e depois da modificação enzimática da naringina e hesperidina.

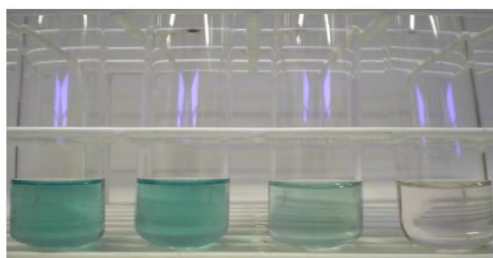
- **Método ABTS:** A determinação da atividade antioxidante foi realizada pelo método ABTS (Figura 16). A reação é baseada na captura do cátion radical ABTS⁺ (ácido [2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)]) por antioxidantes, produzindo a descoloração da cor verde-escura para verde-clara proporcional à concentração de espécies antioxidantes, acompanhada do decréscimo da absorbância (RUFINO *et al.*, 2007), conforme apresentado nas figuras 16 e 17.

Figura 12. Mecanismo de determinação de atividade antioxidante. Estabilização do radical ABTS•+ por um antioxidante e sua formação pelo persulfato de potássio.



Fonte: (Rufino *et al.*, 2007)

Figura 13. Reação da atividade antioxidante utilizando o método ABTS



Fonte: (Rufino *et al.*, 2007)

A curva analítica foi construída utilizando 300 uL de uma solução do radical ABTS (solução estoque de ABTS 7mM e + solução de persulfato de potássio 140 mM), e a solução padrão de Trolox (2000uM) (Anexo 1). Após 6 minutos de reação foi realizada a leitura da absorbância a 734nm. Os resultados foram expressos em *Trolox Equivalent Antioxidant Capacity* (TEAC) em uM (RUFINO *et al.*, 2007).

Para todos os cálculos foram realizadas análises estatísticas utilizando o software Minitab- *Untitled* versão 16. Os dados foram submetidos a análise de variância- ANOVA e para comparação entre as médias das triplicatas das concentrações utilizou-se o teste de tukey, onde as diferenças foram consideradas significantes estatisticamente quando $p > 0,05$.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

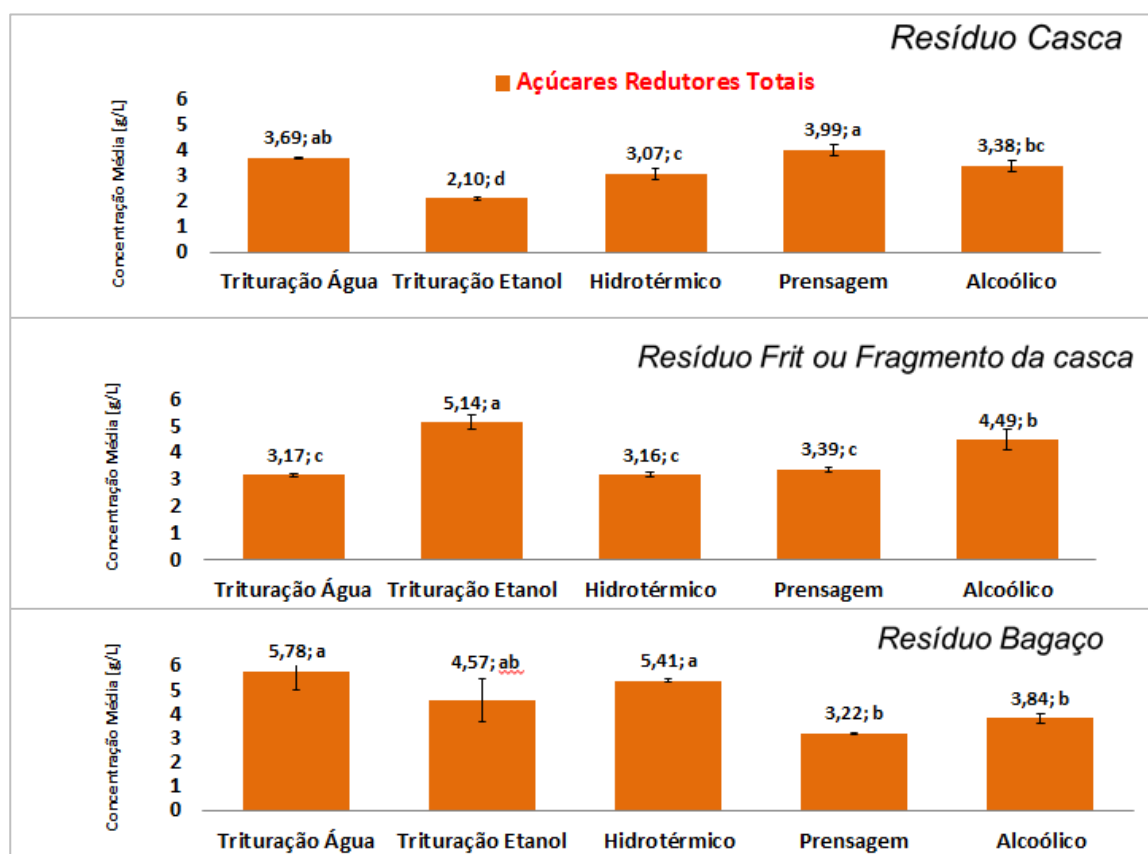
4.1. Extração de compostos fenólicos e caracterização dos extratos obtidos a partir dos resíduos cítricos da Variedade Pera Rio Meia Estação – Safra 2018

Para identificar o melhor método de extração para flavanonas, foram realizadas, inicialmente, análises colorimétricas para a determinação de açúcares redutores totais, compostos fenólicos e flavanonas totais.

4.1.1. Determinação de açúcares redutores totais para os resíduos casca, *frit* e bagaço.

Na figura 16, são mostrados os resultados obtidos em termos de açúcares redutores totais (DNS), os resultados foram submetidos ao teste de Tukey ($P>0,05$). As médias que não compartilham a mesma letra são significativamente diferentes.

Figura 14. Perfil colorimétrico para açúcares totais redutores (DNS)



Os resultados mostrados na figura 16 para o resíduo casca indicam que os tratamentos trituração água e prensagem a frio proporcionaram maiores rendimentos e não apresentaram diferença significativa entre eles (tratamentos), em ambos os tratamentos foi utilizado água como solvente e não houve aquecimento o que pode ter contribuído para que açúcares totais não apresentassem uma possível oxidação de açúcares e assim apresentando maiores níveis de concentração, em torno de 50% maiores comparado ao tratamento trituração etanol utilizando etanol como solvente.

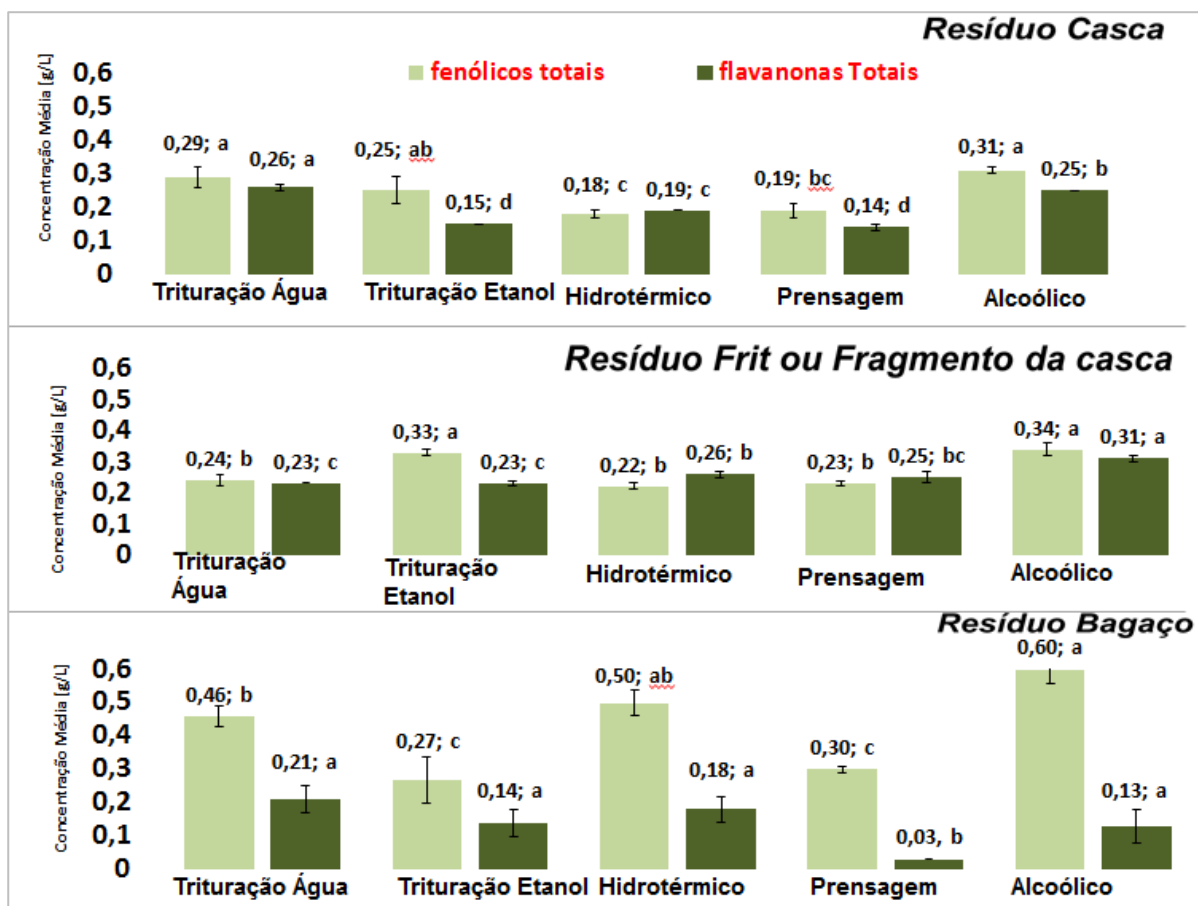
Para os rendimentos em termos açúcares redutores totais (DNS) para o resíduo “*frit*”. Pôde-se observar que diferentemente do comportamento do resíduo casca, que mostrou maiores rendimentos para os tratamentos trituração com água, no “*frit*” o tratamento trituração etanol (Hidroetanólica) foi o que apresentou maior rendimento, em torno de 40% maior comparado ao rendimento do tratamento trituração água. Essa diferença de comportamento pode estar relacionada a estrutura da matéria prima utilizada para cada resíduo. Apesar do resíduo casca apresentar estruturas mais homogêneas em pedaços maiores, possibilitando assim uma maior superfície de contato entre o resíduo e o solvente. O resíduo “*frit*” apresenta uma estrutura com fragmentos de casca contendo pedaços menores como um “farelo” e mais heterogêneos, porém, para uma eficiência da extração a estrutura do tecido deste resíduo pode influenciar melhorando a passagem do líquido entre as partículas do material. Esses pequenos fragmentos podem ter contribuído para um melhor desempenho no processo de extração. (CARDOSO, 2017).

Para os rendimentos em termos de açúcares redutores totais (DNS) para o resíduo bagaço, observa-se que os tratamentos trituração água, trituração etanol e hidrotérmico não apresentaram diferença significativa entre eles, obtendo os melhores rendimentos.

4.1.2. Determinação de fenólicos totais para os resíduos casca, *frit* e bagaço.

Na figura 17, são mostrados os resultados obtidos em termos de fenólicos totais os resultados foram submetidos ao teste de Tukey ($P > 0,05$). As médias que não compartilham a mesma letra são significativamente diferentes.

Figura 15. Perfil colorimétrico de fenólicos totais e flavanonas totais. *Análise dos resultados dos fenólicos totais.*



Para os rendimentos em termos de fenólicos totais para o resíduo casca, aponta que o tratamento alcoólico, trituração etanol e a trituração água não apresentaram diferença significativa obtendo os maiores rendimentos.

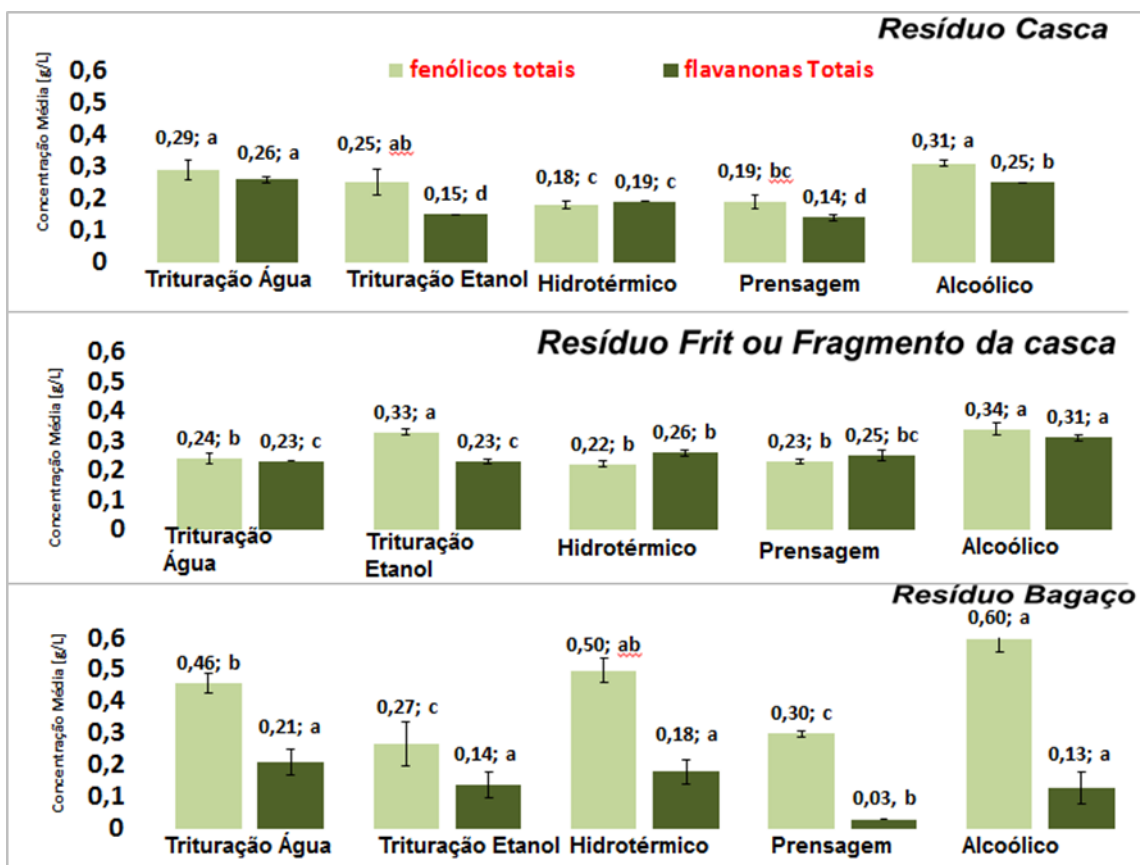
Para os rendimentos em termos de fenólicos totais considerando o resíduo “frit” os tratamentos que apresentaram maiores rendimentos foram o alcoólico seguido do tratamento etanol (hidroetanólica) não apresentando diferença significativa entre eles. Ambos os tratamentos utilizaram etanol como solvente, porém em concentrações diferentes, o tratamento alcoólico foi utilizado etanol Pa em solução 100% e o tratamento etanol utilizado uma solução etanol Pa 70% (hidroetanólica). Esses tratamentos com maiores rendimentos apresentaram rendimentos em torno de 35% maiores comparado ao tratamento trituração água.

Para os rendimentos em termos de fenólicos totais considerando o resíduo bagaço, os tratamentos que apresentaram os maiores rendimentos foram o alcoólico seguido do tratamento hidrotérmico, onde não apresentaram diferença significativa.

4.1.3. Determinação de flavanonas totais para os resíduos casca, *frit* e bagaço.

Na figura 17, são mostrados os resultados obtidos em termos de flavanonas totais os resultados foram submetidos ao teste de Tukey ($P>0,05$). As médias que não compartilham a mesma letra são significativamente diferentes.

Figura 16. Perfil colorimétrico de fenólicos totais e flavanonas totais. *Análise dos resultados das flavanonas totais.*

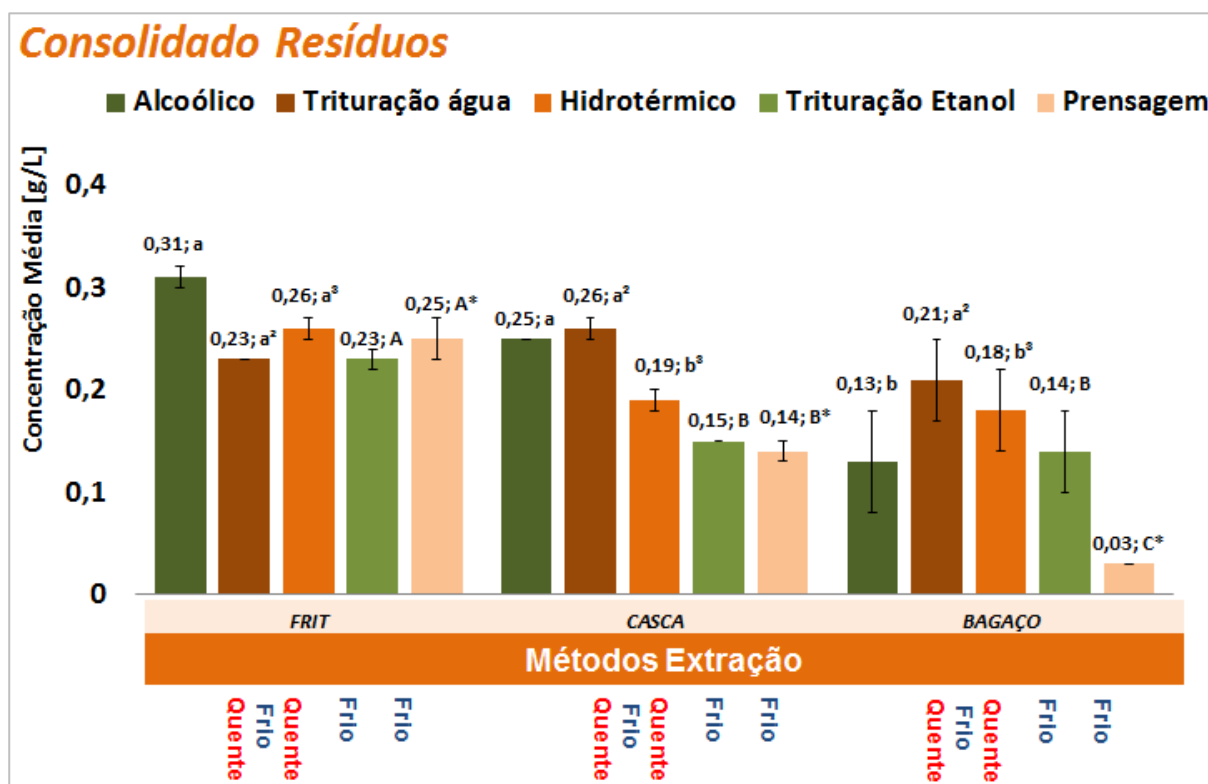


Em relação aos resultados obtidos em termos de flavanonas totais para o resíduo casca, o tratamento trituração água apresentou os maiores rendimentos. O segundo melhor tratamento apresentado foi o tratamento alcoólico, porem, é um método de extração que utiliza um extrator tipo soxhlet para a extração dos fenólicos (como foi utilizado neste trabalho), é um método bem estabelecido em publicações científicas, porém, exige um maior investimento em equipamentos para implantação em escala industrial. Já o tratamento trituração com água foi o mais eficiente comparado aos demais tratamentos, sendo um método mais viável economicamente por utilizar água como solvente que já faz parte de procedimentos utilizado nas indústrias.

Para os rendimentos em termos de flavanonas totais considerando o resíduo “*frit*”, o tratamento alcoólico se destacou por apresentar os maiores rendimentos, contudo, seria um método com maior necessidade de investimentos para que a indústria pudesse realizá-lo.

Para os rendimentos em termos de flavanonas totais considerando o resíduo bagaço, os tratamentos trituração água, trituração etanol, hidrotérmico e alcoólico, não tiveram diferença significativa, porém, seus rendimentos foram menores que os apresentados pelos resíduos casca e “*frit*”.

Figura 17. Consolidado perfil colorimétrico Flavanonas totais



Na figura 19, apresenta os rendimentos considerando o consolidado dos resultados colorimétricos para flavanonas totais, ressaltando o comparativo entre os cinco métodos de extração e os respectivos rendimentos para cada resíduo.

Considerando os métodos de extração utilizados neste projeto é possível observar que o tratamento trituração água se destaca estatisticamente apresentando os maiores rendimentos em todos os resíduos com exceção da extração alcoólica empregada no “*frit*”. Entretanto, os valores não apresentaram diferença significativa entre os resíduos com tratamento com água.

Considerando os resíduos utilizados neste projeto, é possível, ainda, indicar que o “*frit*” foi o resíduo que apresentou o maior potencial para extração de flavanonas seguido pela casca e bagaço.

Para o tratamento alcoólico, não apresentou diferença significativa entre os resíduos “*frit*” e casca “*frit*”, apresentando rendimentos de 0,31 e 0,25 g/L respectivamente.

Para o tratamento trituração água, não apresentou diferença significativa entre os resíduos “*frit*”, casca e bagaço, apresentando os rendimentos 0,23, 0,26 e 0,21 g/L respectivamente.

Para o tratamento hidrotérmico, o resíduo “*frit*” apresentou um rendimento de 0,23 g/L, sendo o maior rendimento comparado aos demais resíduos.

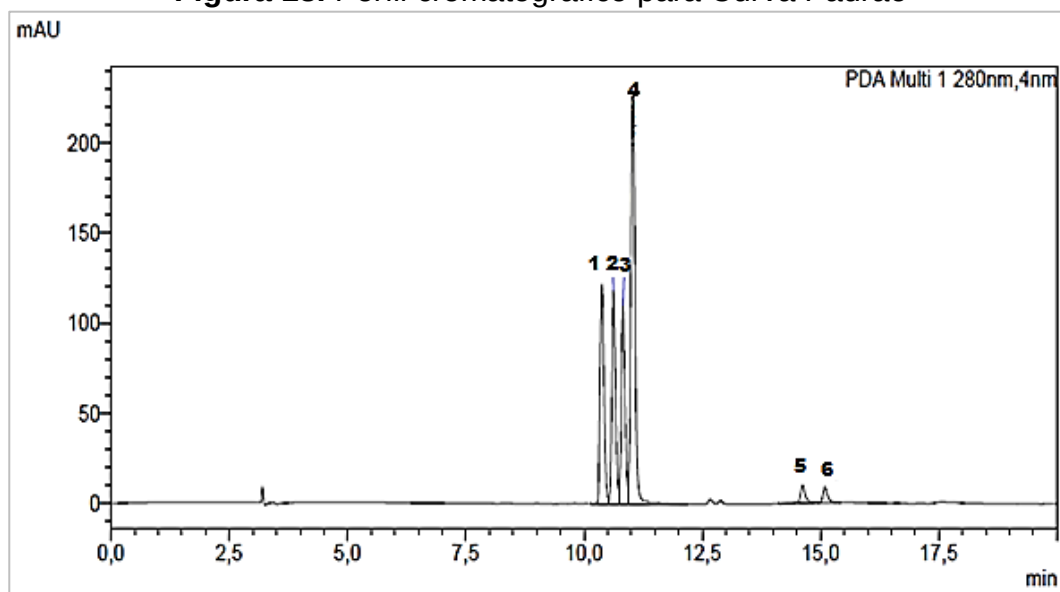
Para o tratamento trituração etanol, assim como o tratamento hidrotérmico o resíduo “*frit*” apresentou um rendimento de 0,26 g/L, sendo o maior rendimento comparado aos demais resíduos.

Para o tratamento prensagem a frio, assim como o tratamento hidrotérmico e o trituração etanol o resíduo “*frit*” apresentou um rendimento de 0,25 g/L, sendo o maior rendimento comparado aos demais resíduos.

Para o resíduo bagaço, os rendimentos foram menores comparados aos rendimentos do resíduo “*frit*” e casca. Esta diferença pode estar relacionada com a estrutura química dos resíduos, que para o bagaço é composta de uma quantidade menor de albedo e flavedo (parte da laranja onde é encontrado maiores concentrações de flavonoides).

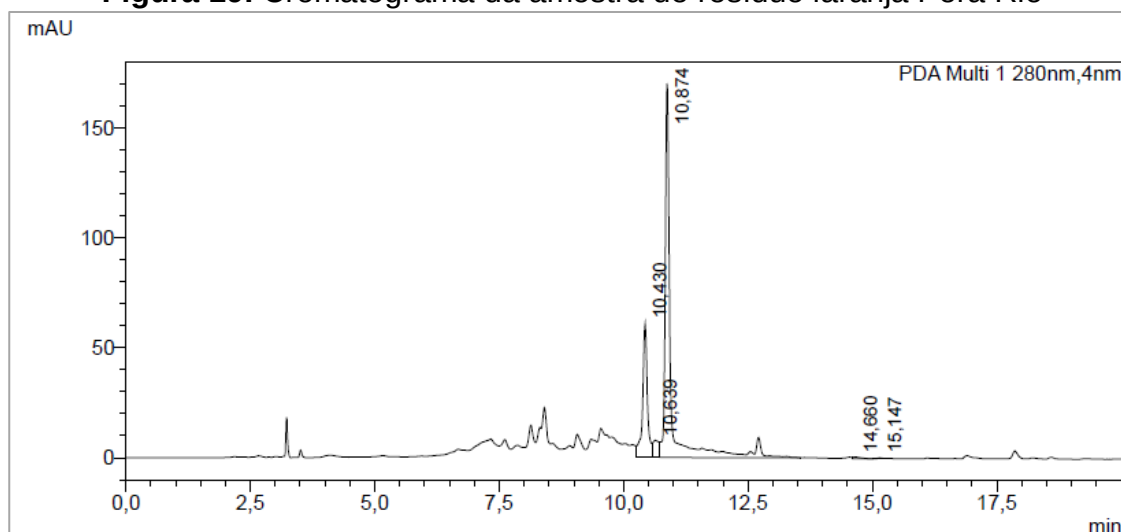
4.2. Determinação da concentração de flavanonas glicosiladas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) - Seleção dos resíduos

Considerando o rendimento de todos os resíduos e o menor desempenho do bagaço de laranja na liberação de compostos de interesse, foram selecionados apenas os resíduos “*frit*” e casca para a realização da caracterização do perfil cromatográfico e modificação enzimática. Para a elaboração da curva padrão foram considerados os compostos padrão conforme perfil cromatográfico apresentado na figura 20. Na figura 21 é apresentado um dos cromatogramas obtidos utilizando o resíduo da laranja Pera Rio.

Figura 18. Perfil cromatográfico para Curva Padrão

1:Narirutina;2:Naringina;3:Hesperidina;4:Prunina;5:Naringenina;6:Hesperetina.

Fonte: Proprio autor

Figura 19. Cromatograma da amostra de resíduo laranja Pera Rio

10,4:Narirutina;10,6:Naringina;10,8:Hesperidina;14,6:Naringenina;15,1:Hesperetina.

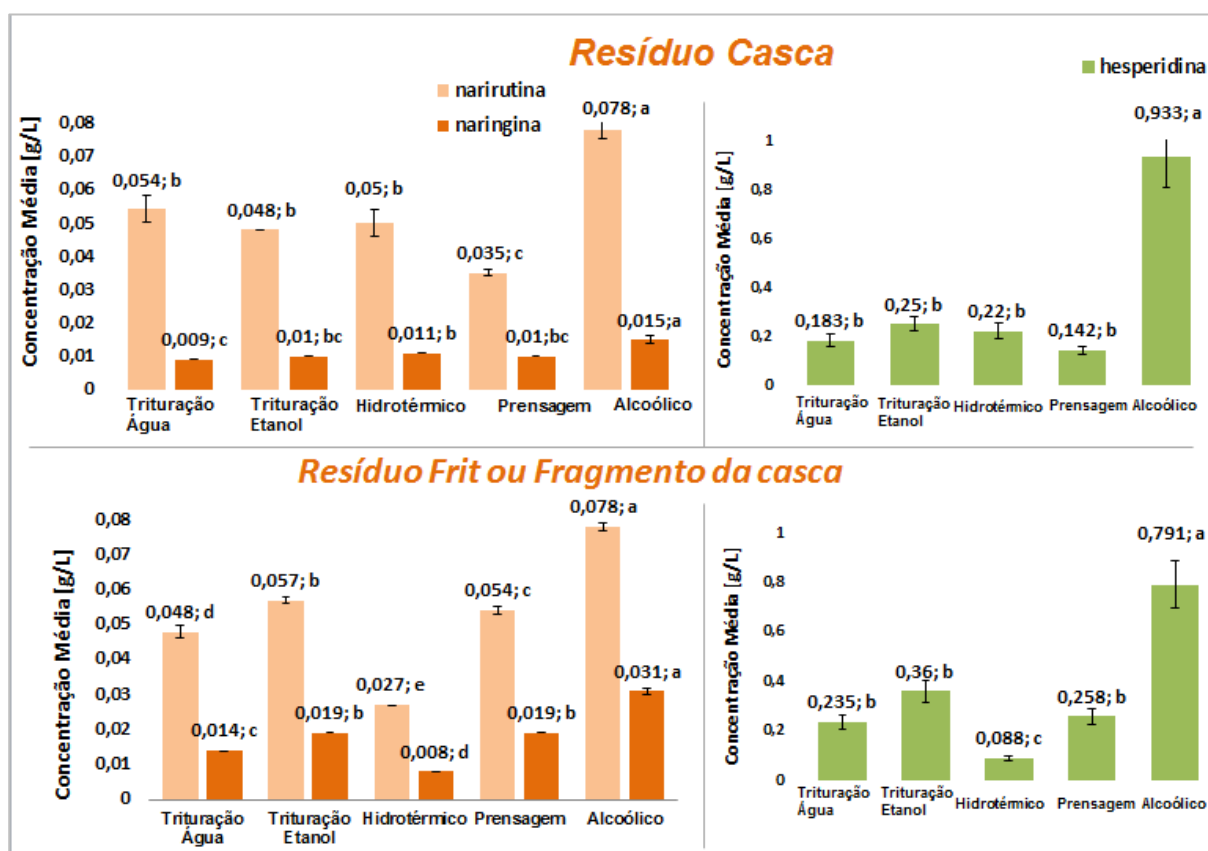
Fonte: Proprio autor

4.2.1. Determinação da concentração de flavanonas glicosiladas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) Pré da hidrólise.

Foram considerados para análise por CLAE os extratos obtidos a partir dos resíduos casca e “frit”, que apresentaram maiores rendimentos, conforme mostrado na Tabela 6. As análises foram realizadas em triplicata e os resultados são apresentados de acordo com o tratamento estatístico proporcionado pelo teste de

Tukey ($P>0,05$). De acordo com os resultados apresentados na figura 22, é possível observar o comportamento das substâncias antes da hidrólise enzimática onde constam as concentrações em (g/L) dos compostos glicosilados. Estes rendimentos se referem às concentrações antes da hidrólise enzimática, estágio no qual é possível observar que as maiores concentrações são do composto hesperidina obtido por meio de tratamento alcoólico tanto para o resíduo casca quanto para o “frit”.

Figura 20. Teores de flavanonas glicosiladas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Pré- hidrólise.



Considerando os resultados apresentados na figura 22 para o resíduo casca, observa-se que o tratamento alcoólico apresentou maiores rendimentos para todos os compostos glicosilados (naringina, hesperidina e naringina). A eficiência no método de extração alcoólico utilizando o soxhlet e etanol como solvente pode estar relacionada ao fato do etanol ser uma molécula anfifílica e extrair tanto substâncias com caráter apolar quanto polar, apresentando desempenho parecido com outros estudos científicos. Considerando que o método utilizando Soxhlet foi realizado até a exaustão completa do material e com tempo de 3 horas (OLIVEIRA *et al.*, 2016).

Para a extração de narirutina, o alcoólico apresentou o maior rendimento, 0,078 g/L. Os rendimentos para os tratamentos trituração com água, trituração etanol e hidrotérmico não apresentaram diferença significativa, apresentando o segundo melhor desempenho.

Para a extração de naringina, o alcoólico apresentou o maior rendimento, 0,015 g/L. Os rendimentos para os tratamentos trituração etanol (hidroetanólica), hidrotérmico e prensagem não apresentaram diferença significativa.

Para a obtenção de hesperidina, o alcoólico apresentou o maior rendimento, 0,933 g/L. Os rendimentos para os tratamentos trituração com água, trituração etanol (hidroetanólica), hidrotérmico e prensagem não apresentaram diferença significativa.

Considerando os resultados apresentados na figura 22 para o resíduo “*frit*”, observa-se que o tratamento alcoólico proporcionou maiores rendimentos para todos os compostos glicosilados (para a narirutina 31% maior comparado ao tratamento trituração água, para a naringina 40% maior comparado ao tratamento trituração água e para a hesperidina 80% comparado ao tratamento trituração água).

Para a extração de narirutina o alcoólico apresentou o maior rendimento, 0,078 g/L, todos os outros tratamentos apresentaram diferença significativa entre eles.

Na extração de naringina, o alcoólico apresentou o maior rendimento, 0,031 g/L, o tratamento trituração etanol e prensagem a frio não apresentaram diferença significativa obtendo o segundo maior rendimento.

Para a liberação de hesperidina o alcoólico apresentou o maior rendimento, 0,791 g/L, os tratamentos trituração com água, trituração etanol (hidroetanólica) e prensagem não apresentaram diferença significativa.

4.3. Biotransformação de substâncias por enzimas: Hidrólise Enzimática.

A hidrólise enzimática foi conduzida com as substâncias narirutina, naringina e hesperidina para a obtenção dos produtos naringenina e prunina. Dessa maneira, foram estabelecidos o critério de maior rendimento na extração somado a maior concentração de narirutina e naringina, para a seleção dos tratamentos que seriam considerados na etapa da hidrólise enzimática. Consequentemente, foram selecionados os tratamentos: trituração com água, prensagem e alcoólico para os resíduos casca e “*frit*”.

Figura 21. Tratamentos selecionados para etapa de hidrólise enzimática



4.3.1. Concentração de flavanonas glicosiladas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) após hidrólise enzimática.

Nesta análise foram considerados os extratos obtidos a partir dos resíduos casca e “frit” que foram obtidos por meio de trituração água, prensagem e extração alcoólica. Os resultados foram analisados pelo teste estatístico ANOVA e teste de Tukey ($P > 0,05$), conforme mostrado na figura 24.

Figura 22. Teores de flavanonas glicosiladas narirutina, naringina e hesperidina após modificação pela naringinase nos tempos de 1 e 3 horas. *Resíduo casca*.

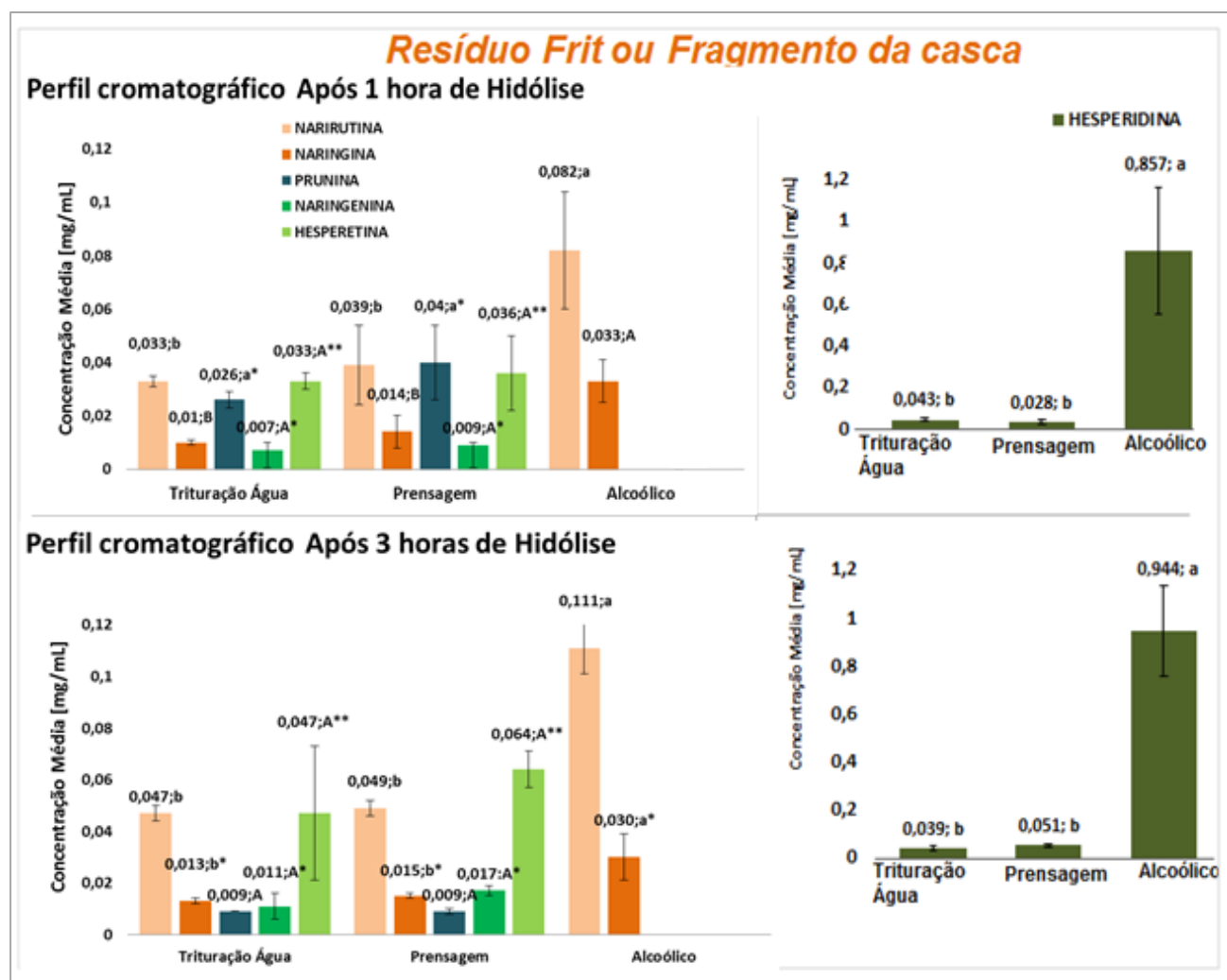


Considerando a figura 24, é possível observar as concentrações em (mg/mL) dos compostos após 1 hora de reação enzimática onde foi observado que para o resíduo casca a concentração do composto narirutina reduziu 65% comparado às concentrações pré-hidrólise, já o composto hesperidina mostrou uma redução apenas para os tratamentos trituração água (70% comparado aos rendimentos antes da hidrólise) e prensagem (80% comparado aos rendimentos antes da hidrólise).

Para os resultados da hidrólise enzimática no tempo de 3 Horas, percebeu-se que para o resíduo casca a reação apresentou um ligeiro aumento da concentração das substâncias Narirutina 17% e Naringina 31% para o tratamento trituração água, 5% e 60% respectivamente para o tratamento prensagem e para o tratamento alcoólico não houve alteração nos tempos de 1e 3 horas ou se manteve comparável aos valores obtidos com a reação de 1 hora.

Na figura 24, são apresentadas as concentrações obtidas para a prunina e agliconas. É possível observar que antes da hidrólise enzimática não havia concentrações quantificáveis para os compostos prunina, naringenina e hesperetina.

Figura 23. Teores de flavanonas glicosiladas narirutina, naringina e hesperidina após modificação pela naringinase nos tempos de 1 e 3 horas. Resíduo “Frit”.



Considerando a figura 25, o resultados apresentados para o resíduo “frit” a concentração do composto narirutina reduziu 35% comparado as concentrações pré hidrólise, o composto naringina reduziu 29% e a hesperidina 82% ambos comparado as concentrações de pré hidrólise, considerando o tratamento trituração água.

Este fenômeno de redução se dá devido a biotransformação que ocorre com a ação da atividade da enzima naringinase. No tratamento alcoólico para a extração do composto hesperidina, as concentrações se mantiveram comparáveis aos valores pré-hidrólise, sugerindo que o etanol possa ter atuado como um inibidor enzimático,

pois o etanol pode alterar a expressão ou atividade de algumas enzimas utilizadas na biotransformação (WANNMACHER, 2007).

Para o resíduo “*frit*”, considerando o tratamento trituração água, para o tempo de 3 horas apresentou um aumento de 30% para o composto narirutina comparado ao tempo de 1 hora.

Para a naringina no tempo de 3 horas houve uma redução de 23% comparado ao tempo de 1 hora. Para a hesperidina no tempo de 3 horas houve uma redução de 9% comparado ao tempo de 1 hora.

Para o tratamento prensagem o composto narirutina apresentou no tempo de 3 horas um aumento de 20% comparado ao tempo de 1 hora, a naringina apresentou um aumento de 7% no tempo de 3 horas comparado com o tempo de 1 hora e a hesperidina apresentou no tempo de 3 horas um aumento de 45% comparado ao tempo de 1 hora.

Para o tratamento alcoólico a narirutina apresentou no tempo de 3 horas um aumento de 26% comparado ao tempo de 1 hora, para o composto hesperidina no tempo de 3 horas apresentou um aumento de 9% comparado ao tempo de 1 hora, e para a naringina houve uma redução de 9%, comparado ao tempo de 1 hora.

Após 1 hora de hidrólise, notou-se concentrações quantificáveis para cada composto, indicando a eficácia da reação enzimática. Para a obtenção do composto prunina, os maiores rendimentos foram alcançados no tratamento trituração água do resíduo casca e prensagem do resíduo “*frit*”.

Para a obtenção do composto naringenina o tratamento trituração com água e prensagem não apresentaram diferença significativa nos resíduos casca e “*frit*”. No caso da hesperitina, o tratamento trituração com água apresentou o maior rendimento para o resíduo casca.

Após 3 horas de hidrólise, foi possível constatar uma pequena alteração nas concentrações. Para a prunina as concentrações diminuíram comparada ao tempo de 1 hora (resíduo casca e “*frit*”), o que está relacionado a hidrólise completa da naringina após a perda da ramnose e da glicose formando a naringenina. A naringenina mostrou um aumento de concentração principalmente com o tratamento trituração com água para o resíduo casca e prensagem para o resíduo “*frit*”. No caso do composto hesperetina houve um aumento em sua concentração, principalmente, no tratamento trituração com água para casca e prensagem para o “*frit*”.

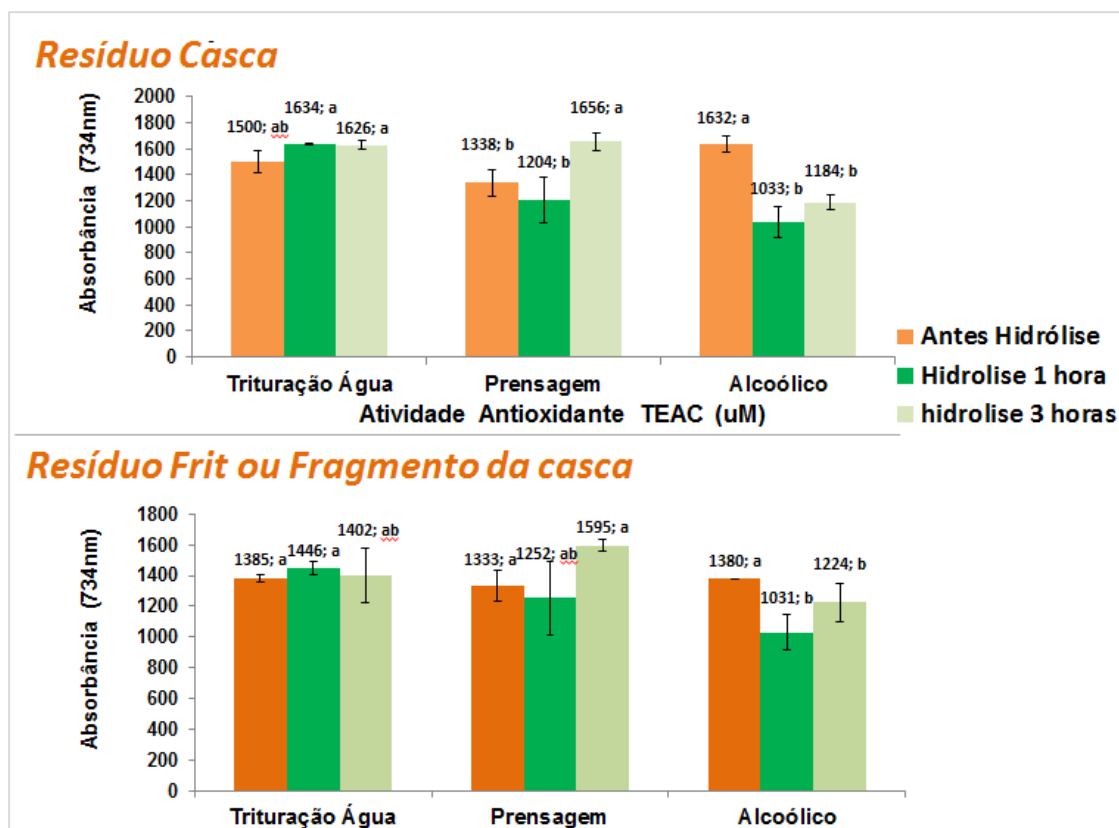
Alguns estudos comprovam a eficiência na extração de fenólicos através de métodos similares aos métodos utilizados neste projeto. Entre estes estudos temos uma publicação onde foi utilizado um método de lixiviação utilizando água como solvente, onde os rendimentos apresentados foram para hesperidina 15,5g/ 2kg de casca de laranja que equivale a 0,8% da quantidade total da casca e para naringina 12g/ 2kg de casca que equivale a 0,6% da quantidade total da casca, este método é similar ao tratamento trituração água onde foi apresentado como um método viável devido aos seus rendimentos obtidos nas extrações (El-NAWAWI, 1995). Considerando os rendimentos obtidos neste projeto utilizando o tratamento trituração água, para a hesperidina temos os maiores rendimentos na casca 0,054mg/ 15g de casca, que equivale a 0,4% da quantidade total utilizada e para naringina os rendimentos foram 0,013mg/15 gr de casca que equivale a 0,08% da quantidade total de casca. Porém, considerando o tratamento alcoólico os rendimentos foram um pouco maiores comparados aos rendimentos do tratamento trituração água, para hesperidina 1,01mg/ 25 gr de casca o que equivale a 4% da quantidade total de casca, para naringina 0,033mg/ 25gr de casca o que equivale a 0,13% da quantidade total de casca.

O solvente utilizado para a realização das extrações e a polaridade dos mesmos podem afetar diretamente a transferência de elétrons e átomos de hidrogênio, que é considerado o aspecto chave da extração de polifenóis e assim como consequência a interferência na atividade antioxidante.(OLIVEIRA; ZUCHETTO; OLIVEIRA, 2001).

4.4. Determinação da atividade antioxidante dos extratos antes e após modificação enzimática

Para determinação da atividade antioxidante foram utilizadas as amostras resultantes das extrações antes da hidrólise, após 1 hora e após 3 horas de hidrólise. As amostras foram analisadas em triplicata e os resultados foram analisados estaticamente pelo método de tukey ($p > 0,05$), e estão apresentados na Tabela 13.

Figura 24. Capacidade antioxidante dos extratos antes e após modificação enzimática.



De acordo com a figura 26, considerando uma análise estatística entre os tratamentos, podemos verificar que de modo geral a obtenção das formas agliconas das flavanonas principalmente para os resíduos casca e “frit” que passaram pelo tratamento com água apresentaram um potencial antioxidante. Já para o tratamento alcoólico, como era esperado não houve aumento da capacidade antioxidante, pois na presença de etanol a enzima naringinase pode ter sido inibida, o que não liberou agliconas.

Tabela 4. Capacidade antioxidante dos extratos antes e após modificação enzimática. Análise estatística entre os tempos pré-hidrólise, 1 e 3 horas.

	Resíduo Casca	Resíduo Frit
Tratamentos	Média entre os tempos (Pré-Hidrólise, 1h e 3 h)	Média entre os tempos (Pré-Hidrólise, 1h e 3 h)
Trituração água	1587,1 ± 75,2 ^a	1411,4 ± 31,5 ^a
Prensagem	1399,9 ± 232,0 ^a	1394,0 ± 179,0 ^a
Alcoólico	1283,8 ± 311,6 ^a	1211,9 ± 174,7 ^a

Considerando as análises estatísticas para os tratamentos trituração água, prensagem e alcoólico, não apresentaram diferença significativa entre os tempos, ou seja, a hidrólise enzimática não influenciou na capacidade antioxidante.

4.5. Rendimento dos produtos por tonelada de laranja processada versus valor estimado de mercado

Para calcular a concentração das flavanonas obtidas nos processos de extração por trituração água, prensagem e alcoólico antes e após modificação enzimática (1h e 3h), foi utilizada a equação 1, baseando-se nos rendimentos em mg/mL expressos nas tabelas 8 e 9 e a equação 2 para estimar o valor de mercado para 1 tonelada, considerando o valor de compra atualmente aplicado pela empresa Americana de produtos químicos Sigma-Aldrich Corporation.

Equação 1: rendimento/tonelada

$$\text{Ppm/Ton} = \left[\frac{\text{concentração(g/L)} \times 1\text{ton (1000000 g)}}{\text{Qtde resíduo utilizado na extração (g)}} \right] \times \text{volume (L)}$$

Equação 2: Valor estimado de mercado

$$\text{Valor de mercado} = \text{Ppm/ton} \times \text{Valor R\$ 1g (Sigma)}$$

De acordo com a Tabela 10, a hidrólise realizada no tempo de 1 hora para o tratamento trituração com água para o resíduo casca, foi a condição que apresentou maior rendimento de todo o processo, representando um rendimento 2% maior que os rendimentos apresentados pela prensagem a frio, resíduo “frit” no tempo de 1 hora e um rendimento 37% maior que os rendimentos apresentados pela trituração água, resíduo casca no tempo de 3 horas e resíduo “frit” tempo de 1 hora. Esse foi um resultado bastante positivo, considerando que a prunina é um composto de grande interesse medicinal devido ao seu teor bioativo e seu alto valor de mercado. Também é de grande interesse científico para tratamento de diversas doenças, entre elas o diabetes.

Tabela 5. Rendimento/tonelada e estimativa para a obtenção de prunina, com valor de compra aplicado ao mercado atual.

Tratamento	Resíduo	Tempo	Composto	concent ração (g/L)	Qtde Resíduo (extração) (g)	Qtde Volume (extração) (mL)	g de Prunina/ Ton resíduo	Valor (R\$) 1 mg Sigma (prunin>95%)	
Trituração água	casca	1hora	prunina	0,041	15	150	410,00	R\$ 1.102.000,00	R\$ 451.820.000,00
Trituração água	casca	3horas	prunina	0,026	15	150	260,00	R\$ 1.102.000,00	R\$ 286.520.000,00
Trituração água	frit	1hora	prunina	0,026	15	150	260,00	R\$ 1.102.000,00	R\$ 286.520.000,00
prensagem	frit	1hora	prunina	0,04	30	300	400,00	R\$ 1.102.000,00	R\$ 440.800.000,00
prensagem	casca	1hora	prunina	0,019	30	300	190,00	R\$ 1.102.000,00	R\$ 209.380.000,00
Trituração água	frit	3horas	prunina	0,009	15	150	90,00	R\$ 1.102.000,00	R\$ 99.180.000,00
prensagem	casca	3hors	prunina	0,009	30	300	90,00	R\$ 1.102.000,00	R\$ 99.180.000,00
prensagem	frit	3hors	prunina	0,009	30	300	90,00	R\$ 1.102.000,00	R\$ 99.180.000,00

De acordo com a tabela 11, a hidrólise enzimática para o tempo de 1 hora, para o tratamento alcoólico e resíduo casca, foi a amostra que apresentou o melhor rendimento. A hesperidina já mantém um mercado consolidado no ramo farmacêutico com aplicações para doenças crônicas, viabilizando sua produção.

De acordo com a Tabela 11, a hidrólise enzimática (tempo de 1 hora) para o extrato com tratamento alcoólico usando resíduo casca, foi a condição que apresentou o maior rendimento 77% maior que o rendimento apresentado pelo tratamento trituração água. A hesperidina já mantém um mercado consolidado no ramo farmacêutico com aplicações para doenças crônicas, o qual viabiliza sua produção em larga escala.

Tabela 6. Rendimento/tonelada e estimativa para a hesperidina considerando o valor de compra aplicado no mercado atual.

Tratamento	Resíduo	Tempo	Composto	concen tração (mg/mL)	Qtde Resíduo (extração) (g)	Qtde de Volume (extração) mL	g de Hesperidina/ Ton resíduo (PPM)	Valor (R\$) 1 g Sigma (Hesperidin>80%)	
alcoólico	casca	1 hora	hesperidina	1,016	25	250	10.160,00	R\$ 20,00	R\$ 203.200,00
alcoólico	casca	3 horas	hesperidina	0,999	25	250	9.990,00	R\$ 20,00	R\$ 199.800,00
alcoólico	frit	3 horas	hesperidina	0,944	25	250	9.440,00	R\$ 20,00	R\$ 188.800,00
alcoólico	casca	antes	hesperidina	0,933	25	250	9.330,00	R\$ 20,00	R\$ 186.600,00
alcoólico	frit	1 hora	hesperidina	0,857	25	250	8.570,00	R\$ 20,00	R\$ 171.400,00
alcoólico	frit	antes	hesperidina	0,791	25	250	7.910,00	R\$ 20,00	R\$ 158.200,00
Trituração água	frit	antes	hesperidina	0,235	15	150	2.350,00	R\$ 20,00	R\$ 47.000,00
Trituração água	casca	antes	hesperidina	0,183	15	150	1.830,00	R\$ 20,00	R\$ 36.600,00
prensagem	frit	antes	hesperidina	0,258	30	300	2.580,00	R\$ 20,00	R\$ 51.600,00
prensagem	casca	antes	hesperidina	0,142	30	300	1.420,00	R\$ 20,00	R\$ 28.400,00
Trituração água	casca	1 hora	hesperidina	0,054	15	150	540,00	R\$ 20,00	R\$ 10.800,00
Trituração água	frit	1 hora	hesperidina	0,043	15	150	430,00	R\$ 20,00	R\$ 8.600,00
Trituração água	frit	3 horas	hesperidina	0,039	15	150	390,00	R\$ 20,00	R\$ 7.800,00
Trituração água	casca	3 horas	hesperidina	0,035	15	150	350,00	R\$ 20,00	R\$ 7.000,00
prensagem	frit	3 horas	hesperidina	0,051	30	300	510,00	R\$ 20,00	R\$ 10.200,00
prensagem	frit	1 hora	hesperidina	0,028	30	300	280,00	R\$ 20,00	R\$ 5.600,00
prensagem	casca	1 hora	hesperidina	0,027	30	300	270,00	R\$ 20,00	R\$ 5.400,00
prensagem	casca	3 horas	hesperidina	0,027	30	300	270,00	R\$ 20,00	R\$ 5.400,00

De acordo com a tabela 11, a hidrólise enzimática (tempo de 1 hora), aplicada no extrato obtido por tratamento alcoólico do resíduo casca, foi a condição que apresentou o maior rendimento, 77% maior que o rendimento apresentado pelo tratamento trituração água para o resíduo “frit” pré-hidrólise.

De acordo com a tabela 12, a hidrólise enzimática (tempo de 1 hora) aplicada no extrato obtido por tratamento alcoólico do resíduo “frit” foi a condição que apresentou maior rendimento 55% maior comparado ao rendimento apresentado pelo tratamento prensagem para o resíduo “frit” (tempo de 3 horas) e 61% maior comparado ao rendimento apresentado pelo tratamento trituração água para o resíduo casca (tempo de 3 horas).

Tabela 7. Rendimento/tonelada e estimativa para a naringina considerando o valor de compra aplicado no mercado atual.

Tratamento	Resíduo	Tempo	Composto	concen tração (mg/mL)	Qtde Resíduo (extração) (g)	Qtde de Volume (extração) mL	g de Naringina/ Ton resíduo (PPM)	Valor (R\$) 1 g Sigma (Naringina>90%)	
Alcoólico	<i>Frit</i>	1hora	Naringina	0,033	25	250	330,00	15,64	5.161,20
Alcoólico	<i>Frit</i>	3 horas	Naringina	0,03	25	250	300,00	15,64	4.692,00
Alcoólico	casca	1hora	Naringina	0,018	25	250	180,00	15,64	2.815,20
Alcoólico	casca	3 horas	Naringina	0,018	25	250	180,00	15,64	2.815,20
Prensagem	<i>Frit</i>	3 horas	Naringina	0,015	30	300	150,00	15,64	2.346,00
Prensagem	<i>Frit</i>	1hora	Naringina	0,014	30	300	140,00	15,64	2.189,60
Trituração Água	casca	3 horas	Naringina	0,013	15	150	130,00	15,64	2.033,20
Trituração Água	<i>Frit</i>	3 horas	Naringina	0,013	15	150	130,00	15,64	2.033,20
Trituração Água	<i>Frit</i>	1hora	Naringina	0,01	15	150	100,00	15,64	1.564,00
Prensagem	casca	3 horas	Naringina	0,01	30	300	100,00	15,64	1.564,00
Trituração Água	casca	1 hora	Naringina	0,009	15	150	90,00	15,64	1.407,60
Prensagem	casca	1hora	Naringina	0,004	30	300	40,00	15,64	625,60

A naringina assim como a hesperidina e a prunina, contem um alto nível de compostos bioativos que são de grande interesse medicinal. Existem diversas publicações científicas que avaliam a aplicação deste composto para tratamento de diversas doenças, dentre essas o câncer de colón.

5. CONCLUSÃO

Pode se concluir que entre os métodos de extração utilizados, a trituração com água apresentou um bom desempenho considerando seus rendimentos e estimativa de valor de produto por tonelada de resíduo. Entre os resíduos utilizados no projeto, o “*frit*” e a casca obtiveram bons resultados.

Para hidrólise enzimática os resultados apresentados mostram um bom desempenho da reação para a obtenção dos produtos de interesse deste projeto, como a prunina rendimento de 0,04 g/L para o tratamento trituração água no tempo de 1 hora de reação enzimática, naringina rendimento de 0,033 g/L para o tratamento alcoólico no tempo de 1 hora de reação enzimática, e hesperidina rendimento de 1,01 para o tratamento alcoólico no tempo de 1 hora de hidrólise enzimática também apresentando maior eficiência no aumento das concentrações dos compostos glicolizados.

Para a atividade antioxidante considerando as análises estatísticas entre os tempos de reação enzimática, não apresentou diferença significativa entre os tratamentos. Considerando as análises estatísticas entre os tratamentos, o tratamento trituração água apresentou um maior potencial de atividade antioxidante.

De modo geral, é possível concluir que os resíduos cítricos tem potencial para extração de compostos de alto valor agregado. Apesar do método alcoólico ser uma boa forma de extração de flavonoides o método trituração água pode ser a melhor alternativa para aplicação em escala industrial.

6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Foi possível identificar algumas sugestões para trabalhos futuros, tais como:

- Testes utilizando o resíduo (casca) da indústria utilizado no processo de trituração e prensagem para extração de D-limoneno.
- Realização da hidrólise enzimática utilizando nitrogênio para inativação da enzima evitando o uso de aquecimento.
- Viabilidades para tratamento de purificação dos compostos obtidos através da reação enzimática.
- Realização de testes de bioatividade *in vitro*, em animais e humanos.
- Viabilização de produção em maiores escalas, análise de custo do produto final, fornecedores, potencial de mercado.
- Aplicação do extrato como enriquecimento nutricional do suco como uma alternativa para aplicação imediata desses extratos pela indústria seria a aplicação no suco aumentando seu valor nutricional devido o aumento da capacidade antioxidante.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AWAN, A. T. A. J. **Orange bagasse as biomass for 2g-ethanol production bagaço de laranja como biomassa para produção de etanol-2g**. Thesis (Doctorate in Organic Chemistry) 2013. - Institute of Chemistry, University of Campinas, 2013. p. 157.

BAMPIDIS, V. A.; ROBINSON, P. H. Citrus by-products as ruminant feeds: A review. **Animal Feed Science and Technology**, v. 128, n. 3–4, p. 175–217, 2006.

BEHLING, E. B. *et al.* Flavonóide Quercetina : Aspectos Gerais e Ações Biológicas. **Alimentos e Nutrição**, v. 15, n. 3, p. 285–292, 2004.

CACCAMESE, S.; CHILLEMI, R. Racemization at C-2 of naringin in pummelo (*Citrus grandis*) with increasing maturity determined by chiral high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 7, p. 1089–1093, 2010.

CHEIGH, C. I.; CHUNG, E. Y.; CHUNG, M. S. Enhanced extraction of flavanones hesperidin and narirutin from Citrus unshiu peel using subcritical water. **Journal of Food Engineering**, v. 110, n. 3, p. 472–477, 2012.

CITRUS BR. **Compromisso de transparência**. São Paulo: Associação Nacional dos Exportadores de Suco Cítricos, 2016. Disponível em: <<http://www.citrusbr.com/safras/>>. Acesso em: 25 jun. 2017.

CYPRIANO, D. Z. *et al.* A Biomassa da Laranja e seus Subprodutos. **Revista Virtual de Química**, v. 9, n. 1, p. 176–191, 2017.

DAVIS, P. L. A Rapid Procedure for Extraction of Naringin From Grapefruit Rind Sections12. **Proceedings of the Floriada state horticultural society**, v. 79, p. 325–326, 1966. Disponível em: <<http://journals.fcla.edu/fshs/article/view/100436/96391>>.

DAVIS, W. B. Determination of Flavanones in Citrus Fruits. **Analytical Chemistry**, v. 19, n. 7, p. 476–478, 1947.

DESIDERIO, C.; ROSSI, A. de; SINIBALDI, M. Analysis of flavanone-7-O-glycosides in citrus juices by short-end capillary electrochromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1081, n. 1 SPEC. ISS., p. 99–104, 2005.

DONADIO, L. C. Laranja pêra. Jaboticabal: Funep, 1999. 51 p.(Boletim Citrícola, n. 11).Disponível em: <http://www.estacaoexperimental.com.br/documentos/BC_11.pdf>.

DORNELLES, C. M. M.. **características-botânicas**. Disponível em: <<http://www.ufrgs.br/afeira/materias-primas/frutas/laranja/caracteristicas-botanicas>>. Acesso em: 1 out. 2018.

EL-NAWAWI, S. A. Extraction of citrus glucosides. **Carbohydrate Polymers**, v. 27, n. 1, p. 1–4, 1995.

EMBRAPA. **Sistema de Produção de Citros para o Nordeste**. Disponível em: <<https://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Citros/CitrosNordeste/clima.htm>>.

EMBRAPA. Fisiográfica Em 2013. p. 1–5, 2014.

ESCOBAR, M. **Extracción de compuestos fenólicos de las cáscaras de cítricos producidos en México**.. 2010. Tesis (Maestria en Ciencias en Alimentos)- La Escuela Nacional de Ciencias Biologicas- Instituto Politecnico Nacional, Ciudad de Mexico, México., 2010.

FUNDECITRUS. **Inventario de Arvores e estimativa de safra de 2018/2019 laranja do cinturão citrícola de São Paulo e Triângulo/Sudoeste Mineiro**. Araraquara, SP: Fundo de Defesa da Citricultura, 2018. 144 p. Disponível em: https://www.fundecitrus.com.br/pdf/pes_relatorios/2018_05_21_Invent%C3%A1rio_e_Estimativa_do_Cinturao_Citricola_2018-20191.pdf

HABELT, K.; PITTLNER, F. A rapid method for the determination of naringin, prunin, and naringenin applied to the assay of naringinase. **Analytical Biochemistry**, v. 134, n. 2, p. 393–397, 1983.

HAVSTEEN, B. H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 96, n. 2-3, p 67-202, 2002. Disponível em: ,<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S016372580200298X?via%3Dihub>>.

HUNLUN, C. *et al*. Characterisation of the flavonoid composition and total antioxidant capacity of juice from different citrus varieties from the Western Cape region. **Journal of Food**

Composition and Analysis, v. 62, September, p. 115–125, 2017. Disponível em:

<<https://dx.doi.org/10.1016/j.jfca.2017.04.018>>.

JUSTESEN, U.; KNUTHSEN, P.; LETH, T. Determination of plant polyphenols in Danish foodstuffs by HPLC-UV and LC-MS detection. **Cancer Letters**, v. 114, n. 1–2, p. 165–167, 1997.

KHAN, M. K.; ZILL-E-HUMA; DANGLES, O. A comprehensive review on flavanones, the major citrus polyphenols. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 33, n. 1, p. 85–104, 2014.

KHARFAN, D. **Proposta de método para avaliação do processo de extração de sucos cítricos**. Dissertação (Mestrado em Engenharia de produção) Universidade Federal de São Carlos, 2011.

SILVA, L. C.R.C.;. **Desenvolvimento de estratégias analíticas para determinação de flavanonas e psoraleno por claeedad em sucos de laranjas de diferentes procedências**. Tese (Doutorado em Química) Universidade Federal da Bahia, 2009.

MARQUES LINS, E. *et al.* Perfil epidemiológico de pacientes submetidos a tratamento cirúrgico de varizes de membros inferiores Epidemiologic profile of the patients underwent varicose vein surgery of the lower limbs. **Jornal Vascular Brasileiro**, v. 11, n. 4, p. 301–304, 2007.

MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426–428, 1959.

MULVIHILL, E. E.; BURKE, A. C.; HUFF, M. W. Citrus Flavonoids as Regulators of Lipoprotein Metabolism and Atherosclerosis. **Annual Review of Nutrition**, v. 36, n. 1, p. 275–299, 2016.

NEVES, M. F. (Coord.) *et al.* **O retrato da citricultura brasileira**. São Paulo: MARKESTRAT, 2010. 138 p.

OLIVEIRA, K. B.; OLIVEIRA, B. H. Obtenção De Substâncias Bioativas Através Da Biotransformação De Produtos Naturais. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 9, n. 1, p. 89–99, 2012.

OLIVEIRA, V. B. *et al.* Efeito de diferentes técnicas extrativas no rendimento,

atividade antioxidante, doseamentos totais e no perfil por clae-dad de Dicksonia sellowiana (Presl.). Hook, dicksoniaceae. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, v. 18, n. 1, p. 230–239, 2016.

POURBAFRANI, M. *et al.* Production of biofuels, limonene and pectin from citrus wastes. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 11, p. 4246–4250, 2010.

PURI, M. *et al.* Immobilized enzyme technology for debittering citrus fruit juices. In: BUSTO, M. D.; ORTEGA, N. (ed), **Food enzymes** : application of new technologies. Kerala, India:Transworld Research Network, 2008. p.91-103.

PURI, M. *et al.* Molecular characterization and enzymatic hydrolysis of naringin extracted from kinnow peel waste. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 48, n. 1, p. 58–62, 2011.

QUINTERO, A. *et al.* Constituents and biological activity of Citrus aurantium amara L. essential oil. **Acta Horticulturae**, v. 597, April, p. 115–117, 2004.

RAJENDRAN, P. *et al.* Antioxidants and human diseases. **Clinica Chimica Acta**, v. 436, p. 332–347, 2014.

RUFINO, M. DO S. M. *et al.* Metodologia Científica: Determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH. **Comunicado Técnico Online**, Fortaleza, CE., n. 127, p. 1–4, 2007.Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CNPAT/10224/1/Cot_127.pdf>.

SAID, D. Insumos farmacutêicos. **Revista de Saude Publica**, v. 40, n. 2, p. 359–360, 2006.

SANTOS, C. M. *et al.* Application of orange peel waste in the production of solid biofuels and biosorbents. **Bioresource Technology**, v. 196, p. 469–479, 2015.

SHARMA, K. *et al.* Converting citrus wastes into value-added products: Economic and environmently friendly approaches. **Nutrition**, v. 34, p. 29–46, 2017.

SPAGOLLA, L. C. *et al.* Extração alcoólica de fenólicos e flavonóides totais de mirtilo “Rabbiteye” (*Vaccinium ashei*) e sua atividade antioxidante. **Revista de Ciencias Farmaceuticas Basica e Aplicada**, v. 30, n. 2, p. 187–191, 2009.

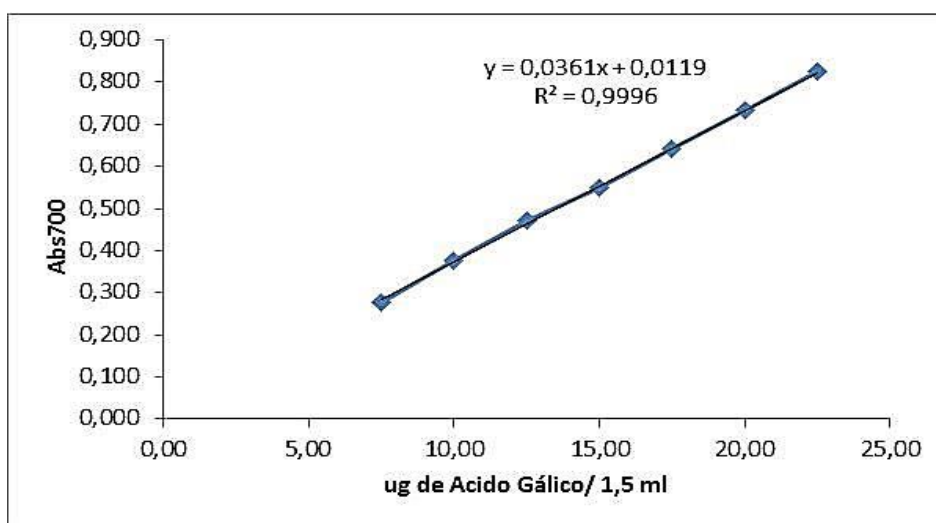
TRIPOLI, E. *et al.* Citrus flavonoids: Molecular structure, biological activity and nutritional properties: A review. **Food Chemistry**, v. 104, n. 2, p. 466–479, 2007.

TURKMEN, N.; SARI, F.; VELIOGLU, Y. S. Effects of extraction solvents on concentration and antioxidant activity of black and black mate tea polyphenols determined by ferrous tartrate and Folin-Ciocalteu methods. **Food Chemistry**, v. 99, n. 4, p. 835–841, 2006.

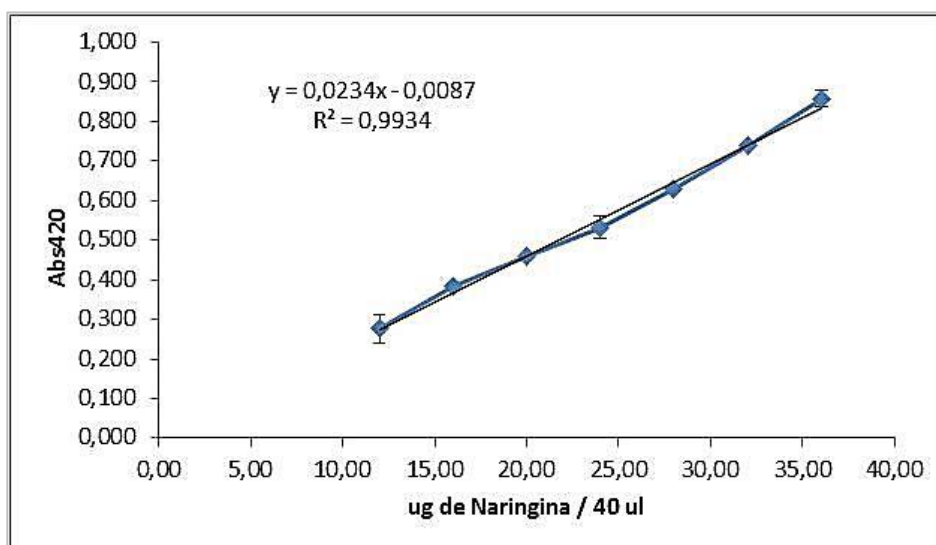
WANNMACHER, L. Interações de medicamentos com álcool: verdades e mitos. In: Organização Pan-Americana da Saúde, Brasil. **Uso Racional de Medicamentos: Temas Selecionados**. Brasília: OPAS, v. 4, n. 12, p. 1–6, 2007. Disponível em: <http://www.saudedireta.com.br/docsupload/1339892860v4n12_interacoes_medicamentosas.pdf>..

ANEXO 1- CURVAS ANÁLITICAS

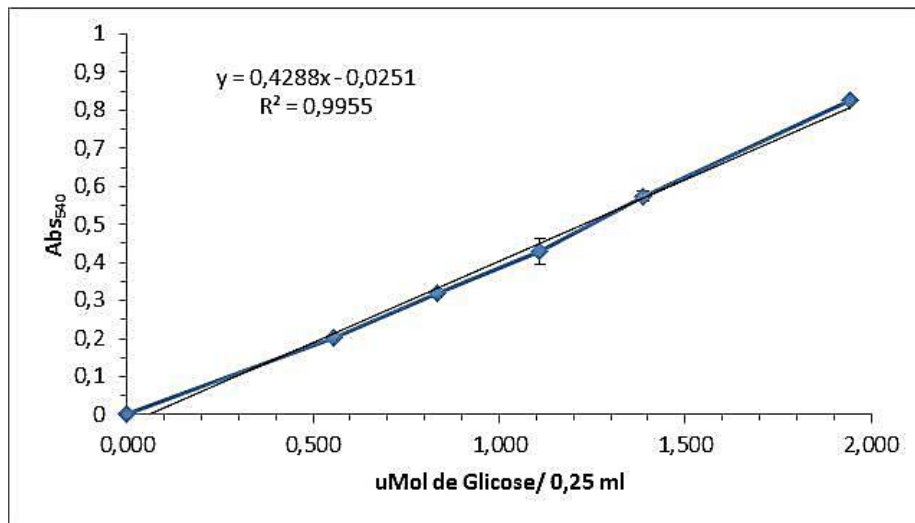
Curva analítica para determinação de fenólicos totais



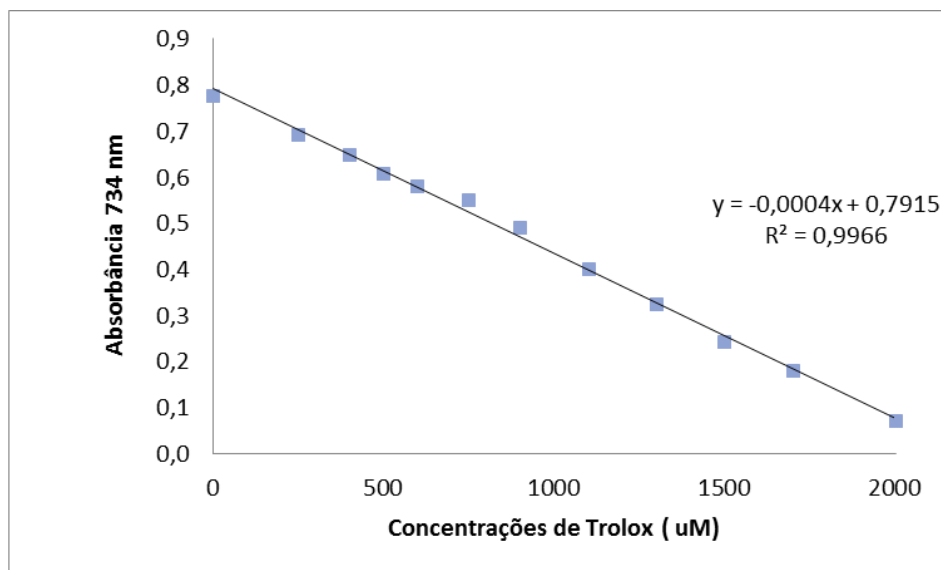
Curva analítica para a determinação de flavanonas



Curva analítica para a determinação de açúcares redutores totais



Curva Padrão de Trolox



ANEXO 2 – TABELAS

Açúcares redutores totais, compostos fenólicos e flavanonas totais para o resíduo casca.

ANÁLISES COLORIMÉTRICAS							MÉDIA [mg/mL] ± DP		
Tratamento	Resíduo	Massa inicial	Volum e inicial	Tempo Reação	t	N	DNS	FENÓLICOS	FLAVANONAS
1 Trituração Água	CASCA	15g	150mL	24h	8°C	3	3,69 ± 0,03 ^{ab}	0,29 ± 0,03 ^a	0,26 ± 0,01 ^a
2 Trituração Etanol	CASCA	15g	150mL	24h	8°C	3	2,10 ± 0,08 ^d	0,25 ± 0,04 ^{ab}	0,15 ± 0,00 ^d
3 Hidrotérmico	CASCA	10g	100mL	3h	70°C	3	3,07 ± 0,21 ^c	0,18 ± 0,01 ^c	0,19 ± 0,00 ^c
4 Prensagem	CASCA	30g	300mL	24h	8°C	3	3,99 ± 0,20 ^a	0,19 ± 0,02 ^{bc}	0,14 ± 0,01 ^d
5 Alcoólico	CASCA	25g	250mL	3h	70°C	3	3,38 ± 0,20 ^{bc}	0,31 ± 0,01 ^a	0,25 ± 0,00 ^b

Açúcares redutores totais, compostos fenólicos e flavanonas totais para o resíduo “frit”.

ANÁLISES COLORIMÉTRICAS							MÉDIA [mg/mL] ± DP		
Tratamento	Resíduo	Massa inicial	Volum e inicial	Tempo Reação	t	N	DNS	FENÓLICOS	FLAVANONAS
1 Trituração Água	FRIT	15g	150mL	24h	8°C	3	3,17 ± 0,06 ^c	0,24 ± 0,02 ^b	0,23 ± 0,00 ^c
2 Trituração Etanol	FRIT	15g	150mL	24h	8°C	3	5,14 ± 0,26 ^a	0,33 ± 0,01 ^a	0,23 ± 0,01 ^c
3 Hidrotérmico	FRIT	10g	100mL	3h	70°C	3	3,16 ± 0,09 ^c	0,22 ± 0,01 ^b	0,26 ± 0,01 ^b
4 Prensagem	FRIT	30g	300mL	24h	8°C	3	3,39 ± 0,09 ^c	0,23 ± 0,01 ^b	0,25 ± 0,02 ^{bc}
5 Alcoólico	FRIT	25g	250mL	3h	70°C	3	4,49 ± 0,37 ^b	0,34 ± 0,02 ^a	0,31 ± 0,01 ^a

Açúcares redutores totais, compostos fenólicos e flavanonas totais para o resíduo core ou bagaço.

ANÁLISES COLORIMÉTRICAS							MÉDIA [mg/mL] ± DP		
Tratamento	Resíduo	Massa inicial	Volum e inicial	Tempo Reação	t	N	DNS	FENÓLICOS	FLAVANONAS
1 Trituração Água	BAGAÇO	15g	150mL	24h	8°C	3	5,78 ± 0,78 ^a	0,46 ± 0,03 ^b	0,21 ± 0,04 ^a
2 Trituração Etanol	BAGAÇO	15g	150mL	24h	8°C	3	4,57 ± 0,88 ^{ab}	0,27 ± 0,07 ^c	0,14 ± 0,04 ^a
3 Hidrotérmico	BAGAÇO	10g	100mL	3h	70°C	3	5,41 ± 0,07 ^a	0,50 ± 0,04 ^{ab}	0,18 ± 0,04 ^a
4 Prensagem	BAGAÇO	30g	300mL	24h	8°C	3	3,22 ± 0,04 ^b	0,30 ± 0,01 ^c	0,03 ± 0,00 ^b
5 Alcoólico	BAGAÇO	25g	250mL	3h	70°C	3	3,84 ± 0,21 ^b	0,60 ± 0,04 ^a	0,13 ± 0,05 ^a

Resultados das análises colorimétricas e tratamentos para extração de flavanonas.

Resíduo	CONSOLIDADO		MEDIA [mg/L] ± DP		
	TRIT. ÁGUA	TRIT. ETANOL	HIDROTÉRMICO	PRESAGEM	ALCOÓLICO
BAGAÇO	0,21 ± 0,04 ^a	0,14 ± 0,04 ^b	0,18 ± 0,04 ^b	0,03 ± 0,00 ^c	0,13 ± 0,05 ^b
CASCA	0,26 ± 0,01 ^a	0,15 ± 0,00 ^b	0,19 ± 0,01 ^b	0,14 ± 0,01 ^b	0,25 ± 0,00 ^a
FRIT	0,23 ± 0,00 ^a	0,23 ± 0,01 ^a	0,26 ± 0,01 ^a	0,25 ± 0,02 ^a	0,31 ± 0,01 ^a

Concentração de flavanonas glicosiladas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) para o resíduo casca antes da hidrólise.

Tratamento	Resíduo	Massa inicial	Volume inicial	Tempo Reação	t	N	MEDIA [mg/mL] ± DP		
							NARIRUTINA	NARINGINA	HE SPERIDINA
Trituração Água	CASCA	15g	150mL	24h	8°C	3	0,054 ± 0,004 ^b	0,009 ± 0,000 ^c	0,183 ± 0,027 ^b
Trituração Etanol	CASCA	15g	150mL	24h	8°C	3	0,048 ± 0,000 ^b	0,010 ± 0,000 ^{bc}	0,250 ± 0,029 ^b
Hidrotérmico	CASCA	10g	100mL	3h	70°C	3	0,050 ± 0,004 ^b	0,011 ± 0,000 ^b	0,223 ± 0,032 ^b
Prensagem	CASCA	30g	300mL	24h	8°C	3	0,035 ± 0,001 ^c	0,010 ± 0,000 ^{bc}	0,142 ± 0,016 ^b
Alcoólico	CASCA	25g	250mL	3h	70°C	3	0,078 ± 0,003 ^a	0,015 ± 0,001 ^a	0,933 ± 0,120 ^a

Concentração de flavanonas glicosiladas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) antes da hidrólise para resíduo “frit” antes da hidrólise.

Tratamento	Resíduo	Massa inicial	Volume inicial	Tempo Reação	t	N	MEDIA [mg/mL] ± DP		
							NARIRUTINA	NARINGINA	HE SPERIDINA
Trituração Água	FRIT	15g	150mL	24h	8°C	3	0,048 ± 0,002 ^d	0,014 ± 0,00 ^c	0,235 ± 0,029 ^b
Trituração Etanol	FRIT	15g	150mL	24h	8°C	3	0,057 ± 0,001 ^b	0,019 ± 0,000 ^b	0,360 ± 0,043 ^b
Hidrotérmico	FRIT	10g	100mL	3h	70°C	3	0,027 ± 0,000 ^a	0,008 ± 0,000 ^d	0,088 ± 0,010 ^c
Prensagem	FRIT	30g	300mL	24h	8°C	3	0,054 ± 0,001 ^c	0,019 ± 0,000 ^b	0,258 ± 0,030 ^b
Alcoólico	FRIT	25g	250mL	3h	70°C	3	0,078 ± 0,001 ^a	0,031 ± 0,000 ^a	0,791 ± 0,094 ^a

Capacidade antioxidante dos extratos antes e após modificação enzimática

Tratamento	Resíduo	N	Antes Hidrólise	Hidrólise 1 hora	Hidrólise 3 horas
1 Trituração Água	CASCA	3	1500,4 ± 84,3 ^{ab}	1634,6 ± 6,3 ^a	1626,2 ± 32,8 ^a
4 Prensagem	CASCA	3	1338,8 ± 102,5 ^b	1204,6 ± 176,2 ^b	1656,3 ± 66,3 ^a
5 Alcoólico	CASCA	3	1632,9 ± 62,8 ^a	1033,8 ± 120,3 ^b	1184,6 ± 55,8 ^b

Tratamento	Resíduo	N	Antes Hidrólise	Hidrólise 1 hora	Hidrólise 3 horas
1 Trituração Água	FRIT	3	1385,0 ± 23,8 ^a	1446,3 ± 41,3 ^a	1402,9 ± 179,1 ^{ab}
4 Prensagem	FRIT	3	1333,8 ± 96,1 ^a	1252,9 ± 236,9 ^{ab}	1595,4 ± 40,0 ^a
5 Alcoólico	FRIT	3	1380,0 ± 1,3 ^a	1031,3 ± 117,2 ^b	1224,4 ± 124,4 ^b

Teores de flavanonas glicosiladas narirutina, naringina e hesperidina antes e depois da modificação pela naringinase nos tempos de reação de 1 e 3 horas.

Resíduo Casca - MEDIA [mg/mL] ± DP										
		Antes da Hidrólise			1 Hora			3Horas		
Tratamento	N	Narirutina	Naringina	Hesperidina	Narirutina	Naringina	Hesperidina	Narirutina	Naringina	Hesperidina
1 Trituração Água	3	0,054 ± 0,004 ^b	0,009 ± 0,000 ^c	0,183 ± 0,027 ^b	0,019 ± 0,007 ^b	0,009 ± 0,002 ^b	0,054 ± 0,024 ^b	0,023 ± 0,005 ^b	0,013 ± 0,000 ^b	0,035 ± 0,031 ^b
4 Prensagem	3	0,035 ± 0,001 ^c	0,010 ± 0,000 ^{bc}	0,142 ± 0,016 ^b	0,018 ± 0,000 ^b	0,004 ± 0,003 ^b	0,027 ± 0,001 ^b	0,019 ± 0,001 ^b	0,010 ± 0,000 ^c	0,027 ± 0,003 ^b
5 Alcoólico	3	0,078 ± 0,003 ^a	0,015 ± 0,001 ^a	0,933 ± 0,120 ^a	0,104 ± 0,003 ^a	0,018 ± 0,000 ^a	1,016 ± 0,179 ^a	0,104 ± 0,013 ^a	0,018 ± 0,002 ^a	0,999 ± 0,128 ^a
Resíduo <i>Frit</i> ou Fragmento de casca - MEDIA [mg/mL] ± DP										
		Antes da Hidrólise			1 Hora			3Horas		
Tratamento	N	Narirutina	Naringina	Hesperidina	Narirutina	Naringina	Hesperidina	Narirutina	Naringina	Hesperidina
1 Trituração Água	3	0,048 ± 0,002 ^d	0,014 ± 0,00 ^c	0,235 ± 0,029 ^b	0,033 ± 0,002 ^b	0,010 ± 0,001 ^b	0,043 ± 0,008 ^b	0,047 ± 0,003 ^b	0,013 ± 0,001 ^b	0,039 ± 0,010 ^b
4 Prensagem	3	0,054 ± 0,001 ^c	0,019 ± 0,000 ^b	0,258 ± 0,030 ^b	0,039 ± 0,015 ^b	0,014 ± 0,006 ^b	0,028 ± 0,012 ^b	0,049 ± 0,003 ^b	0,015 ± 0,001 ^b	0,051 ± 0,005 ^b
5 Alcoólico	3	0,078± 0,001 ^a	0,031 ± 0,000 ^a	0,791 ± 0,094 ^a	0,082 ± 0,022 ^a	0,033 ± 0,008 ^a	0,857 ± 0,306 ^a	0,111 ± 0,010 ^a	0,030 ± 0,009 ^a	0,944 ± 0,189 ^a

Teores de flavanonas agliconas prunina, naringenina e hesperetina antes e depois da modificação pela naringinase nos tempo de 1 e 3 horas.

[illegible]