



Caracterização do extrato de resíduos e polpa da toranja (*Citrus × paradisi* Macfad) com potencial bioativo

Kayane Soares Oliveira

Dissertação apresentada à Escola Superior Agrária de Bragança para obtenção do Grau de Mestre em Qualidade e Segurança Alimentar no âmbito da dupla diplomação com a Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Orientado por:

Doutora Tânia C. S. P. Pires

Doutora Lillian Barros

Profº Dr. Odinei H. Gonçalves

**Bragança
2023**

Realizado ao abrigo do Projeto “Bioma – Soluções integradas de BIOeconomia para a Mobilização da Cadeia Agroalimentar” (POCI-01-0247-FEDER-046112), pelo Consórcio “BIOMA”, financiado pelo Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional (FEDER), através do Sistema de Incentivos à Investigação e Desenvolvimento Tecnológico, no âmbito do Programa Operacional para a Competitividade e Internacionalização do Portugal2020.



AGRADECIMENTOS

A realização dessa dissertação de mestrado contou com importantes apoios e incentivos sem os quais não seria possível que se concretizasse, com isso quero deixar expressa minha sincera gratidão.

Primordialmente agradeço aos meus pais por sempre me incentivarem nos estudos além de apoiarem emocionalmente e financeiramente, sem eles, o sonho da dupla diplomação jamais seria possível. Agradeço também a minha irmã por ser minha melhor amiga e mesmo de longe, conseguir me compreender como ninguém, trazendo sempre calma em meio as tempestades.

A Doutora Lillian Barros (IPB) e Professor Doutor Odinei (UTFPR), meus co-orientadores, obrigada pela atenção, disponibilidade, e por todo conhecimento transmitido. Um agradecimento especial a minha orientadora Doutora Tânia Pires (IPB) por toda paciência ao longo do projeto, “puxões de orelha”, e por repassar tantas lições valiosas que vão além do conhecimento técnico e acadêmico.

Agradeço a toda comunidade do Instituto Politécnico de Bragança (IPB) e do Centro de Investigação de Montanha (CIMO) por me acolherem e contribuírem com uma ótima estrutura, equipamentos, além de diversas oportunidades de crescimento pessoal e profissional. Também à Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT, Portugal) e aos fundos nacionais FCT/MCTES (PIDDAC) pelo apoio financeiro ao CIMO (UIDB/00690/2020 e UIDP/00690/2020) e SusTEC (LA/P/0007/2020)..

Não menos importante, meus agradecimentos a Universidade Tecnológica Federal do Paraná e a todos os professores e colaboradores aos quais tive oportunidade de me conectar, foram anos de muito aprendizado que se estenderam a uma oportunidade de dupla diplomação a qual sou extremamente grata.

Finalmente, agradeço também a todos os meus amigos que fizeram e se fazem presentes na minha trajetória, são mais de cinco anos morando longe da família e a presença de vocês é muito importante nos momentos de alegria e fundamentalmente nos momentos de tristeza. Vocês me ensinaram que família nem sempre precisa ser de sangue.

RESUMO

A toranja (*Citrus x paradisi* Macfad) é o sexto fruto cítrico mais consumido em todo o mundo, conhecido pelo seu sabor picante e coloração da polpa vermelhosada, ela é uma fonte de vitaminas e minerais, além de ser rica em compostos bioativos. O seu principal consumo é a partir do sumo ou polpa da fruta, sendo que as cascas e o mesocarpo são um resíduo. Estudos demonstraram que, de forma geral, a maior parte dos resíduos sólidos vegetais possui uma composição química que inclui quantidades elevadas de compostos bioativos, fibras, vitaminas, entre outros. Portanto, o objetivo deste estudo foi caracterizar e comparar a composição centesimal e química das cascas, mesocarpo e polpa da toranja, além de avaliar as bioatividades do extrato obtido a partir dessas partes.

O teor de cinzas, proteínas, gorduras, fibras e hidratos de carbono foram determinados seguindo as metodologias oficiais de análise. O mesocarpo destacou-se com o maior teor de fibras, sendo este aproximadamente seis vezes maior do que o encontrado na polpa da fruta (6,7 e 1,01 g/100 de massa fresca, respetivamente). Entretanto, a polpa demonstrou ser a fração com a maior quantidade de açúcares livres (5,4 g/100g de massa fresca), destacando-se a sacarose (2,6 g/100g de massa fresca). A casca apresentou a maior percentagem de ácidos gordos polinsaturados (43%), enquanto o mesocarpo apresentou a maior percentagem de ácidos gordos monoinsaturados (29,20%).

Os ácidos orgânicos foram identificados nas diferentes partes da toranja, sendo a polpa a que apresentou o maior teor, com destaque para o ácido cítrico (1068 mg/100g de massa fresca). Já o mesocarpo, por sua vez, foi a parte da fruta com o maior teor de ácido ascórbico (53 mg/100g de massa fresca). Quanto aos tocoferóis, o α -tocoferol foi identificado em todas as partes da fruta, com a casca e o mesocarpo a apresentar quantidades mais elevadas em comparação à polpa da fruta (9,8 e 2,51 mg/100g, respetivamente, vs 0,46 mg/100g). A naringenina foi o composto fenólico predominante encontrado em todas as partes da toranja.

No que diz respeito às bioatividades, a casca da toranja demonstrou o maior potencial antioxidante nos ensaios de TBARS, OxHLIA e DPPH. Além disso, a casca apresentou uma destacada atividade fungistática contra o *Aspergillus*

fumigatus, com uma concentração inibitória mínima (CIM) de 0,6 mg/mL. Todos os extratos também mostraram capacidade de inibir o crescimento das bactérias *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* e *Listeria monocytogenes*.

Os extratos, na concentração máxima testada de 400 µg/mL, não demonstraram potencial anti-inflamatório nem citotóxico nas células tumorais humanas utilizadas, incluindo AGS (adenocarcinoma gástrico), CaCo2 (adenocarcinoma colorretal), MCF-7 (carcinoma de mama) e NCI-H460 (carcinoma de pulmão). Além disso, nenhum dos extratos apresentou toxicidade na concentração máxima testada na linha celular primária (PLP2) obtida a partir de fígado de porco.

Portanto, o presente estudo demonstrou diferenças nas composições da casca, mesocarpo e polpa da toranja, revelando que os resíduos (casca e mesocarpo) contêm macronutrientes e outros compostos químicos de grande interesse. Além disso, esses resíduos apresentam um potencial bioativo significativo, podendo ser utilizados como fonte de ingredientes naturais funcionalizantes com benefícios para a saúde humana.

Palavras-chave: Composição centesimal, Compostos fenólicos, Bioatividade, Resíduos Vegetais, Antioxidantes naturais.

ABSTRACT

Grapefruit (*Citrus x paradisi* Macfad) is the sixth most consumed citrus fruit worldwide known for its tangy flavor and reddish-pink pulp color. It is a source of vitamins and minerals and is rich in bioactive compounds. Its main consumption is in the form of juice or fruit pulp, while the peels and mesocarp are considered waste. Studies have shown that most vegetable solid wastes have a chemical composition that includes high amounts of bioactive compounds, fibers, vitamins, among others. Therefore, the objective of this study was to characterize and compare the centesimal and chemical composition of grapefruit peels, mesocarp, and pulp, as well as to evaluate the bioactivities of their extracts.

The ash, protein, fat, fiber, and carbohydrate contents were determined following official analysis methodologies. The mesocarp stood out with the highest fiber content, approximately six times higher than that found in the fruit pulp (6.71 and 1.01 g/100 g of fresh weight, respectively). However, the pulp demonstrated to be the fraction with the highest amount of free sugars (5.4 g/100 g of fresh weight), with sucrose being prominent (2.6 g/100g of fresh weight). The peel showed the highest percentage of polyunsaturated fatty acids (43%), while the mesocarp had the highest percentage of monounsaturated fatty acids (29.20%).

Organic acids were identified in the different parts of the grapefruit, with the pulp having the highest content, particularly citric acid (1068 mg/100 g of fresh weight). On the other hand, the mesocarp had the highest content of ascorbic acid (53 mg/100 g of fresh weight) among the fruit parts. Regarding tocopherols, α -tocopherol was identified in all the parts of the fruit, with the peel and mesocarp having higher amounts compared to the fruit pulp (9.8 and 2.51 mg/100 g, respectively, vs 0.46 mg/100 g). Naringenin was the predominant phenolic compound found in all parts of the grapefruit.

In terms of bioactivities, the grapefruit peel demonstrated the highest antioxidant potential within the TBARS, OxHLIA, and DPPH assays. Additionally, the peel showed significant fungistatic activity against *Aspergillus fumigatus*, with a minimum inhibitory concentration (MIC) of 0.6 mg/mL. All extracts also exhibited the ability to inhibit the growth of *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, and *Listeria*

monocytogenes bacteria.

The extracts, at the maximum tested concentration of 400 µg/mL, showed no anti-inflammatory or cytotoxic potential in the human tumor cells studied, including AGS (gastric adenocarcinoma), CaCo2 (colorectal adenocarcinoma), MCF-7 (breast carcinoma), and NCI-H460 (lung carcinoma). Furthermore, none of the extracts showed toxicity at the maximum tested concentration in a primary cell line (PLP2) obtained from pig liver.

Therefore, this study demonstrated differences in the compositions of grapefruit peel, mesocarp, and pulp, revealing that the waste materials (peel and mesocarp) contain macronutrients and other chemically interesting compounds. Additionally, these waste materials exhibit significant bioactive potential and can be used as a source of functional natural ingredients with benefits for human health.

Keywords: Centesimal composition, Phenolic compounds, Bioactivity, Plant waste, Natural antioxidants.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	3
RESUMO.....	4
ABSTRACT	6
LISTA DE ABREVIATURAS.....	10
ÍNDICE DE FIGURAS	12
ÍNDICE DE TABELAS	14
INTRODUÇÃO	15
1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
1.1 Compostos fenólicos - Caracterização e as suas aplicações nas indústrias alimentar, farmacêutica e cosmética.....	18
1.2 Caracterização da toranja (<i>Citrus × paradisi Macfad</i>).....	22
1.2.1 Etimologia e aplicações	22
1.2.2 Composição, centesimal, química e propriedades bioativas	25
1.2.3 Bio-resíduos da toranja (<i>Citrus x Paradisi Macfad</i>) como fontes de compostos bioativos e aplicação potencial nas diferentes indústrias	30
2. OBJETIVOS	32
3. MATERIAIS E MÉTODOS	35
3.1 Amostra	35
3.2 Preparação da amostra.....	35
3.3 Determinação da composição centesimal e do valor energético dos resíduos e da polpa da toranja (<i>Citrus × paradisi Macfad</i>)	36
3.4 Determinação da composição química dos resíduos e da polpa da toranja (<i>Citrus × paradisi Macfad</i>)	38
3.4.1 Ácidos gordos.....	38
3.4.2 Açúcares livres	39
3.4.3 Ácidos orgânicos	40
3.4.4 Tocoferóis.....	41
3.4.5 Compostos fenólicos	42

3.5 Avaliação das propriedades bioativas do extrato hidroetanólico da toranja (Citrus × paradisi Macfad)	44
3.5.1 Avaliação da atividade antimicrobiana	45
3.5.2 Avaliação da atividade antioxidante.....	47
3.5.3 Avaliação da atividade anti-inflamatória	51
3.5.4 Avaliação da citotoxicidade	53
3.6 Análise estatística.....	54
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	55
4.1 Rendimento da extração	55
4.2 Avaliação da composição centesimal e química da polpa, casca e mesocarpo da toranja (Citrus x paradisi Macfad)	55
4.2.1 Composição centesimal.....	56
4.2.2 Ácidos Gordos	58
4.2.3 Açúcares Livres	60
4.2.4 Ácidos Orgânicos	62
4.2.5 Tocoferóis.....	64
4.2.6 Compostos Fenólicos	66
4.3 Avaliação de bioatividades de extrato obtido da polpa, mesocarpo e casca da toranja (Citrus x paradisi Macfad).....	69
4.3.1 Atividade Antimicrobiana	69
4.3.2 Atividade Antioxidante	73
4.3.3 Atividade anti-inflamatória, citotóxica e hepatóxica	75
CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPETIVAS FUTURAS.....	77
REFERÊNCIAS	79

LISTA DE ABREVIATURAS

µg- Micrograma

µL- Microlitro

AAPH – Dicloridrato de 2,2-azobis(2-amidinopropano)

AGS – Linha de células tumorais do adenocarcinoma gástrico

AGSS - Ácidos gordos saturados

AOAC - Associação Químicos Analíticos Oficiais

ATCC – American Type Culture Collection

BHA – β- hidroxíácido

BHT – Butilhidroxitolueno

CaCo2 – Linha de células tumorais do adenocarcinoma colorretal

CMB – Concentração mínima bactericida

CMF – Concentração mínima fungicida

CMI – Concentração mínima inibitória

CIMO – Centro de Investigação de Montanha

DMEM – Meio Eagle modificado por Dulbecco

DMSO – Dimetilsulfóxido

DPPH – 2,2-difenil-1-picrilhidrazil

FAO - Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura

g- grama

HBBS - Hank's Balanced Salt Solution

HeLa – Linha de células tumorais do carcinoma cervical

HPLC-DAD-ESI-MS/MS – Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada aos detetores de arranjo de díodos e espectrometria de massas com fonte de ionização por eletrospray

Ht₅₀ – Tempo de meia hemólise

IC₅₀– Concentração inibitória média

INT – Cloreto de *p*-iodonitrotetrazólio

kg – Quilograma

LPS- Lipopolissacarídeos

MA- Meio de cultura malte ágar

MCF-7 – Linha de células tumorais do adenocarcinoma de mama

MDA- Malondialdeído

mg – Miligrama

mL-Mililitro

MRSA – *Staphylococcus aureus* resistente à Meticilina

MUFA – Ácido gordo monoinsaturado

NCI-H460 – Linha de células tumorais do carcinoma pulmonar

NO- Óxido nítrico

OMS - Organização Mundial da Saúde

OxHLIA – Inibição da hemólise oxidativa

PBS – Tampão fosfato salino

PLP2 – Cultura primária de células não tumorais do fígado de porco

PUFA- Ácido gordo polinsaturado

RAW 264.7 – Linha de macrófagos de ratos

RPMI-1640 – Meio de cultura *Roswell Park Memorial Institute*

SFA – Ácido gordo saturado

SRB – Sulforodamina B

TABNUT – Tabela de composição química dos alimentos

TBARS – Espécies reativas do ácido tiobarbitúrico

Tr – Tempo de retenção

Tris – Tris(hidroximetil)aminometano

Trolox – Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico

TSB – Meio de cultura *Tryptone Soy Broth*

TWEEN – Tensoativo não iônico

UFC – Unidades formadoras de colónias

USDA- Departamento de Agricultura dos Estados Unidos

UV-Vis – Espectro visível da radiação ultravioleta

vs - Versus

λ_{max} – Comprimento de onda de absorção máxima

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Toranja (<i>Citrus × paradisi</i> Macfad)	15
Figura 2 - "Grapefruit" em amadurecimento na toranjeira	23
Figura 3 - Esquema de corte transversal da toranja (<i>Citrus x paradisi</i> Macfad).....	24
Figura 4 - Estrutura química da naringina (a) e naringenina (b)	28
Figura 5 - Estrutura química do Licopeno ($C_{40}H_{56}$)	29
Figura 6 - Representação esquemática dos objetivos do presente trabalho.....	34
Figura 7 - Especificações contidas na embalagem da toranja no hipermercado	35
Figura 8 - Toranja segmentada - (A) Mesocarpo (B) Casca (C) Polpa	35
Figura 9 - Amostras após serem liofilizadas e trituradas - (A) Polpa (B) Mesocarpo (C) Casca	36
Figura 10 - Determinação de gordura total por Soxhlet.....	37
Figura 11 - Lavagem e filtragem do resíduo para determinação de fibras, e Resíduos após lavagens para determinação de fibras alimentares	38
Figura 12 - Equipamento utilizado para determinação do perfil de ácidos gordos (Sistema GC-FDI modelo DANI 1000)	39
Figura 13 - Equipamento utilizado para determinação do perfil de açúcares livres (HPLC- RI)	40
Figura 14 - Equipamento utilizado para determinação do perfil de ácidos orgânicos (UFLC- PDA).....	41
Figura 15 - Procedimento de agitação constante para extração por maceração à temperatura ambiente.....	43
Figura 16 - Equipamentos utilizados para determinação do perfil fenólico - (HPLC Dionex	

Ultimate 3000 UPLC e Espectrômetro de massa Ion Trap Linear LTQ XL)	44
Figura 17- Microplaca no ensaio da avaliação da atividade antibacteriana. (Bactérias analisadas na figura: Salmonella enterica e Escherichia coli)	46
Figura 18- Microplaca para leitura no ensaio de TBARS	48
Figura 19- Microplaca para leitura no ensaio DPPH.....	49
Figura 20- Representação da reação de DPPH.....	49
Figura 21- Microplaca para leitura do ensaio de atividade anti-inflamatória	52
Figura 22- Microplaca utilizada para avaliação de citotoxicidade contra AGS (adenocarcinoma gástrico).....	54

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1- Classificação dos compostos fenólicos de acordo com a sua estrutura básica....	20
Tabela 2- Composição centesimal da toranja (<i>Citrus x paradisi</i> Macfad) – Valores referentes a 100g da fruta crua, rosa ou pink.....	26
Tabela 3- Rendimento de extração dos extratos de polpa, mesocarpo e casca da toranja (<i>Citrus x paradisi</i> Macfad)	55
Tabela 4- Composição centesimal (g/100 g de massa fresca), valor energético (kcal/100 g de massa fresca), composição em açúcares livres (g/100 g de massa fresca) e ácidos gordos (percentagem relativa) de polpa, casca e mesocarpo da toranja (<i>Citrus x paradisi</i> Macfad)	62
Tabela 5- Ácidos orgânicos (mg/100 g de massa fresca) de polpa, casca e mesocarpo da toranja (<i>Citrus x paradisi</i> Macfad).....	64
Tabela 6- Tocoferóis (mg/100 g de massa fresca) de polpa, casca e mesocarpo da toranja (<i>Citrus x paradisi</i> Macfad)	65
Tabela 7- Quantificação e tentativa de identificação dos compostos fenólicos presentes nos extratos da polpa, casca e mesocarpo da toranja (<i>Citrus x paradisi</i> Macfad)	68
Tabela 8- Resultados da atividade antimicrobiana dos extratos de polpa, casca e mesocarpo da toranja (<i>Citrus x paradisi</i> Macfad)- Concentrações Mínimas Inibitórias (CMI), em mg/mL.	72
Tabela 9- Atividade antioxidante baseada em extratos de polpa, casca e mesocarpo da toranja avaliada por ensaio de TBARS, DPPH e OxLIA	75
Tabela 10- Atividade anti-inflamatória Citotoxicidade e hepatotoxicidade do extrato da polpa, mesocarpo e casca da toranja (<i>Citrus x paradisi</i> Macfad).....	76

INTRODUÇÃO

A toranja, cientificamente conhecida como *Citrus × paradisi* Macfad, é um fruto cítrico amplamente conhecido. Originária das Ilhas Caribenhas dos Barbados, é semelhante à laranja, limão e lima. A toranja é caracterizada pela polpa de cor amarelo-laranja, que varia entre tons de rosa e vermelho, como é mostrado na **Figura 1** (Louzada & Ramadugu, 2021; Sicari et al., 2018; Pereira, 2017). Além de ser apreciada pelo seu sabor ácido e picante, a toranja é uma fruta redonda proveniente de uma árvore de citrinos perene.

A polpa da toranja não fornece apenas vitamina C, mas também é rica em nutrientes como fibras, minerais e hidratos de carbono além de conter metabolitos secundários com propriedades bioativas. Esses compostos estão associados a diversos benefícios para a saúde, incluindo capacidade antioxidante e redução dos níveis de colesterol (Pereira, 2017).



Figura 1- Toranja (*Citrus × paradisi* Macfad) (Fonte: Klimanaturali,2013).

A principal forma de consumo da toranja é através do sumo da polpa, sendo que o mesocarpo e casca são considerados bio-resíduos (Nunes et al.,2009).

De acordo com a definição dada pelo Decreto-Lei n.º 73/2011, 17 de junho, entende-se por bio-resíduos os “resíduos biodegradáveis de espaços verdes, nomeadamente os de jardins, parques, campos desportivos, bem como os resíduos biodegradáveis alimentares e de cozinha das habitações, das unidades de fornecimento de refeições e de retalho e os resíduos similares das unidades de transformação de alimentos” (Ministério do Ambiente e do Ordenamento do

Território, 2011). Na agroindústria, é comum o descarte de cascas, talos e sementes na produção de sumos, néctares, polpas de frutas, doces, entre outros, gerando quantidades elevadas de lixo orgânico, chamando a atenção para o problema ambiental e económico (Alves, 2007).

Os compostos bioativos são as substâncias presentes nos alimentos responsáveis por alguma atividade biológica, sendo encontrados em frutas e verduras, as quais podem proporcionar um benefício para a saúde e/ou prevenir o aparecimento de doenças crónicas (Silva, 2009).

Estudos têm demonstrado que na maioria das frutas, uma proporção significativa de substâncias com atividade biológica são encontradas na casca e não na polpa, e exemplos incluem a casca de frutas cítricas, maçãs, uvas e frutas vermelhas (Barros et al., 2012; Aydeniz-Guneser, 2020).

Além de substâncias bioativas valiosas, a casca e o mesocarpo também são uma fonte muito rica e subestimada de fibra alimentar, que retarda e reduz a absorção de açúcares da fruta (Rafiq et al., 2018). Os bio-resíduos (casca e mesocarpo) podem constituir até 50% da fruta, portanto, seria altamente benéfico utilizar frutas cítricas inteiras no processamento, por exemplo, para geleias, sumos, mousses e néctares (Zema et al., 2018).

Porém, o consumo de cascas, sementes e/ou talos apresentam algumas limitações que devem ser consideradas, nomeadamente a presença de substâncias antinutrientes e/ou metais pesados (Saleh et al., 2017). Os antinutrientes podem fazer parte da classe dos inibidores de proteases, oxalatos, taninos e/ou fitatos que, dependendo da quantidade ingerida, podem tornar o seu consumo um risco para a saúde, no entanto, estudos demonstram que a grande maioria dessas substâncias possuem uma base protéica, possibilitando que o tratamento térmico como secagem e/ou torra, sejam suficientes para eliminar ou inativar tais substâncias (Damiami, Martins & Becker, 2020).

De facto, estudos demonstram que as cascas de frutas acumulam quantidades mais elevadas de metais pesados em comparação com a polpa, o que muitas vezes leva à recomendação de consumir apenas a polpa das frutas (Saleh et al., 2017). No entanto, os níveis de metais pesados encontrados nas cascas,

embora sejam mais altos em relação à polpa, ainda estão abaixo das diretrizes recomendadas pela Organização Mundial da Saúde (OMS, 2012), indicando que o consumo das frutas inteiras pode ser seguro para os consumidores (Czech et al., 2021). De facto, alguns estudos já sugerem o consumo integral de frutas, como kiwi, cenoura e goiaba, a fim de aproveitar todos os benefícios presentes nos seus bio-resíduos (Silveira & Silvestrin, 2019; Oliveira, 2020a).

A fim de se obter mais informações sobre o valor nutricional e efeitos do consumo de bio-resíduos vegetais, estudos têm sido desenvolvidos de forma a comparar e caracterizar as cascas e outros segmentos vegetais que são descartados com as suas respetivas polpas e/ou partes comumente consumidas (Silva, 2015; Czech et al., 2021; Dias et al., 2021). Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi caracterizar e comparar a composição centesimal e química das cascas, mesocarpo e polpa da toranja (*Citrus x paradisi* Macfad), assim como avaliar algumas bioatividades dos extratos obtidos a partir dessas partes.

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 Compostos fenólicos - Caracterização e as suas aplicações nas indústrias alimentar, farmacêutica e cosmética

As plantas possuem um metabolismo primário e secundário. O metabolismo primário é responsável pela síntese de componentes como celulose, lignina, proteínas, lípidos, açúcares e outras substâncias essenciais para suas funções vitais (Soares, 2002). Por outro lado, o metabolismo secundário ocorre durante a fotossíntese, e é resultado de uma evolução das plantas. Ele gera três grupos distintos de metabolitos químicos: terpenos, compostos fenólicos e compostos nitrogenados, desempenhando um papel importante na defesa das plantas contra herbívoros, microrganismos e plantas concorrentes (Nascimento, 2016; Machado et al., 2021).

Os compostos fenólicos são um dos mais numerosos grupos de metabolitos secundários derivados do metabolismo do ácido xiquímico ou pela via do acetato-polimalato (acetil- CoA e malonil-CoA). Tanto o stress biótico quanto o abiótico (alta luz, baixas temperaturas, infecção por agentes patogénicos, deficiência de nutrientes) estimulam os fluxos de carbono das vias metabólicas primárias para as secundárias, induzindo assim um deslocamento dos recursos disponíveis a favor da síntese de metabolitos secundários (Lattanzio, 2013).

Mais de 8000 compostos fenólicos foram identificados até o momento. Esses compostos fazem parte de uma classe de moléculas com uma ampla diversidade estrutural. Eles são caracterizados pela presença de pelo menos um ou mais anéis aromáticos, nos quais estão ligados um ou mais grupos hidroxilo. Essa estrutura pode variar desde moléculas fenólicas simples até compostos altamente polimerizados (Machado et al., 2021). Os compostos fenólicos são responsáveis pelas propriedades de cor, sabor e aroma dos alimentos de origem vegetal, como frutas, cereais, bebidas e plantas, além de possuírem propriedades tecnológicas e funcionais importantes para os alimentos (Giada, 2013).

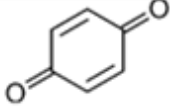
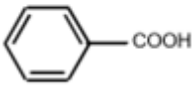
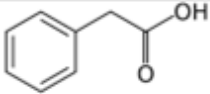
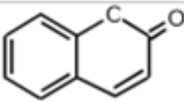
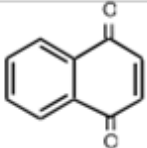
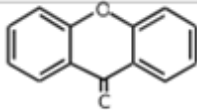
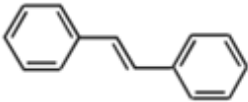
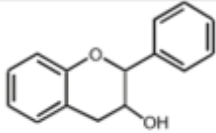
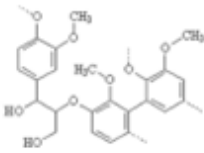
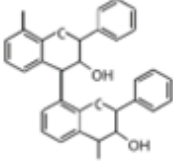
A classificação dos compostos fenólicos nos diferentes subgrupos pode ser feita de várias maneiras devido à complexidade desses compostos. O autor Sánchez-Moreno (2002) classificou-os em dois grandes grupos: de acordo com a distribuição na natureza ou de acordo com a localização nas plantas.

Seguindo a distribuição na natureza, podem ser destacados três grandes grupos: i) Baixa ocorrência: hidroquinonas, resorcinol, aldeídos derivados de ácidos benzóicos que compõem óleos essenciais; ii) Amplamente distribuídos: fenólicos simples, flavonóides e os seus derivados, cumarinas, ácidos fenólicos; iii) Polímeros: taninos e ligninas.

Seguindo a classificação com base na localização dos compostos nas plantas, podem ser encontradas duas categorias: i) Solúveis: fenólicos simples, flavonóides e taninos de baixo a médio peso molecular, não ligados a componentes da membrana; ii) Insolúveis: taninos condensados, ácidos fenólicos e outros compostos fenólicos de baixo peso molecular, ligados a polissacarídeos e proteínas da parede celular, formando complexos insolúveis estáveis (Sánchez-Moreno, 2002).

Outra forma muito utilizada na literatura para a classificação dos compostos fenólicos é com base no número de carbonos constituintes, juntamente com a estrutura básica do composto, classificando-os em 10 classes diferentes, conforme apresentado na **Tabela 1** (Pereira & Angelis-Pereira, 2014).

Tabela 1- Classificação dos compostos fenólicos de acordo com a sua estrutura básica.

Esqueleto básico	Exemplo de estrutura química	Classe
C6		Fenólicos simples, benzoquinonas
C6-C1		Ácidos fenólicos
C6-C2		Ácidos fenilacéticos
C6-C3		Ácidos hidroxicinâmicos, fenilpropenos, cumarinas, cromonas
C6-C4		Naftoquinonas
C6-C1-C6		Xantonas
C6-C2-C6		Estilbenos, antaraquinonas
C6-C3-C6		Chalconas, flavonoides
(C6-C3) _n		Ligninas e lignanas
(C6-C3-C6) _n		Polifenóis

(Fonte: Adaptado de Pereira & Angelis-Pereira, 2014).

Atualmente os compostos fenólicos estão naturalmente presentes na dieta, através do consumo de frutas, vegetais, chás, entre outros (Moo-Huchin et al., 2015). Estudos epidemiológicos, clínicos e *in vitro* mostram múltiplos efeitos biológicos relacionados aos compostos fenólicos presentes na alimentação, tais como redução de peso corporal, diminuição dos níveis de açúcar no sangue, atividades antioxidante, anti-inflamatória, antimicrobiana e anticarcinogénica (Pereira-Netto, 2018).

O processo respiratório e diversas reações oxidativas que ocorrem nas células aeróbias levam à formação de radicais livres que podem causar danos ao organismo e contribuir para o desenvolvimento de muitas doenças (inflamações diversas, cancro, doença de Alzheimer e doenças cardiovasculares), além de poderem potenciar o processo de envelhecimento. Desta forma, as células humanas dependem de alguma capacidade antioxidante para fornecer proteção contra os efeitos prejudiciais dos radicais livres e de espécies reativas de oxigénio, que são consequências inevitáveis da vida aeróbia (Soutinho, 2012).

Tendo em consideração esses fatores, a identificação de compostos antioxidantes, como substâncias que quando presentes em baixas concentrações em comparação à concentração de uma substância que sofre oxidação retardam ou inibem a velocidade de oxidação de biomoléculas, tem despertado grande interesse, uma vez que tais compostos podem manter o equilíbrio dinâmico entre a produção de oxidantes e a concentração de compostos antioxidantes, minimizando danos oxidativos no organismo (Rockenbach, 2008).

Nos alimentos, a oxidação lipídica e a auto-oxidação são reações indesejadas que causam deterioração da qualidade, redução do prazo de validade, perda de valor nutricional e alterações nos atributos organolépticos (Das et al., 2016). Na indústria alimentar, são utilizados antioxidantes sintéticos para inibir essas reações, tais como butil-hidroxi-anisol (BHA), butil-hidroxi-tolueno (BHT) e terc-butil-hidroxiquinona (TBHQ). Estudos toxicológicos têm demonstrado a possibilidade desses antioxidantes apresentarem algum efeito tóxico (Pokorný, 2007; Abdel-Samie & Abdulla, 2016)."

Considerando os potenciais problemas associados ao consumo de antioxidantes sintéticos, as pesquisas têm-se concentrado em encontrar produtos naturais com atividade antioxidante, a fim de oferecer alternativas aos antioxidantes sintéticos ou estabelecer combinações entre eles, visando reduzir a sua quantidade nos alimentos (Albuquerque, 2021). A maioria dos estudos tem-se concentrado nos compostos fenólicos de origem vegetal, pois eles atuam como captadores de radicais livres, interrompendo reações em cadeia desencadeadas por esses radicais, além de atuarem nos processos oxidativos catalisados por metais (Soares, 2002; Das et al., 2016; Caleja et al., 2016).

Para a comercialização e desenvolvimento de novos alimentos que utilizam ingredientes funcionais e naturais, a indústria alimentar deve considerar uma variedade de fatores, como a aceitação sensorial, o preço, a estabilidade, as propriedades químicas e organolépticas, entre outros. Portanto, acredita-se que o sucesso dessa categoria de alimentos requer a colaboração entre diversos setores, como ciência, indústria, mercado, comunicação social, educação e políticas governamentais (Dias, 2019).

1.2 Caracterização da toranja (*Citrus × paradisi* Macfad)

1.2.1 Etimologia e aplicações

A toranja é um fruto originário das Ilhas Caribenhas dos Barbados, foi inicialmente descrita, no ano de 1837, pelo botânico James Macfadyen que a denominou *Citrus paradisi* Macfad (Citrino paradisíaco Macfad). Foram desenvolvidos e documentados diversos estudos sobre este fruto, tendo sido sugerida a teoria de que o mesmo deriva da hibridação de dois outros frutos: o pomelo (*Citrus maxima*) e a laranja doce (*Citrus sinensis*) (Pereira, 2017).

Também é conhecida como “Grapefruit” em alguns países, principalmente da América do Norte e Central, nome que é atribuído pois os frutos amarelos brilhantes amadurecem num formato que lembram os cachos de uvas (**Figura 2**) (Kelebek, 2010).

A toranjeira é uma árvore tropical, de porte médio, de aproximadamente 4 a 6 metros, porém pode chegar até a 15 metros de altura com tronco vigoroso. As suas folhas são longas e verde-escuras com grandes flores brancas, que se assemelham às flores da laranjeira (Carvalho, 2003).



Figura 2 - "Grapefruit" em amadurecimento na toranjeira (Fonte: Pereira, 2017).

A fruta apresenta uma coloração característica, com a parte externa em tom amarelo- alaranjado e textura esfolada, enquanto a polpa varia em cores, dependendo do tipo de cultivo, pode ser branca, rosada ou avermelhada. Possui um sabor único que combina características ácidas, amargas e doces (Melo, 2012).

A **Figura 3** esquematiza a secção transversal da fruta, mostrando as diferentes camadas da parte mais externa até à parte mais interna. Essas camadas são as seguintes: a) uma película fina que pertence às células da epiderme e que contém os estomas; b) o epicarpo também conhecido como flavedo ou casca, composto por tecido parenquimatoso rico em pigmentos (cloroplastos ou cromoplastos); c) o mesocarpo ou albedo, um tecido parenquimatoso composto por células irregulares e esponjosas, de cor branca, separadas por bolsas de ar; d) o endocarpo, que é a parte comestível do fruto, composto por partes que possuem vesículas com paredes muito finas onde se encontra o sumo. Essas partes são cobertas por uma membrana carpelar e estão distribuídas ao redor do eixo central que possui a mesma composição do albedo; e) as sementes, que estão localizadas ao redor do eixo central e estão inseridas no endocarpo (Silva, 2010).

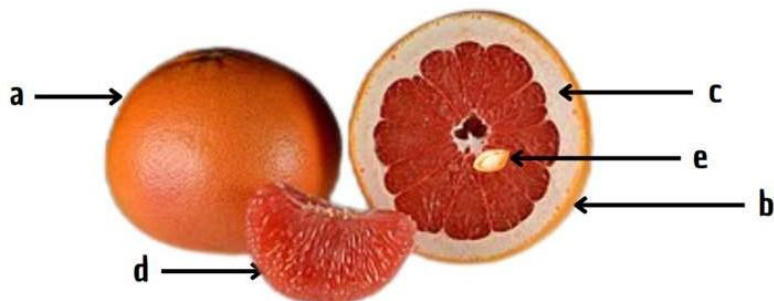


Figura 3- Esquema de corte transversal da toranja (*Citrus x paradisi* Macfad)

Legenda: (a) película, (b) casca, (c) mesocarpo, (d) polpa, (e) sementes

(Fonte: Adaptado Silva, 2010).

Na casca da toranja, há numerosas glândulas com óleos essenciais, com formas esféricas e tamanhos variados, que se destacam na superfície da fruta. O mesocarpo, parte interna da casca apresenta uma coloração esbranquiçada ou amarela claro e uma textura esponjosa com espessura ligeiramente grossa. Tanto o flavedo como o albedo, são normalmente considerados partes não comestíveis do fruto. A parte comestível da toranja é composto pelo endocarpo (gomos), com vacúolos cobertos com uma película muito fina, conhecida com membrana carpelar (Dugo & Di Giacomo, 2002).

A toranja é o 6º citrino mais consumido no mundo, ficando atrás apenas da laranja, tangerina, lima, limão e mandarina (USDA, 2023).

Entre os maiores produtores de toranja no mundo destacam-se a China, Estados Unidos, Tailândia, África do Sul e México, sendo a Espanha um destaque na Europa. Em 2021 foram produzidas mais de 8,4 milhões de toneladas da fruta e a China liderou como o maior produtor de toranja, sendo responsável por mais de 50% da produção mundial (FAO, 2021). A China e os Estados Unidos também são os principais consumidores da fruta, com um consumo superior a 5 mil toneladas de toranja na China em 2021 (USDA,2021).

A toranja, pode ser comida crua, à mão, ou até separada em gomos e adicionada a saladas de fruta, pode ser espremida para fazer sumos naturais ou concentrados e inclusive, pode ser utilizada na confecção de geleias e compotas (Mohammed et al. 2022). Apesar do seu sabor amargo, tem enorme sucesso e hoje é muito consumida ao pequeno-almoço sob a forma de sumo (Pereira, 2017).

A casca da toranja também é amplamente utilizada para extrair o óleo

essencial, que tradicionalmente é utilizado no combate à celulite e para estimular o sistema linfático. Além disso, o óleo essencial da toranja tem efeitos positivos no humor, estimula a mente e o sistema digestivo, além de ajudar a limpar a pele com acne. Também é frequentemente usado para promover o crescimento capilar (Deng et al., 2020).

1.2.2 Composição, centesimal, química e propriedades bioativas

A alimentação constitui a fonte de cerca de quarenta nutrientes para os seres humanos e, entre os diferentes nutrientes essenciais à alimentação humana, podemos citar os hidratos de carbono, lípidos, aminoácidos, sais minerais e vitaminas como principais componentes da composição centesimal de um alimento (Neto, 2010).

De acordo com Silva (2010), a composição química das toranjas é influenciada por diversos fatores, como as condições de crescimento, tratamentos realizados, grau de maturação, variedade do fruto e clima. No entanto, é possível considerar os constituintes descritos na **Tabela 2**.

Tabela 2- Composição centesimal da toranja (*Citrus x paradisi* Macfad) – Valores referentes a 100g da fruta crua, rosa ou pink.

Informações Nutricionais em 100g de produto fresco			
Valor Energético	42 kcal	Vitamina C (total em ácido ascórbico)	31.2 mg
Água	88.1g	Vitamina E (alfa tocoferol)	0.13 mg
Hidratos de carbono	10.7g	Ácidos gordos saturados	0.021g
Fibras	1.6g	SFA 16:0	0.018g
Proteínas	0.77g	SFA 18:0	0.002g
Gorduras totais	0.14g	Ácidos gordos monoinsaturados	0.02g
Cinzas	0.36g	MUFA 16:1	0.002g
Açúcares	6.89g	MUFA 18:1	0.018g
Sacarose	3.51g	Ácidos gordos polinsaturados	0.036g
Glicose	1.61g	PUFA 18:2	0.029g
Frutose	1.77g	PUFA 18:3	0.008g

SFA 16:0- Ácido palmítico; SFA 18:0 - Ácido esteárico; MUFA 16:1 – Ácido palmitoleico; MUFA 18:1-Ácido oleico; PUFA 18:2- Ácido linoleico; PUFA 18:3- Ácido linolénico. (**Fonte:** USDA, 2019a).

Reconhecida como um alimento funcional, é valorizada em certas culturas pelos seus benefícios para a saúde. É caracterizada por apresentar baixa densidade energética, além de ser uma excelente fonte de fibras, o que contribui para a boa saúde digestiva e proporciona sensação de saciedade. Uma característica importante da toranja é a presença de gordos ômega-3 (PUFA 18:3) e ômega-6 (PUFA 18:2) (Soriano et al., 2022), que são gorduras essenciais para o organismo. Esses ácidos gordos desempenham papéis fundamentais em diversas funções, incluindo a promoção da saúde cardiovascular e cerebral (Saini et al., 2018).

Outro componente benéfico presente nesta fruta é a vitamina E (na isoforma alfa tocoferol). A vitamina E é um micronutriente essencial e um poderoso antioxidante que desempenha um papel de proteção dos tecidos contra a peroxidação lipídica descontrolada, mostrando resultados promissores na prevenção secundária de doenças cardiovasculares, complicações imunológicas e hematológicas (Galli et al., 2022).

Além disso a toranja pode ser considerada uma fonte rica de Vitamina C, uma vez que, meia porção da fruta contém cerca de 31% da necessidade diária de um adulto saudável conforme recomendado pela Organização Mundial da Saúde (2004).

A vitamina C, também conhecida como ácido ascórbico desempenha um papel crucial na função imunológica, na síntese de colagénio, na absorção de ferro e na manutenção da saúde da pele (Adnan, 2022).

Estudos demonstram que os sumos da toranja podem ser aplicados como uma fonte de compostos funcionais, ou como conservantes naturais, uma vez que contêm uma boa correlação entre teores de polifenóis totais, flavonóides, antocianinas e teores de ácido ascórbico com a capacidade antioxidante (Sicari et.al., 2018; Soriano et al.,2022).

Os frutos cítricos possuem essencialmente quatro tipos de flavonóides, sendo que na toranja se destacam as flavanonas (cerca de 98%) e quantidades menores de flavonas, flavonóis e antocianinas (Ross & Kasum, 2002). A estrutura das flavanonas difere da de outros flavonóides devido à existência de um carbono quiral na posição C2 e nenhuma substituição na posição C3, esses compostos demonstram potente atividade antioxidante que depende do número e configuração de grupos hidroxilo funcionais, responsáveis pela eliminação de radicais livres e atividades quelantes de iões metálicos (Stabrauskiene et al., 2022).

A naringenina (**Figura 4**), é reconhecida como a principal flavanona da toranja e encontrada principalmente na forma de glicosídeo (4',5,7-trihidroxi-flavanona-7-ramnoglicosídeo), nomeadamente naringina (Salehi et al.,2019). As diferentes formas dessa flavanona são responsáveis pelo sabor amargo característico na toranja. Além disso, a naringenina possui inúmeros efeitos farmacológicos reconhecidos sendo um dos mais importantes a sua ação neuroprotetora em casos de neurodegeneração (Ross & Kasum, 2002).

Estudos recentes têm demonstrado a capacidade regenerativa da naringenina complexada com β -ciclodextrina no tecido nervoso. Em estudos *in vivo*, foi observado que tanto a naringenina quanto a naringina utilizam diversos

mecanismos para reduzir a apoptose celular e os marcadores inflamatórios, incluindo o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e a interleucina-1 beta (IL-1 β) (Todoric et al., 2016; Ginwala et al., 2019). A naringenina juntamente com a hesperidina e a rutina, apresenta a capacidade de modular o metabolismo lipídico e da glicose. Essa propriedade tem sido demonstrada em modelos animais com diabetes tipo 2, nos quais a naringenina mostrou melhorar a hiperlipidemia e a hiperglicemia. Além disso, ela tem a capacidade de regular diversas vias de sinalização envolvidas na patogênese da obesidade e síndrome metabólica. Esses efeitos podem auxiliar na perda de peso e na redução de variáveis lipídicas, com destaque para a redução do colesterol LDL (Louzada & Ramadugu, 2021).

Um estudo realizado por Dallas et al. (2014) demonstrou que 12 semanas após a administração de extrato de *Citrus* contendo 20% de naringenina em 95 voluntários com sobrepeso (47 foram disponibilizados com placebo para controle), houve redução da circunferência abdominal, gordura abdominal total e peso corporal naqueles em que foi administrado o extrato de *Citrus* comparativamente ao grupo controle. Além disso, os marcadores inflamatórios e de stress oxidativo diminuíram, e os painéis de rim, fígado e lípidos permaneceram inalterados.

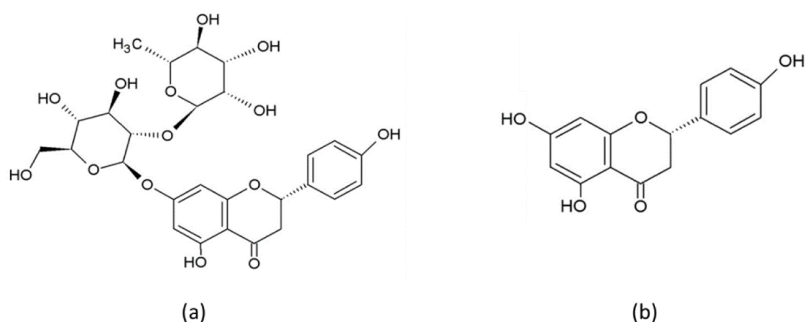


Figura 4- Estrutura química da naringina (a) e naringenina (b) (Fonte: Stabraukiene et al., 2022).

O *Citrus x paradisi* Macfad também é rico em licopeno (Figura 5), cuja estrutura consiste numa cadeia longa de ligações duplas carbono-carbono alternadas (Periago et al., 2001). O licopeno representa um carotenóide com

importante atividade antioxidante e os benefícios para a saúde dos alimentos ricos neste composto são numerosos (Fernández-Ruiz et al., 2007).

Num estudo realizado por Silva et. al. (2018) o licopeno de tomate inibiu uma forma agressiva de cancro da próstata em ratos. Os efeitos antiplaquetários e antiapoptóticos do licopeno reduzem a rigidez arterial tornando-o um eficaz agente antiaterosclerótico, antioxidante, anti-inflamatório e anti-hipertensivo capaz de diminuir a incidência de enfartes do miocárdio (Pereira et al., 2012).

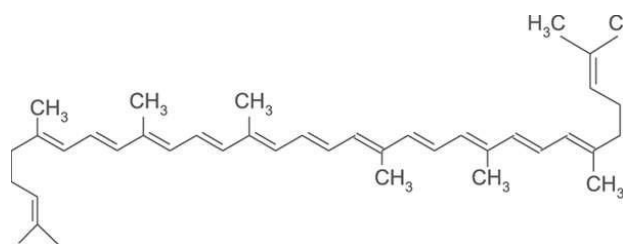


Figura 5 - Estrutura química do Licopeno ($C_{40}H_{56}$) (Fonte: Periago et al., 2001).

O monoterpene maioritário encontrado na casca da toranja foi o limoneno (91,5%). O limoneno além, de propriedades anti-inflamatórias, antioxidantes e anticarcinogénicas, também apresenta propriedades antimicrobianas, com capacidade de inibir bactérias como: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e bactérias da família *Enterobacteraceae* (Deng et al., 2020). O óleo da casca do *Citrus x paradisi* Macfad tem sido muito estudado, por possuir um aroma forte e desejável, além de apresentar propriedades bioativas, entretanto, os óleos essenciais podem apresentar toxicidade elevada e não serem passíveis de incorporação em produtos alimentares (Santos, 2019; Houda et al., 2020). Portanto, no presente estudo será utilizada a casca da toranja para obtenção de um extrato hidroetanólico rico em compostos de interesse e que não apresente toxicidade.

Um facto importante é a capacidade da toranja de interagir com alguns medicamentos, uma vez que um constituinte não identificado da toranja inibe o Citocromo P450 3A4 (enzima importante em mamíferos, pois oxida

medicamentos, toxinas, alimentos e xenobióticos) (Bailey et al., 2013). Num estudo realizado por Hanley et al. (2011) o consumo do sumo da toranja em conjunto com o medicamento felodipina (utilizado para tratar hipertensão), notou-se um aumento das concentrações plasmáticas do medicamento, causando aumento da frequência cardíaca e redução da pressão arterial diastólica.

Da mesma forma, a administração paralela do sumo com midazolam alterou os testes de desempenho psicométrico, enquanto com nisoldipina ou nitrendipina houve aumento da frequência cardíaca (Aronson, 2016). Tanto na toranja inteira quanto no sumo da toranja os efeitos foram identificados e por essa razão nos produtos resultantes desta fruta deve ser usado um rótulo de advertência para alertar os pacientes sobre potenciais interações medicamentosas (Chin & Baskin, 2012; Aronson, 2016).

1.2.3 Bio-resíduos da toranja (*Citrus x Paradisi Macfad*) como fontes de compostos bioativos e aplicação potencial nas diferentes indústrias

As indústrias de processamento de sumos utilizam especialmente as polpas das frutas cítricas e as suas cascas e mesocarpo constituem o principal resíduo, pois representam cerca de 50% da totalidade da fruta (Zema et al., 2018). Geralmente, estas indústrias secam os resíduos e vendem-nos para extração de pectina ou para ração animal, contudo nenhum destes processos é muito rentável, uma vez o custo de secagem e transporte para esse fim é um fator economicamente limitante (Valente, 2015).

Estes poderiam ter outras utilidades, pois grande parte do resíduo sólido tem composição química que inclui quantidades elevadas de compostos antioxidantes naturais e/ou de outros compostos de interesse biológico e/ou sensorial, tais como compostos fenólicos, pigmentos, fibras, vitaminas e sais minerais (Santos, 2019). Um exemplo são as sementes de citrinos que são uma fonte inexplorada de óleo não volátil que pode alcançar até 55% de rendimento além de conter compostos de interesse científico (Fernandes et al., 2002).

Estudos realizados com bio-resíduos de citrinos mostram que estes

produtos têm altas concentrações principalmente de fibras, vitaminas e minerais como cálcio, ferro e magnésio, podendo assim constituir fonte para a ingestão diária desses elementos, e uma vez que é um resíduo de baixo custo, se pode planejar e estudar a possibilidade da sua adição na alimentação humana (Silva & Pallone, 2017). Autores que analisaram a polpa e a casca da toranja separadamente reportaram que a casca contém proximamente 21% e 110% a mais de ferro e magnésio quando comparado a polpa, respectivamente (Czech et al., 2020).

A utilização de resíduos cítricos é uma opção viável para a produção de alimentos (Szanto & Rondon, 2021). Estudos têm mostrado que a adição de fibras derivadas das cascas, farinhas do albedo, flavedo e sementes em pães, bolos, biscoitos, barras de cereais e gelados resultou, na maioria dos casos, em melhorias nas características físico-químicas, capacidade antioxidante, presença de compostos bioativos e atributos sensoriais dos alimentos elaborados (Amaral et al., 2021). Além disso, essa prática contribui para a redução do desperdício alimentar.

A incorporação de ingredientes bioativos nos alimentos oferece uma vantagem adicional, além dos benefícios já mencionados: os produtos podem ser rotulados como "rótulos limpos". Isso desperta um grande interesse na indústria e, principalmente, nos consumidores, que estão cada vez mais preocupados com a qualidade dos alimentos que consomem (Menezes, 2020). Essa tendência reflete a procura por produtos naturais e saudáveis, e a inclusão de ingredientes bioativos permite atender a essa demanda crescente.

2. OBJETIVOS

Neste trabalho o objetivo proposto foi a caracterização química e nutricional da casca, mesocarpo e polpa da toranja (*Citrus × paradisi* Macfad), assim como a obtenção de extratos ricos em compostos fenólicos e avaliação das bioatividades dos mesmos, a fim de selecionar um bio-resíduo que pode ser utilizado para posterior incorporação na indústria alimentar. O plano de trabalho encontra-se esquematizado na **Figura 6**.

Para além dos objetivos principais, como objetivos específicos temos:

- i) Separação e liofilização das diferentes partes da toranja (polpa, casca e mesocarpo).
- ii) Determinação da composição centesimal e valor energético da casca, mesocarpo e polpa da toranja: proteínas, lípidos, cinzas, hidratos de carbono e fibras.
- iii) Obtenção do extrato hidroetanólico a partir da amostra liofilizada das diferentes partes da toranja.
- iv) Determinação da composição química de cada parte da toranja através da quantificação de açúcares livres, ácidos orgânicos, tocoferóis e ácidos gordos.
- v) Caracterização e quantificação dos compostos fenólicos por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um detetor de díodos e a um detetor de espectrometria de massa com uma fonte de ionização por espalhamento de eletrões (HPLC-DAD-ESI/MS).
- vi) Avaliação das bioatividades dos extratos obtidos a partir da casca, mesocarpo e polpa da toranja:
 - Potencial antioxidante por diferentes ensaios in vitro: inibição da peroxidação lipídica através de espécies reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS), atividade anti-hemolítica através de ensaio de inibição da hemólise oxidativa - (OxHLIA) e determinação do efeito bloqueador dos radicais livres 2,2-

difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH).

- Potencial citotóxico em linhas celulares tumorais humanas, e potencial hepatotóxico em culturas primárias de células de fígado de porco (não tumorais PLP2), pelo método da sulforrodamina B (SRB).
- Atividade antibacteriana avaliada pelo método colorimétrico por microdiluição utilizando como marcador o INT (cloreto de iodonitrotetrazólio) e atividade antifúngica pelo método de microdiluições sucessivas.
- Atividade anti-inflamatória em células de macrófagos RAW 264.7 de rato.

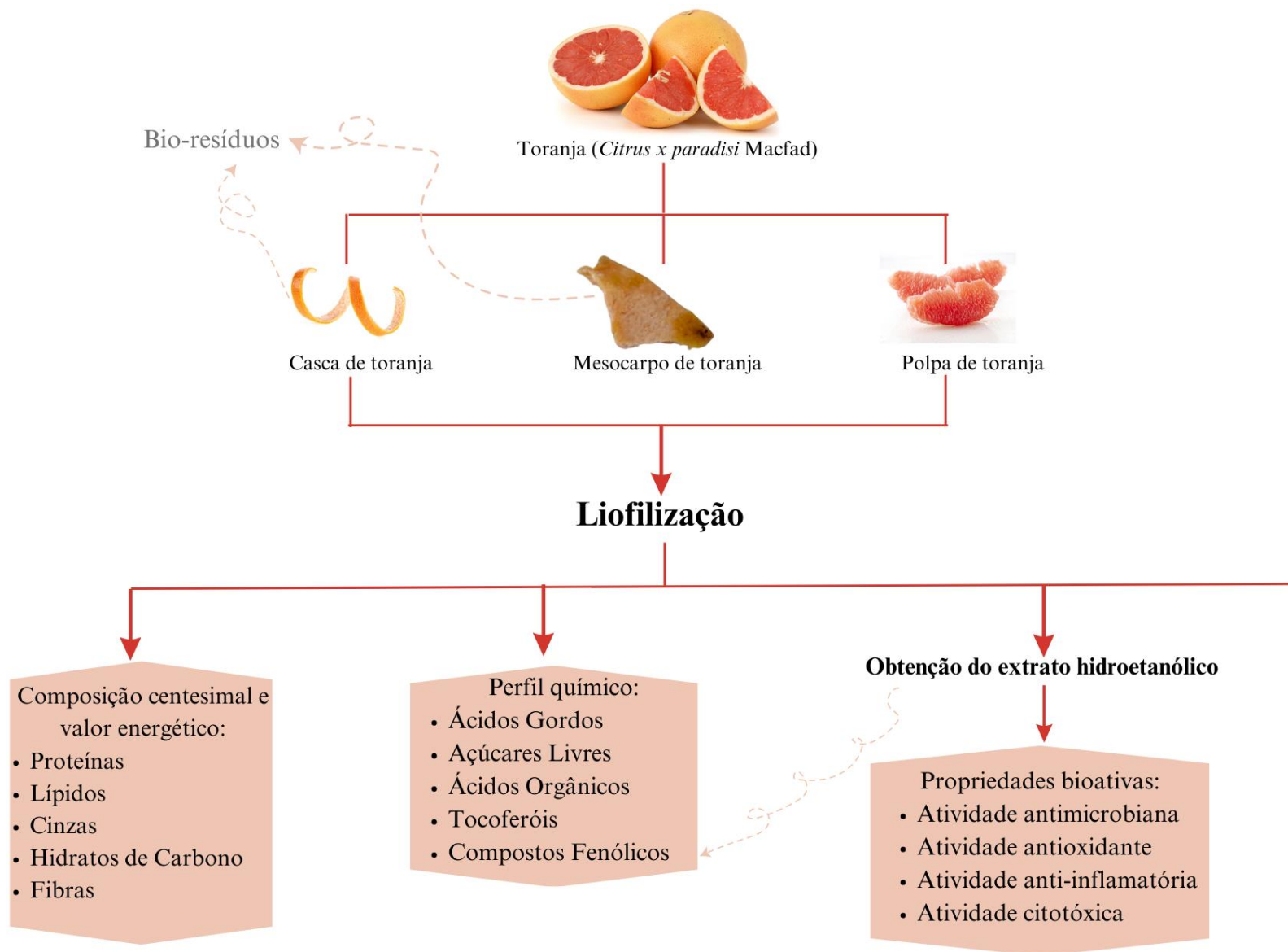


Figura 6 - Representação esquemática dos objetivos do presente trabalho.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Amostra

Foram adquiridas numa única compra aproximadamente um quilograma e meio de toranjas (*Citrus × paradisi* Macfad). A compra foi realizada no hipermercado Pingo Doce Bragança– Zona Industrial, localizado na cidade de Bragança- PT. O produto é distribuído pela Henrique Fiel Lourenço LDA. O fruto foi importado da Espanha no dia 21/02/2022 e foi adquirido no dia 24/02/2022 e pertence à variedade Star Ruby (**Figura 7**).



Figura 7- Especificações contidas na embalagem da toranja no hipermercado (**Fonte:** Kayane Soares, 2022).

3.2 Preparação da amostra

As toranjas foram higienizadas e divididas em quatro partes a fim de realizar a separação entre a casca (epicarpo), a polpa (endocarpo) e o mesocarpo (**Figura 8**).

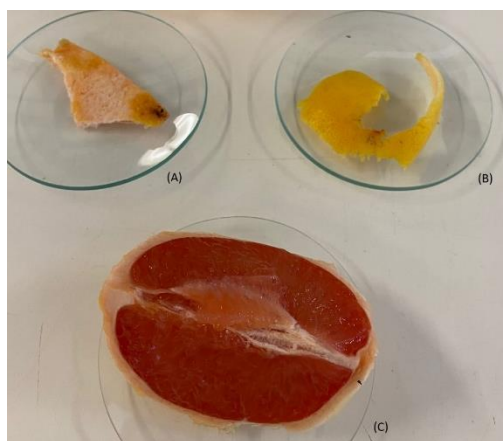


Figura 8- Toranja segmentada - (A) Mesocarpo (B) Casca (C) Polpa (**Fonte:** Kayane Soares, 2022).

Cada uma das porções foi submetida ao processo de liofilização até a desidratação evidente. O mesocarpo apresentou desidratação evidente num período aproximado de 10 dias, a polpa e a casca levaram aproximadamente 14 dias para a completa liofilização.

Após a liofilização, as amostras foram trituradas o mais finamente possível e armazenadas em local seco e ao abrigo de luz. A polpa apresentou coloração vermelho-rosada e textura açucarada; O mesocarpo teve uma textura fina e coloração laranja esbranquiçada; A casca teve coloração amarelada e textura fina com leves grumos (**Figura 9**).

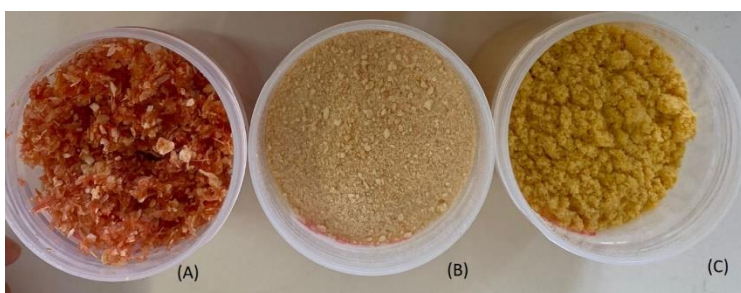


Figura 9 - Amostras após serem liofilizadas e trituradas - (A) Polpa (B) Mesocarpo (C) Casca (**Fonte:** Kayane Soares, 2022).

3.3 Determinação da composição centesimal e do valor energético dos resíduos e da polpa da toranja (*Citrus × paradisi Macfad*)

A partir dos resíduos e da polpa liofilizada, foi avaliada a composição em macronutrientes (proteínas, lípidos, cinzas e hidratos de carbono), humidade e valor energético conforme os métodos oficiais de análise (AOAC, 2019). O teor de humidade foi avaliado com base na diferença de massa obtida antes e depois da liofilização. O teor de proteínas totais foi estimado pelo método macro-Kjeldahl por conversão do azoto total utilizando o fator de conversão ($N \times 6,25$). A gordura total foi determinada através da

extração de uma massa conhecida da amostra com éter de petróleo, utilizando-se o aparelho de Soxhlet (**Figura 10**).



Figura 10 - Determinação de gordura total por Soxhlet. (Fonte: Kayane Soares, 2022).

O teor de cinzas foi determinado a partir incineração numa mufla a 600 ± 15 °C durante 5 horas. Os hidratos de carbono foram calculados por diferença (**Equação 1**). A energia foi calculada com base no sistema de Atwater com modificações tendo em consideração o teor de fibras alimentares (**Equação 2**).

$$\text{Hidratos de Carbono} = 100 - (\text{humidade} + \text{cinzas} + \text{proteínas} + \text{lipídios})$$

Equação 1- Equação para cálculo de hidratos de carbono presente na amostra

$$\begin{aligned} \text{Energia (kcal)} = & 4x (\text{g proteínas} + (\text{g hidratos de carbono} - \text{g de fibras alimentar})) \\ & + 9x (\text{g lipídios}) + 2x (\text{g fibras alimentares}) \end{aligned}$$

Equação 2- Equação para cálculo de Energia (kcal) total na amostra

A determinação do teor de fibras dietéticas solúveis e insolúveis foi feita como descrito por Chahdoura et al. (2015), utilizando-se uma combinação de métodos enzimáticos e gravimétricos. As amostras liofilizadas e isentas de gordura foram gelatinizados com α -amílase (estável ao calor) e digeridos totalmente com proteases e amiloglucosidasas para remover a proteína e o amido presentes na amostra. Adicionou-

se etanol para precipitar a fibra dietética solúvel. O resíduo foi filtrado e lavado com etanol e acetona (**Figura 11**). Após a secagem, pesou-se o resíduo. Metade das amostras foram analisadas para proteínas e as restantes são incineradas. A fibra alimentar total foi calculada como a diferença entre o peso do resíduo e o peso da proteína e das cinzas. Os resultados foram expressos em g/100 g de amostra liofilizada.

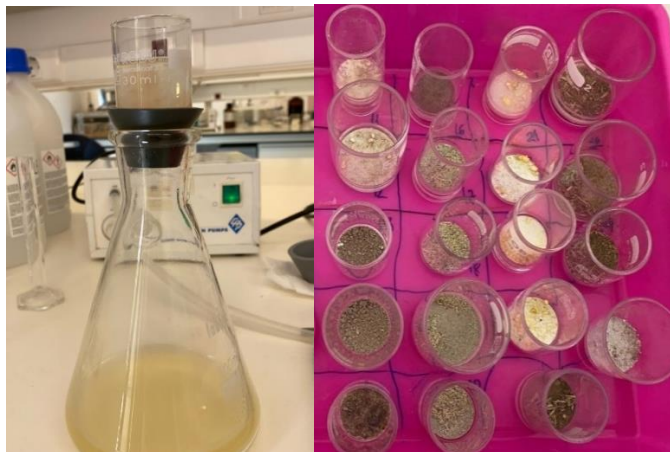


Figura 11- Lavagem e filtragem do resíduo para determinação de fibras, e Resíduos após lavagens para determinação de fibras alimentares (**Fonte:** Kayane Soares, 2022).

3.4 Determinação da composição química dos resíduos e da polpa da toranja **(*Citrus × paradisi Macfad*)**

3.4.1 Ácidos gordos

O perfil de ácidos gordos foi determinado conforme a metodologia descrita por Pereira et al. (2014) com base na utilização de cromatografia gasosa com detecção por ionização em chama (GC-FID). A massa resultante da extração por Soxhlet foi misturada com 5 mL de metanol/ácido sulfúrico/tolueno (2:1:1, v/v/v) durante 12 horas num banho a 50 °C a 160 rotações por min (rpm), em seguida foram adicionados 3 mL de água destilada para a obtenção das diferentes fases.

Os FAMES (ésteres metílicos de ácidos gordos) foram recuperados com 3 mL de éter etílico com agitação em vortéx. Para eliminar qualquer resíduo de água, o

sobrenadante foi submetido a uma microcoluna de sulfato de sódio anidro, recuperou-se então a amostra para um vial com tampa contendo membrana de teflon e filtrou-se utilizando um filtro de nylon 0,2 µm Milipore. O perfil de ácidos gordos foi obtido num sistema GC modelo DANI 1000 (**Figura 12**) equipado com um injetor split/splitless, detetor de ionização em chama (FID), com detetor a 260 °C e uma coluna Macherey Nagel (30 m × 0,32 mm × 0,25 µm df).

Foi utilizado o seguinte programa de temperatura do forno: temperatura inicial de 80 °C, mantida por 1,5 min, aumentar 40 °C/min até 160 °C, seguido de uma rampa de 5 °C/min até 185 °C, 30 °C/min rampa até 260 °C e mantida por 4 min. A vazão do gás carreador (hidrogénio) foi 0,6 mL/min, medido a 250 °C. A identificação e quantificação de ácidos gordos foi realizada comparando os tempos de retenção relativos de picos de FAME de amostras com padrões (mistura padrão 47885-U, Sigma, St. Louis, EUA) e os resultados foram registados e processados usando o Software Clarity DataApex 4.0 Software (Praga, Checa República) e expressa em percentagem relativa de cada ácido gordo.



Figura 12- Equipamento utilizado para determinação do perfil de ácidos gordos (Sistema GC-FDI modelo DANI 1000) (**Fonte:** Kayane Soares, 2022).

3.4.2 Açúcares livres

A determinação dos açúcares livres foi realizada com base na metodologia descrita por Barros et al. (2013a) utilizando um sistema de HPLC com detetor de índice

de refração (HPLC-RI) (**Figura 13**). Foi adicionado 1 mL de padrão interno (melezitose, 25 mg/mL) a aproximadamente 1g de amostra liofilizada e posteriormente procedeu-se à extração com 40 mL de etanol 80% a 80 °C durante 1h 30 min com agitação a cada 15 minutos. Em seguida, procedeu-se à filtração e evaporação do etanol e o sobrenadante obtido foi lavado três vezes sucessivas com 10 mL de éter dietílico. Após concentração a 40 °C, o resíduo sólido foi redissolvido em água destilada para um volume final de 5 mL. Após filtração com filtros de nylon de 0,2 µm para vials, procedeu-se à análise por HPLC-RI a 35 °C utilizando um sistema de HPLC (Knauer Smartline) equipado com um detetor de RI (Knauer Smartline 2300) e com uma coluna 100-5 NH2 Eurospher (4,6 × 250 mm, 5 µm, Knauer). A fase móvel utilizada foi acetonitrilo/água desionizada (70:30, v/v) com um caudal de 1 mL/min. A identificação dos açúcares foi realizada usando o método do padrão interno e por comparação cromatográfica com padrões comerciais. Os resultados foram expressos em g por 100 g de massa fresca.



Figura 13- Equipamento utilizado para determinação do perfil de açúcares livres (HPLC-RI) (**Fonte:** Pires, 2022).

3.4.3 Ácidos orgânicos

Os ácidos orgânicos foram determinados por cromatografia líquida ultrarrápida com detetor de díodos (UFLC-PDA) (**Figura 14**), conforme a metodologia descrita por Barros et al. (2013b). Adicionou-se 25 mL de ácido metafosfórico a 1 g de amostra liofilizada procedendo-se à extração em agitação magnética durante 20 minutos (25 °C a 150 rpm). As soluções obtidas foram filtradas através de papel Whatman N° 4 e

seguidamente através de filtros de nylon de 0,2 µm (Millipore) para vials. Os ácidos orgânicos foram analisados utilizando um sistema Shimadzu 20A series UFLC (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) equipado com uma coluna de fase reversa C18 SphereClone (Phenomenex, 5 µm, 250 × 4,6 mm), termostaticada a 35 °C. A eluição foi realizada com ácido sulfúrico 3,6 mM usando um caudal de 0,8 mL/min. A detecção foi levada a cabo num DAD, utilizando 215 nm e 245 nm (para o ácido ascórbico) como comprimentos de onda.

Os ácidos orgânicos identificados foram quantificados por comparação da área dos picos registada a 215 nm com as curvas de calibração obtidas a partir de padrões comerciais de cada composto. Os resultados foram expressos em g por 100 g de massa fresca.



Figura 14- Equipamento utilizado para determinação do perfil de ácidos orgânicos (UFLC-PDA).

(Fonte: Pires, 2022)

3.4.4 Tocoferóis

Os tocoferóis foram determinados de acordo com o procedimento otimizado pelos autores Barros et al. (2013a). Antes de se proceder à extração, adicionou-se a 500 mg de amostra liofilizada 100 µL de uma solução de BHT em hexano (10 mg/mL) e 400 µL do padrão interno (PI) (tocol em hexano 50 µg/mL). Adicionaram-se 4 mL de metanol e posterior homogeneização no vórtex durante 1 min. De seguida, adicionaram-se 4 mL de hexano procedendo-se, posteriormente, a nova homogeneização no vórtex (1 min). Posteriormente adicionou-se ainda 2 mL de uma solução aquosa saturada de cloreto de

sódio, homogeneizou-se no vórtex (1 min), centrifugou-se (centrifuga refrigerada Centurion K240R-2003, 5 min, 4000g) e transferiu-se, cuidadosamente, o sobrenadante para um frasco. A amostra foi re-extraída mais duas vezes com hexano e desidratada com sulfato de sódio anidro. O extrato foi levado à secura recorrendo a uma corrente de azoto. Em seguida foi re-dissolvido em 2 mL de hexano, filtrado (filtros de 0,22µm) para vials âmbar e analisados por HPLC-FL.

Utilizou-se um sistema integrado de bomba quaternária, um desgaseificador, um amostrador automático e um detetor de fluorescência programado para excitação a 290 nm e emissão a 330 nm. Os dados foram analisados usando o software Clarity 2,4 (DataApex, Praga, República Checa). A separação cromatográfica foi conseguida com uma coluna em fase normal Poliamida II (5 µm, 250 × 4.6 mm, WMC Waters, Japão), operando a 30 °C (forno 7971 R Grace). A fase móvel utilizada foi uma mistura de hexano/acetato de etilo (70:30, v/v) com um caudal de 1 mL/min.

A quantificação foi baseada na resposta do sinal de fluorescência, usando o método do padrão interno e por comparação cromatográfica com padrões. Os resultados foram expressos em mg por 100 g de massa fresca.

3.4.5 Compostos fenólicos

O perfil individual de compostos fenólicos foi determinado de acordo com a metodologia descrita previamente por alguns autores (Barros et al., 2013c; Bessada et al., 2016 e Gonçalves et al., 2017).

Para esta análise, foi necessário proceder à preparação do extrato hidroetanólico a partir das diferentes partes da toranja.

Para a obtenção do extrato hidroetanólico, foi realizada uma extração por maceração à temperatura ambiente (**Figura 15**). Foi pesada 1 g de cada uma das partes da toranja (*Citrus × paradisi* Macfad) – polpa, casca e mesocarpo e adicionados 30 mL de uma solução hidroalcoólica etanol/água (80:20, v/v). A mistura foi colocada durante 1 hora sob agitação constante (150 rpm), à temperatura ambiente. Seguidamente, o sobrenadante foi filtrado com o auxílio de papel filtro (Whatman N°4) e o processo foi

repetido, sendo a amostra re-extraída com 30 mL da mesma solução de extração. O filtrado foi levado ao evaporador rotativo a uma temperatura de 40 °C para remover a fração alcoólica e, a fração aquosa foi congelada e liofilizada para análises posteriores.



Figura 15- Procedimento de agitação constante para extração por maceração à temperatura ambiente.

(Fonte: Kayane Soares, 2022).

Para a determinação do perfil fenólico, 10 mg do extrato hidroetanólico foi diluído em 2 mL de água/etanol (80:20, v/v) e seguidamente filtradas através de filtros de nylon de 0,2 µm (Millipore) para vials. Seguidamente foram analisadas por procedimento em HPLC Dionex Ultimate 3000 UPLC (**Figura 16**), utilizando um sistema composto por bomba quaternária e dupla deteção on-line: detetor de díodos (DAD), tendo como comprimentos de onda de 280 nm e 370 nm, e um detetor de espectrometria de massas (MS). Para a separação utilizou-se uma coluna Waters Spherisorb S3 ODS-2 C18 (3 µm, 150 × 4,6 mm, Watersm Milford, MA, USA), numa temperatura de operação de 35 °C. A fase móvel foi 0,1% de ácido fórmico em água (A) e acetonitrilo (B). O gradiente de eluição foi de 15% B (5 min), 15% B a 20% B (5 min), 20-25% B (10 min), 25-35% B (10 min), 35-50% B (10 min), e a coluna foi reequilibrada (10 min) utilizando um fluxo de 0,5 mL/min.

A deteção MS foi realizada por um espectrómetro de massa Ion Trap Linear LTQ XL (ThermoFinnigan, San Jose, CA, USA) (**Figura 16**), com uma fonte de ionização electrospray ESI. O azoto foi utilizado como gás de arrasto a 50 psi. O sistema operou com uma voltagem de spray a 5 kV à 325 °C com tensão capilar de -20 V. Os espectros foram gravados em modo ião negativo entre 100 e 1500 m/z. A energia de colisão utilizada foi de 35 (unidades arbitrárias). Os resultados foram recolhidos e analisados por intermedio no programa Xcalibur® (ThermoFinnigan, San Jose, CA, USA).

Para a identificação dos compostos fenólicos estes foram comparados com os tempos de retenção comparando a literatura e/ou quando possível aos espectros de massa UV- Vis. A quantificação de todos os compostos foi realizada através da curva de calibração da naringenina com 7 níveis ([12.5-800] µg/mL): $y = 18433x + 78903$, $R^2 \geq 0,999$, Limite de Detecção (LD) = 0.17 µg/mL; e Limite de Quantificação (LQ) = 0.81 µg/mL, tendo como base o sinal UV-Vis dos padrões comerciais no seu comprimento de onda máximo e, quando não disponíveis, a partir de outros compostos com o mesmo grupo fenólico. Os resultados foram expressos em mg por g de extrato.



Figura 16- Equipamentos utilizados para determinação do perfil fenólico - (HPLC Dionex Ultimate 3000 UPLC e Espectrômetro de massa Ion Trap Linear LTQ XL) (Fonte: Kayane Soares, 2022).

3.5 Avaliação das propriedades bioativas do extrato hidroetanólico da toranja (*Citrus × paradisi* Macfad)

O potencial bioativo foi avaliado através de propriedades citotóxicas, anti-inflamatórias, antimicrobianas e antioxidantes, para tal foi utilizado o extrato hidroetanólico preparado de acordo com o descrito na secção anterior (3.4.5).

3.5.1 Avaliação da atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana foi avaliada através das atividades antibacterianas e antifúngicas dos extratos, utilizando do método descrito por Pires et al. (2018) através do método colorimétrico INT (cloreto de p-iodonitrotetrazólico) por microdiluição.

3.5.1.1 Atividade antibacteriana

Para atividade antibacteriana foram utilizadas bactérias alimentares (Gram-positivas: *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*; Gram-negativas: *Enterobacter Cloacae*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enterica* e *Yersinia enterocolitica*), adquiridas na Empresa Frilabo (Porto, Portugal). Além das bactérias anteriormente citadas, foram também avaliadas bactérias obtidas a partir de isolados clínicos provenientes de pacientes hospitalizados no Centro Hospitalar de Trás-os Montes e Alto-Douro Vila Real (Gram-positivas: *Enterococcus faecalis*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA); Gram-negativas: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Morganella morganii*, *Proteus mirabilis* e *Pseudomonas aeruginosa*).

Através da aplicação do método de microdiluição foi possível determinar a concentração mínima inibitória (CMI) e a concentração mínima bactericida (CMB) para cada um dos extratos avaliados. As culturas de bactérias foram ajustadas através do densitômetro garantindo uma concentração de 1×10^5 UFC/mL em cada poço.

Foram pesados 100 mg do extrato e dissolvidas em 5% (v/v) de Dimetilsulfóxido (DMSO) com água destilada autoclavada até ao volume final de 5 mL, obtendo uma concentração de 20 mg/mL. Utilizando placas de 96 poços, 100 µL de da solução preparada anteriormente foi pipetado em duplicado para o primeiro poço que continha 90 µL de caldo de soja tríptico (TSB), assim como os restantes, procedendo-se em seguida às diluições sucessivas da solução, obtendo-se 8 diferentes concentrações (10; 5; 2,5; 1,25; 0,625; 0,312; 0,156 e 0,078 mg/mL). Por fim, foram adicionados 10 µL de inóculo em todos os poços. As microplacas foram incubadas por 24 horas a 37 °C. Terminado o período de incubação foram adicionados a todos os poços 40 µL de INT

(0,2 mg/mL) e as microplacas foram colocadas na estufa a 37 °C durante mais 30 min. Terminado este intervalo de tempo os resultados foram avaliados tendo em conta a mudança de coloração passando de amarela para cor-de-rosa (**Figura 17**). Os resultados de CMI e CMB foram expressos em mg/mL de extrato.

Foram preparados controlos negativos utilizando o meio de cultura TSB e a amostra. Foram usados como controlos positivos os antibióticos ampicilina, imipenem e vancomicina para as bactérias clínicas, a estreptomicina, metilina e ampicilina para as bactérias ATCC. Todo o trabalho foi realizado com materiais estéreis manipulados em câmara em fluxo laminar.

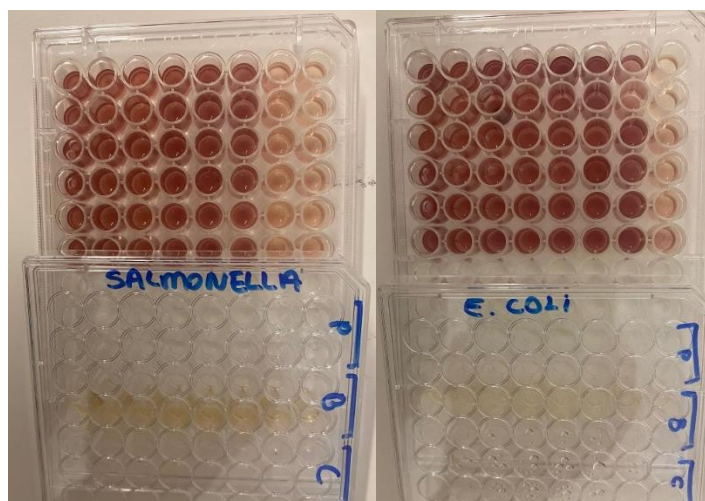


Figura 17- Microplaca no ensaio da avaliação da atividade antibacteriana. (Bactérias analisadas na figura: Salmonella enterica e Escherichia coli) (**Fonte:** Kayane Soares, 2022).

3.5.1.2 Atividade antifúngica

Para a avaliação da atividade antifúngica, foram usadas estirpes de dois microfungos: *Aspergillus brasiliensis* e *Aspergillus fumigatus*, estes fungos foram obtidos através da empresa Frilabo, Porto, Portugal. Os microfungos foram mantidos em malte ágar (MA) e as culturas foram armazenadas a 4 °C e sub-cultivadas uma vez por mês. Os esporos fúngicos foram lavados da superfície das placas de ágar com solução salina estéril a 0,85 % contendo Tween 80 a 0,1 % (v/v). A suspensão de esporos foi

ajustada com uma solução salina estéril para uma concentração de aproximadamente $1,0 \times 10^5$ num volume final de 100 μL por poço. Os inóculos foram armazenados a 4 °C.

A determinação da CMI foi realizada pela técnica de microdiluição sucessiva em microplacas de 96 poços. Foram adicionados 100 μL ao meio de malte (90 μL) com o inóculo fúngico e as microplacas foram incubadas durante 72 horas a 25 °C. As concentrações mais baixas sem crescimento visível foram definidas como CMI. As concentrações mínimas fungicidas (CMFs) foram determinadas por subcultura em série de 2 μL de cada poço que não apresentou crescimento visível, em microplacas contendo 100 μL de caldo de malte por poço e posterior incubação durante 72 horas a 25 °C. A menor concentração sem crescimento visível foi definida como CMF, indicando 99,5% de morte do inóculo original. O meio de cultura (Malte Agár), foi utilizado como controlo negativo, enquanto o cetoconazol foi utilizado como controlo positivo. Os resultados de CMI e CMF foram expressos em mg/mL de extrato hidroetanólico.

3.5.2 Avaliação da atividade antioxidante

Foram selecionados um conjunto de ensaios para a determinação da atividade antioxidante, a fim de avaliar o desempenho dos extratos.

3.5.2.1 Método da Inibição da Peroxidação Lipídica por Espécies Reativas do Ácido Tiobarbitúrico (TBARS)

A avaliação do potencial antioxidante através da inibição da peroxidação lipídica de produtos reativos do ácido tiobarbitúrico (TBARS) foi realizada conforme a metodologia descrita por Barros et al. (2013b). Utilizou-se o extrato hidroetanólico para a preparação de uma solução-mãe, com concentração igual a 20 mg/mL e posteriormente realizou-se a diluição em série a fim de obter 8 concentrações distintas (10; 5; 2,5; 1,25; 0,625; 0,312; 0,156 e 0,078 mg/mL).

Num tubo falcon foi pesada uma determinada massa de cérebro de porco e adicionado o dobro desta massa de tampão Tris-HCl (20 mM; pH = 7,4). Após agitação, o tubo foi levado à centrífuga a 3500 rpm por 10 minutos. Posteriormente recolheu-se o

sobrenadante (100 µL) que foi adicionado às soluções dos extratos (200 µL) na presença de FeSO₄ (100 µL) e ácido ascórbico (100 µL). Após incubação a 37 °C durante 1 hora, cessou-se a reação através da adição de 500 µL de ácido tricloroacético (28%, m/v), seguido de 380 µL de ácido tiobarbitúrico (2%, m/v).

Seguidamente a mistura foi aquecida a 80 °C durante 20 min e centrifugada a 3000 g durante 5 min para remover o precipitado protéico. O Malondialdeído (MDA) reage com ácido tiobarbitúrico (TBA) para formar um pigmento rosa, chamado complexo malondialdeído (MDA)–TBA (**Figura 18**), cuja intensidade foi medida espectrofotometricamente (SPECTROstar Nano) a 532nm.

O cálculo da percentagem de inibição da peroxidação lipídica foi feito de acordo com a **Equação 3**. Os resultados foram apresentados em valores de IC₅₀ que corresponde a concentração de extrato que promove 50% da inibição da peroxidação lipídica.

$$\% \text{ de inibição da peroxidação lipídica} = \frac{A_{Tris} - A_A}{A_{Tris}} \times 100$$

Equação 3- Cálculo para inibição da peroxidação lipídica (ATris corresponde à absorbância do controlo e AA à absorbância da amostra) (**Fonte:** Barros et al., 2013).

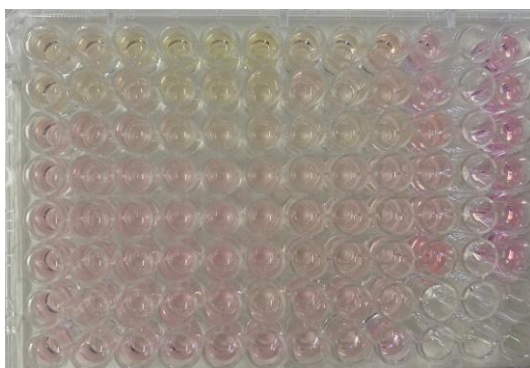


Figura 18- Microplaca para leitura no ensaio de TBARS (**Fonte:** Kayane Soares, 2022).

3.5.2.2 Método do Efeito Captador de Radicais Livres (DPPH)

A avaliação da atividade antioxidante pelo método do Efeito Captador do Radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) foi realizada de acordo com o descrito por Cardeñosa et al. (2015).

Em placas de 96 poços foram adicionados 270 μL de solução metanólica contendo DPPH ($6 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$) juntamente com 30 μL de cada um dos extratos obtidos conforme descrito anteriormente (**secção 3.4.5**) em diferentes concentrações (20; 15; 12; 10; 7; 5; 2,5; 1,25 mg/mL). Após 1 hora em temperatura ambiente e ao abrigo da luz, a placa (**Figura 19**) foi levada para leitura de absorvância no espectrofotômetro (SPECTROstar Nano) a 515 nm. O radical da molécula apresenta cor violeta escuro e, após reação com substância que apresenta propriedade antioxidante, torna-se amarelo ou violeta claro (Santos et al., 2011) (**Figura 20**).

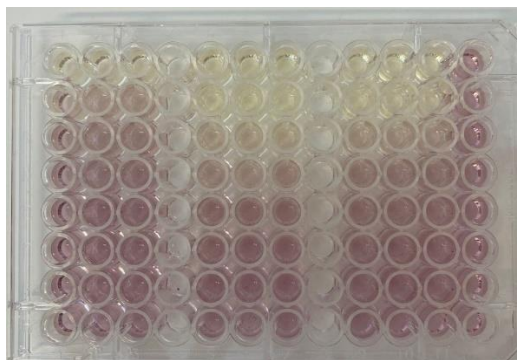


Figura 19- Microplaca para leitura no ensaio DPPH (Fonte: Kayane Soares, 2022).

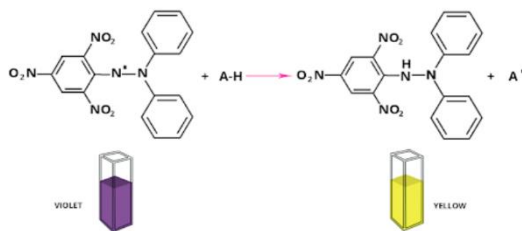


Figura 20- Representação da reação de DPPH. (Fonte: Sedaki, 2021).

A percentagem de inibição do DPPH foi calculada de acordo com a **Equação 4**. Os resultados foram expressos em IC₅₀, que representa a concentração de extrato que promove 50% de inibição de DPPH.

$$\% \text{ de inibição} = \frac{A_{DPPH} - A_A}{A_{DPPH}} \times 100$$

Equação 4- Equação para determinação da percentagem de inibição de DPPH.

3.5.2.3 Método da Inibição da Hemólise Oxidativa (OxHLIA)

A atividade anti hemolítica dos extratos foi avaliada pela reação oxidativa do ensaio de inibição da hemólise (OxHLIA) descrito anteriormente por Takebayashi et al. (2012) com algumas modificações por Lockowandt et al. (2019).

As amostras de sangue foram recolhidas de ovelhas saudáveis e centrifugadas a 1000g (5min, 10 °C). As camadas de plasma foram descartadas e os eritrócitos foram primeiramente lavados uma vez com NaCl (150 mM) e três vezes com solução salina tamponada com fosfato (PBS, pH 7,4). O sedimento de eritrócitos foi ressuspensão em PBS a 2,8% (v/v). Usando uma microplaca de 48 poços de fundo plano, 200 µL de solução de eritrócitos foram misturados com 400 µL de: i) solução de PBS (controle); ii) soluções de extrato (0,125–8 mg/mL em PBS); iii) água para hemólise completa; e iv) trolox (controle positivo).

Após pré-incubação a 37 °C por 10 min com agitação, foram adicionados 200 µL de uma solução de dicloridrato de 2,2-azobis (2-amidinopropano) (AAPH) em PBS (160 mM) nos poços. A placa foi levada para leitura inicial da densidade ótica em leitor de microplacas a 690 nm e retornada para incubação a 37±0,5 °C por mais 1 hora. Após este período, foram realizadas novas leituras de densidade ótica em intervalos de 10 minutos até se observar a hemólise completa, sempre retornando as placas para incubação entre as leituras. Curvas hemolíticas foram geradas para as diferentes concentrações do extrato e para o PBS através do cálculo do percentual de eritrócitos intactos ao longo do tempo (P), determinado pela **Equação 5**.

A percentagem da população de eritrócitos que permaneceu intacta (P) foi calculada da seguinte forma:

$$P(\%) = \frac{(S_t - CH_0)}{(S_0 - CH_0)} \times 100$$

Equação 5- Cálculo da percentagem da população de eritrócitos que permaneceu intacta.

Onde S_t e S_0 referem-se à densidade ótica do extrato nos tempos t e 0 min, respetivamente, e CH_0 refere-se à densidade ótica da hemólise completa no tempo 0 min, obtida a partir do controlo positivo. Foram determinados os valores de tempo de meia hemólise (Ht_{50}) para o PBS e para cada uma das concentrações do extrato quando cada curva atingiu 50% de eritrócitos intactos. Com base na **Equação 6**, foi determinado o tempo de atraso da hemólise (Δt), estabelecendo uma correlação com concentração, permitindo a determinação dos valores de concentração de inibição (IC_{50} ; mg/mL) num intervalo de tempo de 60 minutos.

$$\Delta t = Ht_{50(amostra)} - Ht_{50(controlo)}$$

Equação 6- Tempo de atraso da hemólise.

3.5.3 Avaliação da atividade anti-inflamatória

A avaliação da atividade anti-inflamatória foi determinada de acordo com o procedimento descrito por Taofiq et al. (2015). Foi utilizada uma linha celular de macrófagos de rato RAW 264,7 cultivadas em meio DMEM, suplementado com 10% de soro bovino inativado por calor e L-glutamina, a 37°C com 5% de CO_2 , em ar humidificado. Também foi preparada uma solução stock de extrato em água estéril de 8 mg/mL a partir da qual foram feitas diluições em série obtendo soluções intermediárias de concentrações entre 8 – 0,125 mg/mL.

As células com crescimento ativo foram soltas com um raspador de células, a densidade experimental das células foi estabelecida a 5×10^5 células/mL e a proporção de células mortas foi inferior a 1%, de acordo com o teste de exclusão de Azul de Trypan.

Seguidamente, as células foram distribuídas numa placa de 96 poços (e deixadas a aderir à microplaca durante a noite. Posteriormente, as células foram tratadas com diferentes concentrações dos extratos durante 1 hora, seguido de estimulações com lipopolisacáridos (LPS) (1 µg/mL) ao longo de 18 horas. Foram preparados controlos sem a adição de LPS de forma a observar se estes induziam alterações nos níveis basais de óxido nítrico (NO).

Após o período de incubação, o sobrenadante da cultura celular (100 µL) é transferido para outra microplaca (**Figura 21**) e adicionado o reagente Griess que contém uma mistura de sulfanilamida e soluções NED (cloreto de hidrocloreto etilenodiamina N-(1-naftil)), as placas foram mantidas em repouso por 5 min a temperatura ambiente e protegidas da luz, então o óxido nítrico foi determinado através da medição da absorbância a 540 nm utilizando o leitor de microplacas.

Os resultados foram obtidos através da representação gráfica da percentagem de inibição da produção de óxido nítrico pela concentração do extrato e expressos em relação à concentração que leva à inibição de 50% da produção do óxido nítrico (IC₅₀).

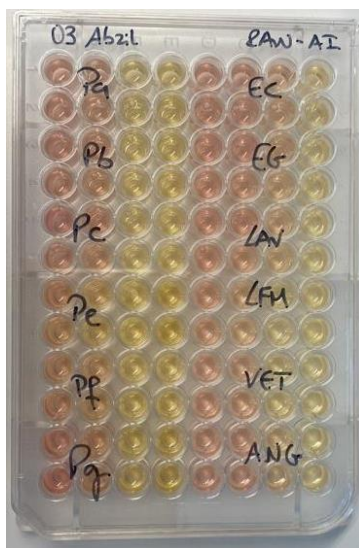


Figura 21- Microplaca para leitura do ensaio de atividade anti-inflamatória. (Fonte: Mandim, 2022).

3.5.4 Avaliação da citotoxicidade

A atividade citotóxica foi avaliada *in vitro* através do ensaio da Sulforrodamina B (SRB) conforme a metodologia descrita por Vaz et al. (2010) a fim de determinar a inibição do crescimento celular. Para isso foram utilizadas 4 linhas celulares tumorais, nomeadamente MCF-7 (carcinoma da mama), Ags (adenocarcinoma gástrico) e NCI (carcinoma de pulmão) e CaCo-2 (adenocarcinoma colorretal); utilizou-se também uma linha não tumoral de células primárias de fígado de porco (PLP2).

As células foram cultivadas numa incubadora de ar humidificado e com 5% de CO₂, em frascos de cultura de tecidos de 25 cm² e suplementadas com RPMI 1640 com 10% de soro fetal bovino, 2 mM de aminoácidos não essenciais e glutamina, 100 U/mL de penicilina e 100 mg/mL de estreptomicina. Foi então efetuada uma monitorização contínua das células num microscópio de contraste de fase (Icon Eclipse Ts 100).

Para preparar o ensaio, retirou-se o meio de cultura do frasco de cultura com as células e lavaram-se com solução salina (HBSS, 2 mL). Descartou-se o meio de lavagem e adicionou-se tripsina (2,5 mL) para desagregar as células da caixa de cultura durante três min em incubação. De seguida, adicionou-se meio de cultura (5 mL) de modo a neutralizar a ação da tripsina, e colocou-se a suspensão da linha celular em tubos de Falcon estéreis para centrifugar (5 min). Descartou-se o meio de cultura com tripsina e retirou-se a suspensão celular (75 µL) para um eppendorf à qual se juntou a mesma quantidade (75 µL) de azul tripano para se proceder à contagem de células numa câmara de Neubauer.

Posteriormente, colocaram-se os extratos (10 µL) em microplacas de 96 poços juntamente com o volume de suspensão celular calculado para a densidade estabelecida, e perfez-se o volume do poço com meio de cultura. Após isto, as microplacas armazenaram-se devidamente seladas durante 72 h a 37 °C com humidade e 5% de CO₂. Já com as células devidamente aderidas, desprezou-se o conteúdo da microplaca, e deu-se início ao teste da SRB pela adição de ácido tricloroacético frio (10%, 100 µL) a cada um dos poços e incubação a 4 °C durante 60 min. De seguida, lavaram-se devidamente com água destilada e as microplacas foram colocadas a secar. Adicionou-se então a SRB

(0,1 em 1% ácido acético; 100 μ L) incubando de seguida durante 30 min à temperatura ambiente.

A placa foi novamente lavada, desta vez com ácido acético (1%) de modo a retirar cuidadosamente o excesso SRB e deixou-se secar (**Figura 22**). Solubilizou-se a SRB com Tris (200 μ L, pH 7,4) com auxílio de um agitador de microplacas e procedeu-se à leitura da absorvância a 540 nm. Os resultados foram expressos pelo fator de diluição que inibiu 50% do crescimento celular (GI₅₀). Todos estes processos e operações foram efetuados em ambiente asséptico numa câmara de fluxo laminar vertical.

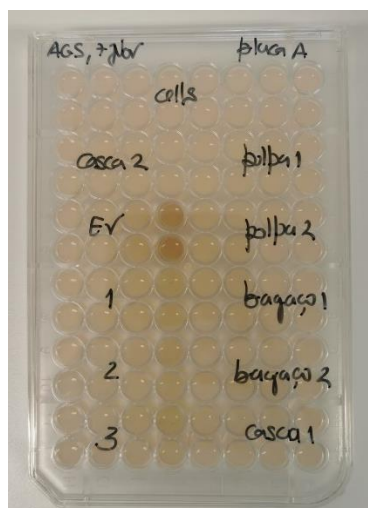


Figura 22- Microplaca utilizada para avaliação de citotoxicidade contra AGS (adenocarcinoma gástrico).

(Fonte: Kayane Soares, 2022).

3.6 Análise estatística

Os resultados quantitativos foram expressos como valor médio \pm desvio padrão, exceto para os resultados de atividade antimicrobiana e citotoxicidade. Foi utilizada a variável n para acusar o número de réplicas de cada ensaio. A análise estatística dos dados foi efetuada com o intuito de determinar as diferenças significativas entre as diferentes amostras e foi realizada através de uma análise de variâncias ANOVA seguido do teste *Tuckey* HSD ou do teste *t-student*, tendo em conta os distintos tipos de comparações. Em cada tabela foi descrito qual o teste estatístico aplicado. Para tal, foi usado do software RStudio (Team RStudio: Integrated Development for R. RStudio, PBC, Boston, MA, 2020).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Rendimento da extração

Após a completa separação e liofilização das diferentes partes da toranja, a massa final foi registrada e calculado o rendimento da extração de acordo com a **Equação 7**. A equação baseia-se na razão entre a massa final de extrato obtido e a massa inicial de amostra liofilizada, o resultado é apresentado em percentagem de rendimento.

$$\% \text{ rendimento} = \frac{\text{massa final (g)}}{\text{massa inicial (g)}} \times 100$$

Equação 7- Equação para cálculo de rendimento de extrato.

Os rendimentos da extração estão apresentados na **Tabela 3**. O extrato de polpa de toranja apresentou o menor rendimento quando comparado à casca e ao mesocarpo, sendo que estes apresentaram mais de 50% de rendimento.

Tabela 3- Rendimento de extração dos extratos de polpa, mesocarpo e casca da toranja (*Citrus x paradisi* Macfad)

Extrato	Rendimento (%)
Polpa	30 ± 3 ^b
Casca	58,6 ± 0,8 ^a
Mesocarpo	55 ± 2 ^a

Os resultados são apresentados como média ± desvio padrão. A análise estatística utilizando análise de variância unidirecional (ANOVA) seguida do teste de Tukey HSD e diferentes letras significam diferenças significativas (p<0,01) (n=2).

4.2 Avaliação da composição centesimal e química da polpa, casca e mesocarpo da toranja (*Citrus x paradisi* Macfad)

Com base nas diferentes partes da toranja, foi possível determinar a quantidade aproximada de polpa, mesocarpo e casca presentes na fruta. A polpa corresponde a

67,3% do peso total das amostras, equivalente a 0,792 kg. Os bio-resíduos, compostos pela casca e mesocarpo, representaram 0,384 kg do peso total, totalizando 32,7% das amostras. Portanto, os resíduos da toranja encontrados neste estudo representam aproximadamente 1/3 do peso total da fruta. É importante ressaltar que existem poucos estudos, ou estudos não muito recentes, que relatam a caracterização das diferentes partes da toranja. Geralmente, os autores concentram-se na avaliação do sumo da polpa ou do óleo essencial obtido da casca. Portanto, o nosso estudo destaca-se pela inovação ao caracterizar os diferentes partes da fruta, com ênfase nos bio-resíduos, que parecem ser bastante promissores devido à sua composição rica em compostos bioativos. Esses resíduos têm potencial para aplicações em diversas áreas de interesse.

4.2.1 Composição centesimal

Os resultados da composição centesimal da polpa, casca e mesocarpo de *Citrus x paradisi* Macfad estão expressos na **Tabela 4**. A água destaca-se como componente principal em todas as partes da toranja. A casca apresentou o maior teor de lípidos, proteínas e cinzas, por outro lado, o mesocarpo apresentou maior quantidade de hidratos de carbono e fibras. As análises estatísticas sugerem que há diferenças significativas entre a polpa, casca e mesocarpo da toranja no que se diz respeito ao teor de lípidos, hidratos de carbono e fibras.

Os valores nutricionais encontrados no nosso estudo assemelham-se aos valores para toranja da tabela de composição química dos alimentos (TABNUT) fornecida pela Escola Paulista de Medicina da Universidade de São Paulo (2016) onde para 100g de fruta fresca encontraram para a água (88,1 g vs 90,7 g), proteínas (0,77 g vs 0,59 g), lípidos (0,14 g vs 0,040 g), hidratos de carbono (10,66 g vs 8,42 g) e fibras (1,4 g vs 1,01 g).

Ricon et al. (2005) também caracterizaram cascas da toranja e cascas de outras variedades de *Citrus*. Eles identificaram valores inferiores de proteínas na casca da toranja em comparação aos encontrados no nosso estudo (0,68 g/100 g vs 0,92 g/100 g de massa fresca, enquanto os valores de lípidos foram superiores (0,21 g/100 g vs 0,150 g/100 g de massa fresca). A diferença nos resultados pode ser atribuída à natureza do

fruto, estado de maturação, variedade e estação do ano (Ricon et al., 2005). No mesmo estudo também foram caracterizadas as fibras totais da casca da toranja que apresentaram valor semelhante ao encontrado no nosso estudo (5,35 g/100 g de massa fresca vs 5,2 g/100 massa fresca). Além disso, entre as cascas de diferentes *Citrus* avaliadas pelos autores, a toranja foi a que apresentou o maior teor de fibras totais.

No nosso estudo, verificamos que o teor de fibras na casca e no mesocarpo da toranja foi significativamente maior em comparação com outra variedade de *Citrus*, a Laranja Sanguínea (*Citrus x sinensis*). Na toranja, encontramos 5,2 g/100g de fibras na casca e 6,7 g/100g de fibras no mesocarpo. A Laranja Sanguínea apresentou valores de 2,8 g/100g de fibras brutas na casca e 3,39g/100g de fibras brutas no mesocarpo (Oliveira et al., 2019). Estes resultados destacam a toranja como uma fonte especialmente rica em fibras quando comparada a outras variedades de *Citrus*.

É importante ressaltar a diferença significativa na quantidade de fibras entre as diferentes partes da toranja. O mesocarpo, por exemplo, apresentou um teor de fibras seis vezes maior do que a polpa (6,7g/100g em comparação com 1,01 g/100g, respectivamente). Num estudo realizado por Reis et al. (2018), os autores também observaram que a casca e o albedo das frutas possuem teores muito mais elevados de fibras em comparação com a polpa. Essa diferença pode ser atribuída à presença de pectina, uma fibra solúvel descrita por Silva et al. (2016), que é encontrada entre a casca e a parte comestível da fruta.

O alto teor de pectinas é de grande interesse, pois essa substância é amplamente utilizada na indústria alimentar devido às suas propriedades gelificantes. Além disso, a pectina auxilia na redução das taxas de glicose no sangue e é uma fonte de niacina (vitamina B3), ferro, cálcio e fósforo (Food Ingredientes Brasil, 2014). Portanto, a toranja, especialmente as suas cascas e albedo, pode ser uma valiosa fonte de fibras e nutrientes importantes para a saúde.

Além das propriedades benéficas das fibras encontradas no mesocarpo da toranja, o nosso estudo revelou que esse componente pode ser considerado uma fonte rica desses nutrientes. O teor de fibras encontrado (6,7 g/100g de massa fresca) fornece aproximadamente 25% da ingestão diária recomendada (25g/dia) para adultos saudáveis,

de acordo com a Organização Mundial da Saúde (2004). Isso salienta a importância de incluir o mesocarpo da toranja na nossa dieta como uma fonte significativa de fibras.

Além disso, um estudo conduzido por Czech et al. (2021) demonstrou que a toranja como um todo contém até 45% mais fibras do que apenas a polpa da fruta. Essa descoberta destaca a importância de utilizar a fruta integralmente de forma processada, na produção de sumos, geleias e doces, para aproveitar ao máximo o seu conteúdo de fibras e obter todos os benefícios nutricionais que ela oferece. Dessa forma, podemos aproveitar ao máximo as propriedades saudáveis da toranja, promovendo o uso integral da fruta em diversas preparações alimentares.

4.2.2 Ácidos Gordos

Na **Tabela 4** está identificada a composição majoritária de ácidos gordos bem como o conteúdo de ácidos gordos saturados, monoinsaturados e polinsaturados encontrados na toranja. Foram identificados majoritariamente sete diferentes ácidos gordos nas diferentes partes da toranja: Ácido mirístico; Ácido palmítico; Ácido palmitoleico; Ácido esteárico; Ácido oleico; Ácido linoleico; Ácido linolenico;

A composição de ácidos gordos apresentada no nosso estudo está de acordo com as informações relatadas na literatura (Teles, 1947; Schirra, 1994; Rosa et al., 2019), que descrevem esses ácidos gordos como os mais comumente encontrados em diferentes variedades de *Citrus* (Nunes et al., 2009; Assefa, Saini & Keum, 2017).

No nosso estudo, observamos que o mesocarpo apresentou a maior proporção de ácidos gordos saturados e monoinsaturados, enquanto a casca mostrou o maior teor de ácidos gordos polinsaturados, com destaque para o ácido linoleico (C18:2n6) representando 36,3% do total. Essas diferenças na composição de ácidos gordos entre as diferentes partes da toranja foram estatisticamente significativas, com exceção do ácido palmitoléico (C16:1) na polpa e no mesocarpo.

É importante ressaltar que o ácido palmítico (C16:0) foi encontrado em quantidades expressivas (>30%) em todas as partes analisadas, corroborando com estudos anteriores realizados em diferentes espécies de *Citrus* (Benelli, 2010; Assis et

al., 2011; Oliveira, 2013). Esses resultados estão de acordo com a presença do ácido palmítico, um ácido gordo saturado comum, tanto em plantas quanto em animais (de Souza et al., 2021).

A diversidade na composição de ácidos gordos entre as partes da toranja reflete a complexidade bioquímica dessa fruta e pode ter implicações importantes para a sua utilização em aplicações alimentares e na saúde humana. Compreender essas diferenças contribui para uma melhor caracterização nutricional da toranja e fornece informações valiosas para a seleção de alimentos ricos em ácidos gordos específicos com potenciais benefícios à saúde.

A casca da toranja destaca-se pela sua significativa composição de ácidos gordos, sendo aproximadamente 36% composta pelo ácido gordo essencial linoleico, resultados que vão ao encontro ao relatado por Rosa et al. (2019), que quantificaram os ácidos gordos presentes no óleo extraído da casca da toranja. O estudo também ressaltou que o óleo essencial da casca da toranja apresentou um teor superior de ácido linoleico em comparação com o óleo essencial obtido da casca de limão.

O ácido linoleico é um composto de interesse devido aos seus potenciais benefícios à saúde. Estudos têm demonstrado que sua adição à dieta está associada à perda de peso e ao controle dos índices de glicemia. Além disso, o ácido linoleico apresenta propriedades antioxidantes, contribuindo para a proteção do organismo contra danos oxidativos (Sanhueza, Nieto & Valenzuela, 2002; Hayashi, 2003).

A presença significativa de ácido linoleico na casca da toranja destaca o seu potencial nutricional e funcional. Essas descobertas incentivam a exploração e o aproveitamento integral desse componente em aplicações alimentares e na investigação por estratégias de promoção da saúde, como formulações de alimentos enriquecidos com ácido linoleico.

Apenas a casca e o mesocarpo apresentaram teores de ácido linolénico (C18:3n3). Este ácido faz parte do grupo ômega-3 e deve ser consumido através da alimentação, uma vez que o organismo não é capaz de sintetizá-lo, ele está relacionado com diversas funções importantes no organismo como transferência do oxigênio atmosférico para o plasma sanguíneo, síntese da hemoglobina e divisão celular (Martin et al., 2006). Além

disso, estudos têm demonstrado que os aumentos de ácidos gordos ômega-3 na dieta podem auxiliar no emagrecimento, diminuição da inflamação crônica e saúde cardiovascular (Novello et al., 2007; Chaves, 2017).

Desta forma, o presente estudo confirma a percentagem de ácidos gordos essenciais e não essenciais presentes nas diferentes partes da toranja, demonstrando que existem diferenças entre as quantidades presentes em cada uma delas.

4.2.3 Açúcares Livres

Foram quantificados os açúcares livres presentes em cada parte da toranja, e os resultados estão apresentados na **Tabela 4**. Verificou-se a presença de frutose, sacarose, glicose e trealose, compostos já identificados na literatura por outros autores (Damayanti, 2012; Aadil et al., 2015). Houve diferença significativa entre os teores de frutose e sacarose encontrados na polpa e no mesocarpo, respetivamente. A quantidade de glicose não se revelou diferente entre as partes comparadas.

A polpa da toranja mostrou ser rica em açúcares livres, sendo a parte da fruta com a maior quantidade desses compostos, totalizando 5,4 g/100g. Entre os açúcares identificados, a sacarose apresentou o maior teor, com 2,6 g/100g, seguida pela frutose (1,4 g/100g) e glicose (1,26 g/100g). Essa ordem de predominância dos açúcares na polpa da toranja é consistente com os resultados obtidos por Kelebek (2010), que quantificou os açúcares em sumo de diferentes variedades de toranja cultivadas na Turquia. Estudos anteriores que analisaram os açúcares livres em diferentes variedades de toranja também observaram que a variedade Star Ruby, utilizada neste estudo, possui um teor mais elevado de sacarose (2,68g/100g), seguida pela frutose (1,77g/100g) e glicose (1,37g/100g). No entanto, é importante ressaltar que esses mesmos estudos relataram que as quantidades de cada açúcar livre podem variar até 40% entre diferentes variedades de toranja (Zheng et al., 2016).

Esses resultados destacam a composição específica de açúcares na polpa da toranja, evidenciando a predominância da sacarose, seguida pela frutose e glicose. Além disso, enfatizam a variabilidade na quantidade de açúcares entre diferentes variedades de toranja, o que pode influenciar o perfil sensorial e nutricional dessas frutas.

Além disso é descrito na literatura que o teor de açúcares tende a aumentar com a maturação dos frutos, desta forma, na mesma variedade, os teores podem sofrer algumas diferenças (Latocha, 2017).

A trealose foi o açúcar encontrado em menor quantidade nas três partes analisadas, valor esperado, uma vez que a literatura descreve que os níveis de trealose são geralmente muito baixos para conferir uma contribuição como açúcar de reserva ou transporte, sendo que estas funções já são realizadas pela sacarose (Pereira et al., 2022). A quantidade de glicose em cada parte não apresentou diferenças significativas entre si.

O teor de frutose encontrado na polpa da toranja (1,4 g/100g) é até 4 vezes menor do que o encontrado em Laranja (*Citrus x sinensis*) (6 g de frutose/100g de polpa fresca) e 1,6 vezes menor do que o encontrado na Tangerina (*Citrus x reticulata*) (2,4 g de frutose/100g de polpa fresca) (USDA, 2019b; USDA,2019c). Autores demonstram que o baixo teor de frutose da toranja em comparação com outras variedades de *Citrus* pode estar relacionado com seu comprovado baixo índice glicêmico, fazendo com que o sumo da polpa da Toranja seja preferível para pacientes com diabetes (Jenkins et al., 2011).

Apesar de conter o maior teor de açúcares livres, o valor energético da polpa foi o mais baixo, verificando-se diferenças estatísticas em relação à casca e ao mesocarpo. O facto pode estar associado ao maior teor de humidade presente na polpa (90,7% vs 86,6% (casca) e 86,2% (mesocarpo)) fazendo com que os outros compostos estejam mais diluídos e apresente assim menor valor energético, uma vez que o cálculo de hidratos de carbono é feito por diferença e uma maior percentagem de humidade resulta numa menor quantidade deste nutriente.

Tabela 4- Composição centesimal (g/100 g de massa fresca), valor energético (kcal/100 g de massa fresca), composição em açúcares livres (g/100 g de massa fresca) e ácidos gordos (percentagem relativa) de polpa, casca e mesocarpo da toranja (*Citrus x paradisi* Macfad)

	Polpa	Casca	Mesocarpo
Humidade	90,7 ± 0,5 ^a	86,6 ± 0,4 ^b	86,2 ± 0,2 ^b
Lípidos	0,040 ± 0,001 ^c	0,150 ± 0,002 ^a	0,08 ± 0,01 ^b
Proteínas	0,59 ± 0,03 ^b	0,92 ± 0,03 ^a	0,56 ± 0,01 ^b
Cinzas	0,24 ± 0,09 ^b	0,55 ± 0,09 ^a	0,45 ± 0,03 ^a
Hidratos de Carbono, dos quais:			
Fibras	1,01 ± 0,03 ^c	5,2 ± 0,3 ^b	6,7 ± 0,2 ^a
Açúcares			
Frutose	1,4 ± 0,2 ^a	1,3 ± 0,1 ^a	0,81 ± 0,09 ^b
Glicose	1,26 ± 0,09 ^a	1,27 ± 0,4 ^a	0,94 ± 0,08 ^a
Sacarose	2,6 ± 0,1 ^a	0,5 ± 0,1 ^b	0,8 ± 0,2 ^b
Trealose	0,144 ± 0,006 ^b	0,143 ± 0,004 ^b	0,301 ± 0,002 ^a
Total em açúcares livres	5,4 ± 0,9^a	3,2 ± 0,3^b	2,8 ± 0,3^b
Energia	34,4 ± 0,2 ^b	42 ± 1 ^a	40,6 ± 0,6 ^a
Ácidos Gordos			
C14:0	3,38 ± 0,04 ^a	2,43 ± 0,02 ^c	3,13 ± 0,01 ^b
C16:0	31,1 ± 0,1 ^c	35,40 ± 0,09 ^b	40,7 ± 0,1 ^a
C16:1	2,8 ± 0,3 ^a	1,3 ± 0,1 ^b	2,56 ± 0,2 ^a
C18:0	8,5 ± 0,2 ^a	5,46 ± 0,03 ^c	6,8 ± 0,2 ^b
C18:1n9c	21,2 ± 0,1 ^b	12,32 ± 0,08 ^c	26,64 ± 0,07 ^a
C18:2n6c	32,8 ± 0,2 ^b	36,3 ± 0,2 ^a	16,78 ± 0,09 ^c
C18:3n3	vs	6,87 ± 0,08*	3,40 ± 0,05*
SFA	43,0 ± 0,3^b	43,3 ± 0,4^b	50,6 ± 0,2^a
MUFA	24,1 ± 0,2^b	13,6 ± 0,1^c	29,20 ± 0,09^a
PUFA	32,8 ± 0,1^b	43,1 ± 0,2^a	20,2 ± 0,1^c

Os resultados são apresentados como média ± desvio padrão. vs: vestígios. A análise estatística foi realizada utilizando análise de variância unidirecional (ANOVA) seguida do teste de Tukey HSD e em cada linha, diferentes letras significam diferenças significativas ($p < 0,05$). *Significa diferenças estatísticas obtidas por um teste t-student. (n=3). Ácido mirístico (C14:0); Ácido palmítico (C16:0); Ácido palmitoleico (C16:1); Ácido esteárico (C18:0); Ácido oleico (C18:1n9); Ácido linoleico (C18:2n6); Ácido linolenico (C18:3n3); SFA- Ácidos gordos saturados; MUFA- Ácidos gordos monoinsaturados; PUFA- Ácidos gordos polinsaturados.

4.2.4 Ácidos Orgânicos

A composição de ácidos orgânicos presentes nas diferentes partes da toranja está descrita na **Tabela 5**. Para todas as partes analisadas, foram identificados o ácido oxálico,

málico, quínico, ascórbico e cítrico, com exceção do ácido málico que não foi identificado na polpa e o ácido cítrico não foi identificado na casca.

A polpa apresentou o maior teor de ácidos orgânicos totais, destacando-se a quantidade de ácido cítrico, seguido do ácido quínico. Valores que vão de encontro ao reportado por Zheng et al. (2016); o mesmo autor também identificou uma quantidade considerável de ácido tartárico em polpa de toranja de diferentes cultivos.

Estudos anteriores mostraram que as frutas cítricas contêm principalmente ácido málico, ácido cítrico, ácido quínico e ácido oxálico, e juntos, esses ácidos orgânicos influenciam a acidez das frutas cítricas (Albertini et al., 2006). Entre esses ácidos orgânicos, num estudo realizado por Albertini et al. (2006) o ácido cítrico foi o que mais contribuiu para o sabor da acidez e representou 79%, 71% e 45% do total de ácidos orgânicos em limão, lima e laranjas ácidas, respetivamente. No nosso estudo, o ácido cítrico representa 87% do teor total de ácidos orgânicos identificados na polpa, este facto pode estar relacionado com o sabor ácido-picante característico da toranja.

Os teores de ácidos encontrados na polpa, casca e mesocarpo diferem entre si, demonstrando que a concentração de ácidos orgânicos pode variar de acordo com a parte da fruta analisada. Dos estudos encontrados, apenas Monselise & Galily (1979) realizou análises nas diferentes partes da toranja (casca, mesocarpo e polpa), e também identificou a casca como sendo a parte da fruta com menor quantidade total de ácidos orgânicos e a polpa com a maior. O autor cita ainda que durante o armazenamento o teor médio de ácidos na casca teve aumento significativo, sendo que o ácido málico foi o ácido que se destacou com maior aumento na casca da fruta e diminuição na polpa, facto que pode estar associado à não identificação deste ácido na polpa da fruta no nosso estudo (Monselise & Galily, 1979).

O ácido ascórbico (Vitamina C) é um micronutriente que desempenha diversos papéis importantes no corpo humano, sendo os mais reconhecidos o fortalecimento do sistema imunológico, a atuação na absorção do ferro e redução no nível de triglicérides e de colesterol (Cavalari & Sanches, 2018). Atualmente a toranja é reconhecida por ser fonte de vitamina C, apresentando em 100 g de fruta fresca de 25% a 30% da ingestão diária recomendada deste micronutriente (100 mg/dia) (Organização Mundial da Saúde,

2004). O nosso estudo comprova o alto teor de ácido ascórbico (vitamina C) presente na toranja (24,17 mg/100g em polpa da toranja) além de identificar que o mesocarpo da fruta é a parte com maior quantidade de ácido ascórbico (53 mg/100g), sendo esse duas vezes maior do que a quantidade encontrada na polpa, demonstrando assim, que o mesocarpo, uma parcela do fruto que é comumente descartada, pode ser positivamente explorada pela indústria alimentar e farmacêutica, podendo vir a ser utilizado como ingrediente natural capaz de promover a saúde dos consumidores.

Tabela 5- Ácidos orgânicos (mg/100 g de massa fresca) de polpa, casca e mesocarpo da toranja (*Citrus x paradisi Macfad*).

Ácidos Orgânicos	Polpa	Casca	Mesocarpo
Ácido oxálico	16,37 ± 0,01 ^b	39,8 ± 0,1 ^a	30,1 ± 0,3 ^a
Ácido quínico	119 ± 2 ^c	463 ± 2 ^a	256 ± 4 ^b
Ácido málico	n.d	128 ± 1 [*]	85 ± 1 [*]
Ácido ascórbico	24,17 ± 0,03 ^c	47,3 ± 0,4 ^b	53 ± 1 ^a
Ácido cítrico	1068 ± 7 [*]	n.d	229,1 ± 0,4 [*]
Total	1228 ± 9 ^a	678 ± 3 ^c	653 ± 7 ^b

n.d: não detetado. Os resultados são apresentados como média ± desvio padrão. A análise estatística utilizando análise de variância unidirecional (ANOVA) seguida do teste de Tukey HSD e em cada linha, diferentes letras significam diferenças significativas (p<0,05). *Significa diferenças estatísticas obtidas por um teste t-student. (n=2).

Curvas de calibração utilizadas: ácido oxálico ($y = 8.10^6 x + 331789$; $R^2 = 0,9912$); ácido quínico ($y = 692575x + 11551$; $R^2 = 0,9983$); ácido málico ($y = 942562x + 38506$; $R^2 = 0,9987$); ácido ascórbico ($y = 5.10^7 x + 449262$; $R^2 = 0,9813$); ácido cítrico ($y = 968367 x - 12295$; $R^2 = 0,9974$);

4.2.5 Tocoferóis

O termo genérico "vitamina E" é utilizado para designar oito diferentes compostos, nomeados α -, β -, γ - e δ - (alfa, beta, gama e delta) tocoferóis e tocotrienóis (Guinaz et al.,2009). A **Tabela 6** apresenta a composição de tocoferóis presentes nas diferentes partes da toranja. Apenas a isoforma α -tocoferol foi identificada, apresentando-se em maior quantidade no mesocarpo da fruta.

Estudos indicam que em frutas, o α -tocoferol parece ser a principal isoforma acumulada, sendo que os valores podem variar dependendo da espécie e parte do fruto, pois a vitamina E é um composto lipossolúvel e acumula-se em maior quantidade nas frações gordurosas das plantas (Chun et al., 2006; Horvath et al., 2006). Assim como no presente estudo, a literatura também relata concentrações maiores de tocoferóis na casca e mesocarpo quando comparados com a polpa de alguns *Citrus* (toranja, tangerina e laranja), assim como a detecção da isoforma α -tocoferol é predominante nesses frutos (Chun et al., 2006; Cardeñosa et al., 2015).

Num estudo realizado por Rey, Zacarias & Rodrigo (2021) foram relatados valores ligeiramente maiores de α -tocoferol na polpa e na casca da toranja em comparação aos resultados encontrados no nosso estudo. Eles encontraram valores de 0,54 mg/100g na polpa e 9,82 mg/100g na casca, enquanto no nosso estudo identificamos 0,46 mg/100g na polpa e 9,8 mg/100g na casca.

Além disso, o estudo mencionado demonstrou que a quantidade de α -tocoferol na polpa diminui à medida que o fruto amadurece, enquanto na casca ocorre um aumento. Isso evidencia que a quantidade de tocoferóis pode variar e depender do estágio de maturação em que o fruto foi colhido.

Essas diferenças nos teores de α -tocoferol entre os estudos podem ser atribuídas a fatores como a variação natural entre as frutas, diferentes métodos de análise e até mesmo as condições de cultivo e colheita dos frutos.

O presente estudo demonstrou que o mesocarpo e a casca da toranja podem ser considerados produtos fonte de vitamina E, uma vez que os valores encontrados de tocoferóis correspondem a aproximadamente 25% e 100% respectivamente da ingestão diária recomendada desse micronutriente (10mg/dia) para um adulto saudável (Organização Mundial da Saúde, 2004).

Tabela 6- Tocoferóis (mg/100 g de massa fresca) de polpa, casca e mesocarpo da toranja (*Citrus x paradisi* Macfad)

	Tocoferóis*
Polpa	0,46 ± 0,08 ^c
Casca	9,8 ± 0,3 ^a
Mesocarpo	2,51 ± 0,03 ^b

*Os valores expressos de tocoferóis são referentes a isoforma α -tocoferol. Os resultados são apresentados como média \pm desvio padrão. A análise estatística utilizando análise de variância unidirecional (ANOVA) seguida do teste de Tukey HSD e em cada coluna, diferentes letras significam diferenças significativas ($p < 0,05$) ($n=2$).

4.2.6 Compostos Fenólicos

O perfil de compostos fenólicos presentes no extrato obtido a partir da polpa, da casca e do mesocarpo de *Citrus x paradisi* Macfad está apresentado na **Tabela 7**. A identificação e quantificação dos compostos foi realizada por HPLC-DAD/ESI-MSn. A tentativa de identificação foi realizada tendo por base informação já descrita na literatura (Goulas & Manganaris, 2012; Zhang et al., 2012; Barreca et al., 2013; Castro-Vazquez et al., 2016; Tong et al., 2018; Kaanin-Boudraa et al., 2021; Deng et al., 2022).

O pico **3** ($[M-H]^-$ a m/z 579) foi identificado como naringenina, comparando o tempo de retenção, espectro de absorção e massa com o composto padrão existente no laboratório. Os restantes quatro picos foram tentativamente identificados como derivados de naringenina, sendo o pico **1** ($[M-H]^-$ a m/z 741), **2** ($[M-H]^-$ a m/z 579), **4** ($[M-H]^-$ a m/z 621) e **5** ($[M-H]^-$ a m/z 593), naringenina *O*-triglicosil, narinetina, acetil naringenina e poncirina, respetivamente. A amostra de polpa não apresentou os picos **1** e **4**.

O mesocarpo demonstrou ser a parte de fruta com a maior quantidade de compostos fenólicos (48,4 mg/g de extrato) seguido da casca com 36,7 mg/g de extrato. Estatisticamente, todos os extratos apresentaram diferenças significativas entre si, tanto na quantificação total de compostos quanto na individual.

A literatura relata mais de 40 compostos fenólicos já identificados em *Citrus x paradisi* Macfad. Contudo, a naringina e seus derivados apresentam-se como os flavonóides predominantes, assim como descrito no presente estudo (Goulas & Manganaris, 2012; Kaanin-Boudraa et al., 2021).

Goulas & Manganaris (2012) realizaram um estudo com as variedades de *Citrus x paradisi* Macfad, a variedade “Star Rubi” (a mesma que a utilizada neste estudo), a qual apresentou um maior conteúdo de flavonóides totais, nomeadamente naringenina. Os autores também relatam que a quantificação de compostos fenólicos na casca da

toranja foi até 2,9 vezes maior do que a quantificação na polpa, assemelhando-se ao exposto no presente estudo (quantificação de compostos fenólicos 3,6 vezes maior na casca do que na polpa).

Entretanto, um estudo realizado na China que também avaliou as diferentes partes de *Citrus x paradisi* (11 variedades) apresentou teores em compostos fenólicos maiores na casca da toranja do que no mesocarpo, contrapondo o relatado no presente estudo. Apesar disso, os autores identificaram a polpa da toranja como a parte da fruta com menores quantidades de compostos fenólicos. A naringenina apresenta-se também como o composto fenólico maioritário (Xi et al. 2015).

Em outro estudo, no qual foi avaliada a composição fenólica de sumo de toranja, obteve uma identificação de flavanonas semelhante ao presente estudo (maioritariamente naringenina, naringina, hesperidina e poncirina), contudo, o teor de compostos fenólicos apresentado na polpa foi até quinze vezes menor do que o encontrado em nosso estudo (0,655 mg/g vs. 10,29 mg/g) (Kelebek, 2010). A falta de semelhança entre os resultados pode ser atribuída à amostra utilizada (extrato hidroetanólico vs. sumo obtido da polpa fresca), demonstrando que o extrato hidroetanólico pode ser considerado promissor para se concentrar de forma eficiente compostos de interesse.

Desta forma, o presente estudo demonstra que os principais compostos fenólicos identificados nos extratos de polpa, casca e mesocarpo da toranja foram a naringenina seguida da naringina, compostos responsáveis pelo sabor amargo da toranja assim como por diversas propriedades bioativas.

Caracterização do extrato de resíduos e polpa da toranja (Citrus × paradisi Macfad) com potencial bioativo

Tabela 7- Quantificação e tentativa de identificação dos compostos fenólicos presentes nos extratos da polpa, casca e mesocarpo da toranja (*Citrus x paradisi* Macfad)

Pico	Rt (min)	λmax (nm)	[M-H] ⁻ / [M+H] ⁺ (m/z)	MS ² (m/z)	Tentativa de identificação	Quantificação (mg/g de extrato)			
						Polpa	Casca	Mesocarpo	
1	12,05	286	741	MS2:579(100) MS3:271(100)	O-triglicosil naringenina	vs	1,07 ± 0,02*	0,800 ± 0,01*	
2	19,12	284	579	MS2:271(100)	Naringina	1,01 ± 0,06 ^c	5,0 ± 0,3 ^b	6,8 ± 0,4 ^a	
3	20,36	284	579	MS2:459(34), 271(100)	Naringenina	9,2 ± 0,3 ^c	26,6 ± 0,4 ^b	36 ± 1 ^a	
4	24,85	284	621	MS2:501(12),5 79(76),601(5),2 71(100)	Acetil Naringenina	vs	2,56 ± 0,05*	1,42 ± 0,01*	
5	31,21	284	593	MS2:387(12)32 7 (15),309(5),285 (98)	Poncirina	0,099 ± 0,006 ^c	1,50 ± 0,03 ^b	3,903 ± 0,003 ^a	
Total							10,3 ± 0,4 ^c	36,7 ± 0,7 ^b	48 ± 1 ^a

vs.: vestígios; Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão. Curva de calibração da naringenina ($y = 18433x + 78903$). Diferentes letras significam diferenças significativas ($p < 0,05$) utilizando análise de variância unidirecional (ANOVA) seguida do teste de Tukey HSD. *Significa diferenças estatísticas obtidas por um teste t-student. (n=2).

4.3 Avaliação de bioatividades de extrato obtido da polpa, mesocarpo e casca da toranja (*Citrus x paradisi Macfad*)

4.3.1 Atividade Antimicrobiana

A atividade antimicrobiana do extrato foi avaliada através do método colorimétrico por microdiluição. Foram utilizadas estirpes de microrganismos causadores de patologias (referidos como bactérias clínicas) e microrganismos que são indicadores no controlo de qualidade microbiológica para a indústria alimentar e cosmética (referidos como bactérias e fungos contaminantes). Na **Tabela 8** são apresentadas as concentrações mínimas inibitórias (CMI) dos extratos testados, assim como os valores de CMI de alguns antibióticos utilizados como controlo positivo (estreptomicina, ampicilina, imipenem) e um antifúngico (cetoconazol). Estão destacados a negrito as concentrações nas quais se observou atividade bacteriostática/fungistática, considerando que a concentração máxima testada foi 10 mg/mL.

Todos os extratos apresentaram atividade bacteriostática para *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* e *Salmonella enterica*, e apenas os extratos de polpa e mesocarpo apresentaram atividade bacteriostática para *S. aureus Resistente à Meticilina* (MRSA) e *Staphylococcus aureus*. Destaca-se o extrato da polpa com o melhor desempenho de atividade bacteriostática ao apresentar para além das bactérias citadas, também atividade para *Enterobacter Cloacae*.

Os resultados do nosso estudo vão ao encontro ao que foi reportado por Sahlan et al. (2018) que avaliou a atividade antibacteriana de extrato etanólico de sementes e polpa de toranja e este também apresentou atividade para *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. Cvetnić & Vladimir-knezević (2004) também identificaram atividade antibacteriana para *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica* e *Staphylococcus aureus*, a partir de extrato etanólico de sementes e polpa de toranja, onde o melhor resultado foi para a *Salmonella enterica*, assemelhando-se ao nosso estudo.

Kirbaşlar et al. (2009) utilizou do óleo essencial da casca de toranja para avaliar a atividade contra alguns microrganismos (*Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*,

Escherichia coli, *Salmonella enterica*) e reportou atividade antibacteriana para as estirpes mencionadas, entretanto os valores de CMI relatados foram muito menores do que os encontrados no nosso estudo, fato que pode estar relacionado com a utilização do óleo essencial. Em contrapartida, estudos relatam que óleos essenciais obtidos a partir da casca de *Citrus* podem apresentar moderada a alta toxicidade inviabilizando a utilização na indústria alimentar ou aplicação biológica (Costa et al., 2009; Oliveira et al., 2020b).

Para além das atividades antibacterianas, a casca mostrou o melhor desempenho contra os fungos contaminantes ao apresentar atividade fungistática para as duas espécies testadas, dado que a concentração fungistática mínima para *Aspergillus fumigatus* foi muito próxima à do fármaco cetoconazol utilizado como controlo positivo. Os extratos de polpa e mesocarpo também apresentaram atividade para *Aspergillus fumigatus*. A obtenção de óleos e extratos ativos contra *Aspergillus fumigatus* é importante porque é a principal causa de aspergilose invasiva em pacientes imunocomprometidos, além disso, o *A. fumigatus* têm a capacidade de formar biofilmes em dispositivos biomédicos que entram em contato com a pele, mucosas ou superfícies inertes (Correa-Royero et al., 2010). Com base nessas informações e nos nossos resultados, uma possível aplicação do extrato de *Citrus x paradisi* poderia residir no controlo da formação de biofilmes.

Entretanto, o nosso estudo vai contra o relatado por Khan & Ahmad (2011), que testaram a atividade antifúngica para *Aspergillus fumigatus* de óleo essencial de *Citrus x paradisi* adquirido da empresa Wyndmere Naturals- USA e não reportaram inibição do crescimento da colónia. Essa diferença na atividade antifúngica entre óleos essenciais ou extratos obtidos de frutos da mesma espécie pode ser explicada pela composição química, região geográfica de colheita do fruto, estado de maturação do fruto, método de extração, método utilizado para avaliar a atividade antifúngica ou pelas diferenças intra ou interespecies (Correa-Royero et al., 2010).

A atividade antimicrobiana está diretamente relacionada com os componentes que constituem o extrato, no caso da toranja, a atividade antimicrobiana da casca pode ser atribuída a um dos componentes mais abundantes, o limoneno, consistente com a maioria das espécies cítricas (Uysal et al., 2011; Viuda-Martos et al., 2009). Já a atividade antimicrobiana da polpa pode estar relacionada com o ácido cítrico encontrado maioritariamente nesta parte do fruto, uma vez que já foi reportado a sua atividade

antibacteriana por outros autores (Tomotake et al., 2006; Orhan et al., 2009). Contudo, os extratos não apresentaram valores de CMB e CMF (concentrações mínimas bactericida e fungicidas, respetivamente) para a concentração máxima testada (10 mg/mL).

Caracterização do extrato de resíduos e polpa da toranja (*Citrus × paradisi Macfad*) com potencial bioativo

Tabela 8- Resultados da atividade antimicrobiana dos extratos de polpa, casca e mesocarpo da toranja (*Citrus x paradisi Macfad*)- Concentrações Mínimas Inibitórias (CMI), em mg/mL.

Bactérias Clínicas	CMI (mg/mL)				Controlo Positivo			
	Gram	Polpa	Casca	Mesocarpo	Estreptomicina (1mg/mL)	Ampicilina (10mg/mL)	Imipenem (1mg/mL)	Cetoconazol (1mg/mL)
<i>Escherichia coli</i>	-	10	10	5	N/A	<0.15	<0.0078	N/A
<i>Morganella morganii</i>	-	>10	>10	>10	N/A	10	<0.0078	N/A
<i>Proteus mirabilis</i>	-	>10	>10	>10	N/A	>10	<0.0078	N/A
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	>10	>10	>10	N/A	<0.15	<0.0078	N/A
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	>10	>10	>10	N/A	>10	1	N/A
<i>Listeria monocytogenes</i>	+	10	10	10	N/A	<0.15	N/A	N/A
<i>Enterococcus faecalis</i>	+	>10	>10	>10	N/A	<0.15	<0.0078	N/A
**MRSA	+	10	>10	10	N/A	<0.15	N/A	N/A
Bactérias contaminantes								
<i>Enterobacter Cloacae</i>	-	10	>10	>10	0.007	0.15	N/A	N/A
<i>Escherichia coli</i>	-	5	10	10	0.01	0.15	N/A	N/A
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	>10	>10	>10	0.06	0.63	N/A	N/A
<i>Salmonella enterica</i>	-	5	5	5	0.007	0.15	N/A	N/A
<i>Yersinia enterocolitica</i>	-	>10	>10	>10	0.007	0.15	N/A	N/A
<i>Bacillus cereus</i>	+	>10	>10	>10	0.007	N/A	N/A	N/A
<i>Listeria monocytogenes</i>	+	>10	>10	>10	0.007	0.15	N/A	N/A
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	10	>10	10	0.007	0.15	N/A	N/A
Fungos Contaminates								
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	**N/A	>10	10	>10	N/A	N/A	N/A	0.06
<i>Aspergillus fumigatus</i>	N/A	10	0.6	10	N/A	N/A	N/A	0.5

Nenhum dos extratos apresentou CMB (Concentração mínima bactericida) e CMF (Concentração mínima fungistática). *MRSA: *S. aureus* Resistente à Meticilina; **N/A: não aplicável. (n=2)

4.3.2 Atividade Antioxidante

A atividade antioxidante foi avaliada por meio do TBARS (ensaio *in vitro* baseado na inibição da peroxidação lipídica por substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico), DPPH (baseado na capacidade de captura do radical orgânico colorimétrico 2,2-difenil-1-picrilhidrazil) e OxHLIA (se baseia na inibição da hemólise oxidativa por espécies reativas do AAPH). Os diferentes métodos foram selecionados de modo a avaliar a resposta dos extratos através de diferentes mecanismos.

Os resultados da atividade antioxidante estão apresentados na **Tabela 9** e exibidos como valores de IC₅₀ (valor que representa a concentração de amostra que fornece 50% de atividade antioxidante). Tendo em conta que a atividade é maior conforme menor for a concentração necessária para inibir 50% da oxidação, o menor valor de IC₅₀ representa maior a atividade antioxidante. Sendo assim, o extrato da casca apresentou o melhor resultado nas três metodologias realizadas (TBARS, DPPH e OxHLIA), entretanto, não se detetou diferença quando comparado ao mesocarpo nas análises de DPPH. Apesar de todos os extratos apresentaram atividade antioxidante, o extrato obtido da polpa apresentou o menor potencial.

De igual forma como reportado no nosso estudo, a literatura também reporta dados que comprovam a atividade antioxidante de extratos ou óleos essenciais obtidos a partir das diferentes partes da toranja (Rincón et al., 2005; Guimarães et al., 2010; Kelebek, 2010; Babaoglu et al., 2022; Deng et al., 2022). A atividade antioxidante do extrato hidroetanólico de mesocarpo e casca apresentados neste estudo, demonstra valores superiores de atividade antioxidante quando comparados a Agudelo et al. (2017) que realizou um estudo com diferentes formulações de toranja liofilizada, onde o melhor resultado obtido pelos autores foi no ensaio de TBARS com uma amostra de toranja líquida liofilizada, (IC₅₀ de 1,65 mg/mL), sendo este valor bastante menor do que o obtido no nosso extrato (IC₅₀ de 0,181 mg/mL).

Guimarães et al. (2010) também avaliaram o potencial antioxidante de diferentes partes de toranja através da inibição da peroxidação lipídica por reatividade ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), os autores observaram que a casca da fruta apresenta a melhor atividade antioxidante, indo ao encontro ao reportado no nosso estudo, contudo, o extrato obtido da casca no nosso estudo, apresenta maior potencial antioxidante (IC₅₀ de 0,181 mg/mL) do que as duas partes testados pelos autores, nomeadamente fração polar da casca (IC₅₀ de 0,51 mg/mL) e fração volátil da casca (IC₅₀ de 67,37 mg/mL).

Num estudo realizado por Kelebek (2010) a variedade de toranja utilizada neste estudo (Star Ruby) demonstrou a melhor atividade antioxidante (0,19 mL/mg de DPPH) em comparação com outras variedades de *Citrus x paradisi*, nomeadamente Rio Red e Ruby Red, que apresentaram valores de 0,32 e 0,41 mL/mg de DPPH, respetivamente.

Num estudo realizado por Durmus (2019) foi avaliado o efeito de nanoemulsão à base de óleo essencial de toranja na vida útil de filés de truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) refrigerados durante o armazenamento, e estes demonstraram um bom potencial antioxidante em comparação com o controlo utilizado. Outro estudo que utilizou extratos de flavedo e casca de toranja como antioxidantes naturais para melhorar a estabilidade de hambúrgueres de peru durante o armazenamento refrigerado, apresentou o extrato da casca da toranja como sendo o extrato com maior potencial antioxidante em comparação aos outros extratos em estudo (flavedo e casca de pomelo) (Babaoglu et al., 2022).

A atividade antioxidante superior da casca em relação aos outros extratos pode estar relacionada com a alta concentração da naringenina e seus derivados, principalmente a O-triglicosil naringenina e Acetil naringenina, compostos fenólicos que se encontram em maior quantidade na casca (**Tabela 7**) e com comprovada atividade antioxidante já descrita por outros autores (Zheng et al., 2019; Huang et al., 2022). Com base no que foi apresentado na literatura e neste estudo, extratos obtidos da casca de toranja apresentam um bom potencial antioxidante com possível aplicação na indústria alimentar.

Tabela 9- Atividade antioxidante baseada em extratos de polpa, casca e mesocarpo da toranja avaliada por ensaio de TBARS, DPPH e OxLIA

	IC ₅₀ (mg/mL)		
	TBARS	DPPH	OxLIA ($\Delta t = 60$ min)
Polpa	1,33 ± 0,05 ^a	12,9 ± 0,8 ^a	128±7 ^a
Casca	0,181 ± 0,003 ^c	6,9 ± 0,7 ^b	26±1 ^c
Mesocarpo	0,8 ± 0,2 ^b	8,2 ± 0,3 ^b	43±3 ^b
Trolox	*N/A	N/A	21,8±0,2

*N/A: não aplicável. Os resultados são apresentados como média ± desvio padrão. A análise estatística utilizando análise de variância unidirecional (ANOVA) seguida do teste de Tukey HSD e diferentes letras significam diferenças significativas ($p < 0,001$). (n=3)

4.3.3 Atividade anti-inflamatória, citotóxica e hepatóxica

A atividade anti-inflamatória foi avaliada através da capacidade de inibição da produção de óxido nítrico (NO) por macrófagos de camundongos RAW 264.7, após estímulo à resposta inflamatória por lipopolissacarídeos (LPS). A dexametasona foi utilizada como controlo positivo. Os resultados são expressos em valores de IC₅₀ que representam a concentração de cada um dos extratos que causa a inibição de 50% da produção de óxido nítrico. Os extratos da toranja, não apresentaram atividade anti-inflamatória na concentração máxima testada, como descrito na **Tabela 10**.

A fim de avaliar a atividade citotóxica dos extratos, foram utilizadas linhagens de células tumorais humanas: AGS (adenocarcinoma gástrico), CaCo2 (adenocarcinoma colorretal), MCF-7 (adenocarcinoma de mama), NCI-H460 (carcinoma pulmonar) e como um controlo positivo foi feito o uso da elipticina. Os resultados estão apresentados na **Tabela 10**, estes foram expressos em valores de GI₅₀, que correspondem à concentração de extrato com a capacidade de inibir o crescimento celular em 50%. Menores valores de GI₅₀ representam maior atividade inibitória, sendo assim, para as linhas tumorais, valores de GI₅₀ baixos são preferíveis, pois indicam a capacidade do extrato em exercer efeito no impedimento da proliferação das células, entretanto, nenhum dos extratos apresentou atividade citotóxica na concentração máxima testada.

Contudo, a literatura relata o potencial citotóxico de óleos essenciais obtidos a partir de cascas ou sementes de toranja (Rosa et al., 2019; Yaldiz et al., 2022). Por sua

vez, os óleos essenciais concentram compostos a partir de frações apolares lipídicas e, portanto, podem apresentar diferentes propriedades em relação a extratos etanólicos ou hidroetanólicos (Vitti & Brito, 2003), além de que, as atividades citotóxicas citadas nos estudos foram feitas utilizando diferentes linhas de células, nomeadamente células HeLa.

Considera-se hepatite tóxica a lesão do fígado causada por agentes farmacológicos ou químicos (Matos & Martins, 2005). Para avaliar a hepatotoxicidade foi utilizada a linha celular não tumoral PLP2, esta é uma cultura primária obtida de fígado de porco, a fim de simular o fígado humano. Os resultados também foram expressos em valores de GI₅₀ (**Tabela 10**), valores altos de GI₅₀ são preferíveis de modo que sugere maior segurança para a integridade das células normais. Nenhum dos extratos apresentou hepatotoxicidade nas concentrações mínimas testadas, demonstrando a possível viabilidade de incorporação dos extratos em produtos alimentares.

Tabela 10- Atividade anti-inflamatória, citotoxicidade e hepatotoxicidade do extrato da polpa, mesocarpo e casca da toranja (*Citrus x paradisi Macfad*)

	Citotoxicidade				Hepatotoxicidade	Atividade anti-inflamatória
	(GI ₅₀ , µg/mL)				(GI ₅₀ , µg/mL)	(IC ₅₀ , µg/mL)
	Ags	CaCo2	MCF-7	NCI	PLP2	RAW
Polpa	>400	>400	>400	>400	>400	>400
Mesocarpo	>400	>400	>400	>400	>400	>400
Casca	>400	>400	>400	>400	>400	>400
Elipticina	1,0 ± 0,1	1,9 ± 0,6	0,9 ± 0,1	1,1 ± 0,2	3,2 ± 0,7	-
Dexametasona	-	-	-	-	-	16 ± 1

Os resultados são apresentados como média ± desvio padrão. Os valores de GI₅₀ correspondem à concentração de extrato com a capacidade de inibir o crescimento celular em 50%. Os valores de IC₅₀ correspondem a concentração de cada um dos extratos que causa a inibição de 50% da produção de óxido nítrico.

CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPETIVAS FUTURAS

O presente estudo confirmou a alta percentagem de bio-resíduos (32,3% - casca e mesocarpo) que compõem a toranja, reafirmando a importância da caracterização química das diferentes partes do *Citrus x paradisi* Macfad, assim como encontrar alternativas rentáveis às partes não consumidas, através de avaliações de bioatividades.

Na análise estatística, foram encontradas diferenças nas composições centesimais das partes da toranja em relação à humidade, lípidos, proteínas, cinzas, hidratos de carbono e fibras. A quantidade de fibras encontrada no mesocarpo da fruta foi especialmente destacada, sendo seis vezes maior do que na polpa. Considerando a importância das fibras na alimentação humana, o mesocarpo pode ser considerado uma excelente fonte desse nutriente e pode ser utilizado no enriquecimento de produtos processados. Além disso, o mesocarpo também apresentou uma concentração significativa de vitamina C (53 mg/100g) e vitamina E (25% da recomendação diária), tornando-se uma fonte interessante desses micronutrientes.

Em relação as bioatividades, todos os extratos apresentaram capacidades antimicrobianas e antioxidantes. O extrato obtido da polpa foi destaque em relação à atividade antibacteriana, apresentando atividade bacteriostática para *Enterobacter Cloacae* e *Escherichia coli* em concentrações mínimas inibitórias mais baixas (5mg/mL) do que os outros extratos. O extrato obtido da casca mostrou-se promissor contra o espécie de fungo *Aspergillus fumigatus*, apresentando inibição do crescimento fúngico em concentrações muito baixas (0,6 mg/mL).

Em relação à atividade antioxidante, o extrato obtido da casca destacou-se apresentando os melhores valores nas três diferentes metodologias testadas (TBARS, DPPH e OxHLIA). Além disso, o extrato da casca também foi a parte que apresentou o melhor rendimento (58%), justificando a sua utilização entre os bio-resíduos da toranja analisados (casca e mesocarpo) como a parte mais promissora para extração e incorporação em produtos alimentares funcionais, a fim de se aproveitar das suas propriedades bioativas.

Como perspetivas futuras, seria interessante a investigação da segurança do consumo humano da casca e mesocarpo, uma vez que estes bio-resíduos demonstraram

boa composição centesimal, podendo ser utilizadas misturas destes bioresíduos (avaliando efeitos sinérgicos) de forma a poderem ser adicionados à alimentação humana fomentando a redução de desperdícios com impacto a nível ambiental e económico.

Também é pretendido a otimização da extração de compostos de alto valor acrescentado através da comparação de distintas técnicas e variáveis, tais como tempo, temperatura e solventes, de forma a garantir as condições ótimas que maximizam o rendimento e a pureza dos extratos obtidos. A fim de confirmar e avaliar de forma mais profunda as propriedades dos extratos, seria interessante realizar a incorporação num produto alimentar, cosmético ou da indústria farmacêutica, assim como proceder à investigação e caracterização das propriedades desses produtos após a incorporação do extrato.

REFERÊNCIAS

- Aadil, R.M., Zeng, X.-A., Wang, M.-S., Liu, Z.-W., Han, Z., Zhang, Z.-H., Hong, J. and Jabbar, S. (2015), A potential of ultrasound on minerals, micro-organisms, phenolic compounds and colouring pigments of grapefruit juice. *Int J Food Sci Technol*, 50: 1144-1150. <https://doi.org/10.1111/ijfs.12767>
- Abdel-Samie, M. & Abdulla, G. (2016). Effect of Baking on Stability of Phenolic and Flavonoid Compounds and Quality of Tigernut Enriched Crackers. *Suez Canal University Journal of Food Sciences*. 3. 1-8. DOI: 10.21608/scuj.2016.6656.
- Adnan, M., Jha, R. K., Verma, P., Shah, H. N., & Singh, P. (2022). Skin grafting, cryopreservation, and diseases: A review article. *Cureus*, 14(10).
- Agudelo C., Barros L., Santos-Buelga C., Martínez-Navarrete N. & Ferreira I. C.F.R. (2017). Phytochemical content and antioxidant activity of grapefruit (Star Ruby): A comparison between fresh freeze-dried fruits and different powder formulations. *Food Science and Technology*. 106-112.
- Albertini, M. V., Carcouet, E., Pailly, O., Gambotti, C., Luro, F., & Berti, L. (2006). Changes in organic acids and sugars during early stages of development of acidic and acidless citrus fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(21).
- Albuquerque, B. R., Heleno, S. A., Oliveira, M. B. P., Barros, L., & Ferreira, I. C. (2021). Phenolic compounds: Current industrial applications, limitations and future challenges. *Food & function*, 12(1), 14-29.
- Assis, P. D. P., Oiano Neto, J., da Rosa, J. S., Pacheco, S., de Souza, A. M., Furtado, A., & Dutra, A. D. S. (2011). Alternativas de utilização dos resíduos gerados na indústria produtora de suco de tangerina murcote (*Citrus reticulata*). *XXIV Encontro Regional da Sociedade Brasileira de Química*.
- Alves, C. Q. (2007). Avaliação da atividade antioxidante dos flavonóides. *Diálogos e Ciência*, n. 12.

- Amaral, S. M. B., Bessa, M. J., Cavalcante, M. R. F., Freitas, F. N. F., Maia, M. B. V., Costa Júnior, R. A. & Damaceno, M. N. (2021). Orange residues in the preparation of food products: A review. *Research, Society and Development*, [S. 1.], v. 10, n. 6, p. e0910615373. DOI: 10.33448/rsd-v10i6.15373.
- AOAC. (2019). *Official methods of analysis of AOAC International*, 21th edition. Association of Official Analytical Chemists International; Arlington; USA.
- Aronson, J.K. DPhil, M.A. (2016). Ticagrelor. Meyler's Side Effects of Drugs: The International Encyclopedia of Adverse Drug Reactions and Interactions (Fifteenth Edition).
- Assefa, A.D., Saini, R.K. & Keum, YS. Fatty acids, tocopherols, phenolic and antioxidant properties of six citrus fruit species: a comparative study. *Food Measure* **11**, 1665–1675 (2017).
- Aydeniz-Guneser, B. (2020). Cold pressed orange (*Citrus sinensis*) oil. In *Cold Pressed Oils. Academic Press*, chapter 12, 129-146 p.
- Babaoglu, A.S., Ainiwaer, T. & Özkan, H. (2022). Grapefruit and pomelo peel extracts as natural antioxidants for improved storage stability of Turkey patties during refrigerated storage. *Journal Food Science and Technology* **59**: 4067–4074. <https://doi.org/10.1007/s13197-022-05458-5>
- Bailey, D.G., G. Dresser, and J.M. Arnold. (2013). Grapefruit–medication interactions: Forbidden fruit or avoidable consequences? *Can. Med. Assoc. J.* **185**:309–316. DOI: 10.1503/cmaj.120951
- Barreca, D., Bisignano, C., Ginestra, G., Bisignano, G., Bellocco, E., Leuzzi, U., & Gattuso, G. (2013). Polymethoxylated, C- and O-glycosyl flavonoids in tangelo (*Citrus reticulata* × *Citrus paradisi*) juice and their influence on antioxidant properties. *Food Chemistry*, **141**(2), 1481-1488.

- Barros, H. R. M., Ferreira, T. A., & Genovese, M. I. (2012). “Antioxidant capacity and mineral content of pulp and peel from commercial cultivars of citrus from Brazil,” *Food Chemistry*, 134(4), 1892–1898.
- Barros, L., Pereira, C., & Ferreira, I.C.F.R. (2013b). Optimized analysis of organic acids in edible mushrooms from Portugal by ultra-fast liquid chromatography and photodiode array detection. *Food Analytical Methods*, 6, 309–316
- Barros, L.; Pereira, E., Calhella, R. C., Duenas, M., Carvalho, A. M., Santos-Buelga, C., & Ferreira, I. C. F. R. (2013a). Bioactivity and chemical characterization in hydrophilic and lipophilic compounds of *Chenopodium ambrosioides* L. *Journal of Functional Foods*, 5(4), 1732-1740.
- Barros, L., Dueñas, M., Dias, M. I., Sousa, M. J., Santos-Buelga, C., & Ferreira, I. C. F. R. (2013c). Phenolic profiles of cultivated, in vitro cultured and commercial samples of *Melissa officinalis* L. infusions. *Food Chemistry*, 136(1), 1–8. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.07.107>
- Benelli, P. (2012). *Agregação de valor ao bagaço de laranja (Citrus sinensis L. Osbeck) mediante obtenção de extratos bioativos através de diferentes técnicas de extração*. Dissertação de Mestrado - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Florianópolis.
- Bessada, S. M., Barreira, J. C. M., Barros, L., Ferreira, I. C. F. R., & Oliveira, M. B. P. P. (2016). Phenolic profile and antioxidant activity of *Coleostephus myconis* (L.) Rchb. f.: An underexploited and highly disseminated species. *Industrial Crops and Products*, 89, 45–51.
- Caleja, C., Barros, L., Antonio, A.L., Carcho, M., Oliveira, M.B.P.P., & Ferreira, I.C.F.R. (2016). Fortificação de iogurtes com diferentes conservantes antioxidantes: Um estudo comparativo entre aditivos naturais e sintéticos. *Food Chemistry*, 210, 262–268.

- Cardeñosa, V., Barreira, J., Barros, L., Arenas-Arenas, F., Moreno-Rojas, J., & Ferreira, I. (2015). Variety and Harvesting Season Effects on Antioxidant Activity and Vitamins Content of *Citrus sinensis* Macfad. *Molecules*, 20(5), 8287–8302.
- Carvalho, R. (2003). *Variabilidade cromossômica e relação entre espécies e cultivares de Citrus L.* Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) Universidade Federal de Pernambuco. Recife.
- Castro-Vazquez, L., Alañón, M. E., Rodríguez-Robledo, V., Pérez-Coello, M. S., Hermosín-Gutierrez, I., Díaz-Maroto, M. C. & Arroyo-Jimenez, M. D. M. (2016). Bioactive flavonoids, antioxidant behaviour, and cytoprotective effects of dried grapefruit peels (*Citrus paradisi* Macf.). *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016.
- Cavalari, T. G., & Sanches, R. A. (2018). Os efeitos da Vitamina C. *Revista saúde em foco*, 749-765.
- Chahdoura, H., Morales, P., Barreira, J. C., Barros, L., Fernández-Ruiz, V., Ferreira, I. C., & Achour, L. (2015). Dietary fiber, mineral elements profile and macronutrients composition in different edible parts of *Opuntia microdasys* (Lehm.) Pfeiff and *Opuntia macrorhiza* (Engelm.). *LWT-Food Science and Technology*, 64(1), 446-451.
- Chaves, M. P. (2017). *Efeitos da suplementação do ácido graxo alfa-linolênico (ALA) no metabolismo e no estresse do retículo endoplasmático em tecido adiposo visceral de obeso grau III.* Tese de Doutorado, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto. doi:10.11606/T.17.2018.tde-24042018-173433.
- Chun, J., Lee, J., Ye, L., Exler, J., and Eitenmiller, R. R. (2006). Tocopherol and tocotrienol contents of raw and processed fruits and vegetables in the United States diet. *Journal Food Composition Anal.* 19, 196–204. doi: 10.1016/j.jfca.2005.08.001
- Correa-Royero, J., Tangarife, V., Durán, C., Stashenko, E. & Mesa-Arango, A. (2010). In vitro antifungal activity and cytotoxic effect of essential oils and extracts of medicinal and aromatic plants against *Candida krusei* and *Aspergillus fumigatus*. *Revista*

Brasileira de Farmacognosia. 5:734-741. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2010005000021>.

- Costa, J. G. M., Sousa, E. O., Rodrigues, F. F. G., Lima, G. S. & Braz-Filho, R. (2009). Composição química e avaliação das atividades antibacteriana e de toxicidade dos óleos essenciais de *Lantana camara L.* e *Lantana sp.*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 19: 710-714. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2009000500010>.
- Cvetnić Z, Vladimir-Knezević S. (2004). Antimicrobial activity of grapefruit seed and pulp ethanolic extract. *Acta Pharmaceutica (Zagreb, Croatia)*. 54(3):243-250.
- Czech, A., Malik, A., Sosnowska, B., & Domaradzki, P. (2021). Bioactive substances, heavy metals, and antioxidant activity in whole fruit, peel, and pulp of citrus fruits. *International Journal of Food Science*, 2021, 1-14.
- Czech, A., Zarycka, E., Yanovych, D., Tarasenko, T., Skrypka, I., & Martysiuk, S. (2020). Mineral Content of the Pulp and Peel of Various Citrus Fruit Cultivars. *Biological Trace Element Research*, 193(2), 555–563. <https://doi.org/10.1007/s12011-019-01727-1>
- Dallas, C., Gerbi, A., Elbez, Y., Caillard, P., Zamaria, N., & Cloarec, M. (2014). Clinical study to assess the efficacy and safety of a citrus polyphenolic extract of red orange, grapefruit, and orange (Sinetrol-XPur) on weight management and metabolic parameters in healthy overweight individuals. *Phytotherapy Research*, 28(2), 212-218.
- Damayanti, S., Permana, B., & Weng, C.C. (2012). Determination of Sugar Content in Fruit Juices Using High Performance Liquid Chromatography. *Acta Pharmaceutica Indonesia*.
- Damiani, C., Martins, G. A. D. S., & Becker, F. S. (2020). Aproveitamento de resíduos vegetais: potenciais e limitações. 64p.
- Das, A. K., Rajkumar, V., Nanda, P. K., Chauhan, P., Pradhan, S. R., & Biswas, S. (2016). Antioxidant efficacy of lychee (*Litchi chinensis*, Sonn.) pericarp extract in sheep meat nuggets. *Antioxidants*, 5, 1–10.

- de Sousa Filho, M. A. C., de Melo Evangelista, L. S., Barros, F. N., da Silva, J. H. L., de Oliveira, A. M. S., de Sousa Cavalcante, M. M. A., ... & de Souza, J. A. T. (2021). Efeito da adição do ácido palmítico e da vitamina E ao diluidor Tris-gema na criopreservação de sêmen canino. *Acta Scientiae Veterinariae*, 49, 1839.
- Deng, M., Dong, L., Jia, X., Huang, F., Chi, J., Muhammad, Z. & Zhang, R. (2022). The flavonoid profiles in the pulp of different pomelo (*Citrus grandis* L. Osbeck) and grapefruit (*Citrus paradisi* Mcfad) cultivars and their in vitro bioactivity. *Food chemistry: X*, 15, 100368.
- Deng W., Liu K., Cao S., Sun J., Zhong B., & C. Jiong. (2020). Chemical Composition, Antimicrobial, Antioxidant, and Antiproliferative Properties of Grapefruit Essential Oil Prepared by Molecular Distillation. *Molecules*, v. 25. DOI: 10.3390/molecules25010217
- Dias M. E. (2019). Aproveitamento de compostos fenólicos de bioresíduos de polpa de café (*Coffea arábica* Lineu). Dissertação de Mestrado (Qualidade e Segurança Alimentar). Instituto Politécnico de Bragança.
- Dias, M., Caleja, C., Pereira, C., Calhelha, R. C., Kostic, M., Sokovic, M., ... & Ferreira, I. C. (2020). Chemical composition and bioactive properties of byproducts from two different kiwi varieties. *Food Research International*, 127, 108753.
- Dias, M. I. Barros, L. Morales, P. Sánchez-Mata, M.C. Oliveira, M.B.P.P. Ferreira, I.C.F. (2015). Nutritional parameters of infusions and decoctions obtained from *Fragaria vesca* L. roots and vegetative parts. *LWT- Food Science and Technology*. 62 (1). 32-38. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.01.034>
- Dugo, G. & A. Di Giacomo. (2002). *Citrus: the genus citrus. Medicinal and aromatic plants-industrial profiles* v.26. London, New York.642 p.
- Durmus, M. (2019). The effects of nanoemulsions based on citrus essential oils (orange, mandarin, grapefruit, and lemon) on the shelf life of rainbow trout (*Oncorhynchus*

mykiss) fillets at 4 ± 2°C. *Journal Food Safety*. 40:12718.
<https://doi.org/10.1111/jfs.12718>

Fernandes, J. B., David V., Facchini P. H., M., Silva F. G. F., F. E. R. & Vieira P. C.(2002). Citrus seed oils extractions and their activity against leaf cutting ant *Atta sexdens* and its symbiotic fungus. *Química Nova* n.25. DOI: 10.1590/S0100-40422002000700009

Fernández-Ruiz, V., Cámara, M. & Quintela, J. C. (2007). Bioactive ingredients in tomatoes: Lycopene. *Nutricion Clínica y Dietetica Hospitalaria*. 27. 36-40.

Food and Agriculture Organization of the United Nations - FAO. (2021). *World Food and Agriculture – Statistical Yearbook*. Rome.

Food Ingredients. Pectinas propriedades e aplicações. *Revista Food Ingredientes Brasil*. (2014). n.29, p.46-53.

Galli, F., Siani, A., Pastori, D., Fittipaldi, L., Evangelista, V., Angelico, F., & Poli, A. (2022). Vitamin E (alpha-tocopherol) metabolism and nutrition in chronic kidney disease. *Antioxidants*, 11(5), 989.

Giada, M. D. L. R. (2013). Food phenolic compounds: main classes, sources and their antioxidant power. Oxidative stress and chronic degenerative diseases: a role for antioxidants. *Zagreb: InTech*. p. 87-112.

Ginwala, R., Bhavsar, R., Chigbu, D. G. I., Jain, P., & Khan, Z. K. (2019). Potential role of flavonoids in treating chronic inflammatory diseases with a special focus on the anti-inflammatory activity of apigenin. *Antioxidants*, 8(2), 35.

Gonçalves, G.A., Soares, A.A., Correa, R.C.G., Barros, L., Haminiuk C.W.I., Peralta R.M., Ferreira I.C.F.R., Bracht A. (2017) Merlot grape pomace hydroalcoholic extract improves the oxidative and inflammatory states of rats with adjuvant-induced arthritis. *Journal of Functional Foods*, 33, 408-418.

- Goulas, V., & Manganaris, G. A. (2012). Exploring the phytochemical content and the antioxidant potential of Citrus fruits grown in Cyprus. *Food chemistry*, 131(1), 39-47.
- Guimarães, R., Barros, L., Barreira, J. C. M., Sousa M. J., Carvalho A. M. & Ferreira, I. C.F.R. (2010). Targeting excessive free radicals with peels and juices of citrus fruits: Grapefruit, lemon, lime and orange. *Food and Chemical Toxicology*, 48:99-106. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2009.09.022>.
- Guimarães, R., Barros, L., Dueñas, M., Calhêla, R. C., Carvalho, A. M., Santos- Buelga, C., Queiroz, M. J. R. P., & Ferreira, I. C. F. R. (2013). Infusion and decoction of wild German chamomile: Bioactivity and characterization of organic acids and phenolic compounds. *Food Chemistry*, 136, 947–954.
- Guinaz, M., Milagres, R. C. R. M., Pinheiro-Sant'Ana, H. M., & Chaves, J. B. P. (2009). Tocoferóis e tocotrienóis em óleos vegetais e ovos. *Química Nova*, 32. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422009000800021>
- Guiné, R. P., & Henriques, F. (2011). O papel dos ácidos gordos na nutrição humana e desenvolvimentos sobre o modo como influenciam a saúde. *Millenium*, (40), 7-21.
- Hanley, M. J., Cancalon P. W., Widmer, W. W. & Greenblatt, D.J. (2011). The effect of grapefruit juice on drug disposition. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* 7:267–286. <https://doi.org/10.1517/17425255.2011.553189>
- Hayashi, A.A. (2003). *Efeito da suplementação com ácido linoléico conjugado (CLA) na composição do leite, no perfil de ácidos graxos e na atividade de enzimas lipogênicas em ratas lactantes*. Tese para obtenção do grau de Mestre. Universidade de São Paulo.
- Heleno, S.A., Ferreira, I.C.F.R., Esteves, A.P., Ćirić, A., Glamočlija, J., Martins, A., Soković, M., Queiroz, M.J.R.P. (2013). Antimicrobial and demelanizing activity of *Ganoderma lucidum* extract, p-hydroxybenzoic and cinnamic acids and their synthetic acetylated glucuronide methyl esters. *Food Chem. Toxicol.* 58, 95–100.

- Horvath, G., Wessjohann, L., Bigirimana, J., Jansen, M., Guisez, Y., Caubergs, R., et al. (2006). Differential distribution of tocopherols and tocotrienols in photosynthetic and non-photosynthetic tissues. *Phytochemistry* 67, 1185–1195. doi: 10.1016/j.phytochem.2006.04.004
- Houda, A. N. Ali B., Ahmed A., Salah O. & Yazid F. (2020). Chemical composition, antimicrobial and insecticidal activities of *citrus paradisi* peel essential oil from algeria. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*. 1094-1098. DOI: 10.15414/jmbfs.2020.9.6.1093-1098
- Jenkins, D. J. A., Srichaikul, K., Kendall, C. W. C., Sievenpiper, J. L., Abdalnour, S., Mirrahimi, A., & Leiter, L. A. (2011). The relation of low glycaemic index fruit consumption to glycaemic control and risk factors for coronary heart disease in type 2 diabetes. *Diabetologia*, 54, 271-279.
- Kaanin-Boudraa, G., Brahmi, F., Wrona, M., Nerín, C., Moudache, M., Mouhoubi, K. & Boulekbache-Makhlouf, L. (2021). Response surface methodology and UPLC-QTOF-MSE analysis of phenolic compounds from grapefruit (*Citrus × paradisi*) by-products as novel ingredients for new antioxidant packaging. *LWT*, 151, 112158.
- Kelebek H. (2010). Sugars, organic acids, phenolic compositions and antioxidant activity of Grapefruit (*Citrus paradisi*) cultivars grown in Turkey. *Industrial Crops and Products*, v.32. 269-274, ISSN 0926-6690.
- Khan, M. S. A., & Ahmad, I. (2011). Antifungal activity of essential oils and their synergy with fluconazole against drug-resistant strains of *Aspergillus fumigatus* and *Trichophyton rubrum*. *Applied microbiology and biotechnology*, 90, 1083-1094.
- Kirbaşlar, F. G., Tavman, A., Dülger, B., & Türker, G. (2009). Antimicrobial activity of Turkish citrus peel oils. *Pak. J. Bot*, 41(6), 3207-3212.
- Latocha, P. (2017). The Nutritional and Health Benefits of Kiwiberry (*Actinidia arguta*) – a Review. *Plant Foods Hum Nutr*, 72:325–334

- Lattanzio, V. (2013). Phenolic Compounds: Introduction. Natural Products: Phytochemistry, Botany and Metabolism of Alkaloids, *Phenolics and Terpenes*, 2013, p. 1543-1580.
- Lockowandt, L., Pinela, J., Roriz, C. L., Pereira, C., Abreu, R. M. V., Calhella, R. C., Alves, M. J., Barros, L., Bredol, M., & Ferreira, I. C. F. R. (2019). Chemical features and bioactivities of cornflower (*Centaurea cyanus* L.) capitula: The blue flowers and the unexplored non-edible part. *Industrial Crops and Products*, 128, 496–503.
- Louzada, E. & Ramadugu, C. (2021). Grapefruit: History, Use, and Breeding. *HortTechnology*. 1-16. DOI:10.21273/HORTTECH04679-20
- Machado, W. R. C., Filippin A. P., Silva L. M., Silva, H. D. M., Hoffmann, R. M. (2021). Incorporation of phenolic compounds in food products: a review. *Brazilian Journal of Development*. 7(5): 46470-46499.
- Martin, C. A., Almeida, V. V. D., Ruiz, M. R., Visentainer, J. E. L., Matshushita, M., Souza, N. E. D., & Visentainer, J. V. (2006). Omega-3 and omega-6 polyunsaturated fatty acids: importance and occurrence in foods. *Revista de Nutrição*, 19(6), 761-770.
- Matos, L. C., Martins, B. (2005). Toxic hepatitis: literature review. *Sociedade Portuguesa de Medicina Interna*. 12(4): 239-258.
- Melo, M. R.C. (2012). *Compêndio de Ciências do Homem, da Alimentação e Nutrição Humana*, Plátano Editora.
- Menezes, B. S. N. (2020). *Aproveitamento de bio-resíduos de Ilex paraguariensis A. St. Hil. para a obtenção de um extrato rico em compostos fenólicos com potencial conservante*. 94p. Dissertação (Mestrado em Qualidade e Segurança Alimentar) Instituto Politécnico de Bragança.
- Ministério do Ambiente e do Ordenamento do Território. (2011). “Decreto Lei n.º 116/2011” Diário da República, Série I (junho): 3251 – 3300. <https://dre.pt/dre/detalhe/decreto-lei/73-2011-670034>

- Mohammed N. A. Khalil, Hebatullah H. Farghal, Mohamed A. Farag. (2022). Outgoing and potential trends of composition, health benefits, juice production and waste management of the multi-faceted Grapefruit *Citrus x paradisi*: A comprehensive review for maximizing its value. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 62 (4), 935- 956. <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1830364>
- Monselise, S. P., & Galily, D. (1979). Organic Acids in Grapefruit Fruit Tissues. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 104(6), 895-897.
- Moo-Huchin, V. M., Moo-Huchin, M. I., Estrada-León, R. J., Cuevas-Glory, L., Estrada-Mota, I. A., Ortiz-Vázquez, E., ... & Sauri-Duch, E. (2015). Antioxidant compounds, antioxidant activity and phenolic content in peel from three tropical fruits from Yucatan, Mexico. *Food chemistry*, 166, 17-22.
- Nascimento, K. S. (2016). *Compostos fenólicos, capacidade antioxidante, e propriedades físico-químicas de méis de Apis melífera do Estado do Rio Grande do Sul*. Dissertação de Mestrado (Ciências de Alimentos). Universidade de São Paulo. 83p.
- Neto J. O. (2010). Aspectos químicos e qualidade nutricional dos alimentos. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. DOI:10.13140/RG.2.1.3380.5927
- Novello, D., Franceschini, P., & Quintiliano, D. A. (2008). A importância dos ácidos graxos ω -3 e ω -6 para a prevenção de doenças e na saúde humana. *Revista Salus*, 2(1).
- Nunes, P. M.P., Smolarek, F.S.F., Kaminski, G. A. T., Fin, M.T., Zanin, S. M.W. Miguel, M. D., Miguel, O. G. (2009). The importance of the development of industrial waste of seed of *Citrus*. *Visão Acadêmica*, Curitiba, v.10, n.1. 97-110.
- Oliveira, A. K. M. D. (2020a). *Aproveitamento integral de alimentos e aceitabilidade de preparações por crianças em organização não governamental de João Pessoa/PB*. Trabalho de conclusão de curso em Gastronomia. Universidade Federal da Paraíba. 26 p.
- Oliveira, E., Araújo, G. P., Santos R. J. S., Rosa, A. B., Carvalho, P. V. O. & Teles, R. G. (2020b). Caracterização química, atividade antimicrobiana e toxicidade dos óleos

essenciais da Pimenta dioica L. (pimenta da Jamaica) e Citrus sinensis L. Osbeck (laranja doce). *Revista Colombiana de Ciencias Químico - Farmacéuticas*, 49(3): 641-655. <https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v49n3.91253>

Oliveira, N. A. S., Winkelmann, D. O. V., & Tobal, T. M. (2019). Flour and byproducts of mombuca blood orange: chemical characterization and application in ice cream. *Brazilian Journal of Food Technology*, 22p. <https://doi.org/10.1590/1981-6723.24618>

Organização Mundial da Saúde, *Observatório Global de Saúde (GHO)*. (2012). Organização Mundial da Saúde, Genebra, 2012.

Organização Mundial da Saúde (OMS). (2008). *Worldwide prevalence of anaemia 1993-2005: WHO global database on anemia*. (Benoist, B., McLean, E., Egli, I., & Cogswell, M., Eds.). Genebra, 2008.

Organização Mundial da Saúde. (2004). *Vitamin and mineral requirements in human nutrition*, 2nd, 341p. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/42716>

Orhan, M., Kut, D., & Gunesoglu, C. (2009). Improving the antibacterial activity of cotton fabrics finished with triclosan by the use of 1, 2, 3, 4-butanetetracarboxylic acid and citric acid. *Journal of Applied Polymer Science*, 111(3), 1344-1352.

Pereira R. C. & Angelis-Pereira M. M. (2014). Compostos fenólicos na saúde humana: do alimento ao organismo. Universidade Federal de Lavras, 90p.

Pereira R. S. P. (2017). Toranja: benefícios e riscos para a saúde. Faculdade Ciências da Saúde, Universidade Fernando Pessoa. Porto, 37p.

Pereira, E., Barros, L., Calhelha, R. C., Duenas, M., Carvalho, A. M., Santos-Buelga, C., & Ferreira, I. C. (2014). Bioactivity and phytochemical characterization of *Arenaria montana* L. *Food & function*, 5(8), 1848-1855.

- Pereira, J. P. J., Oliveira, L. P., Navarro, B. V., Soldi, M. C. M. M. (2022). Sinalização e percepção de açúcares em plantas. *Botânica no Inverno 2022*. Universidade de São Paulo. Cap. 7: 102-115.
- Pereira. K. D., Faccio M. T., Dutra L. M. G., Linhares N. P. & Silva P. S. G. (2012). *Extração líquido-líquido do β -caroteno e licopeno da polpa do tomate e análise por ccd (cromatografia de camada delgada)*. Encontro Nacional de Educação, Ciência e Tecnologia, João Pessoa, Brazil.
- Pereira-Netto, A. B. (2018). Tropical Fruits as Natural, Exceptionally Rich, Sources of Bioactive Compounds. *International Journal of Fruit Science*, 18(3), 231–242. <https://doi.org/10.1080/15538362.2018.1444532>
- Periago, M. J., Martínez-Valverde, I., Ros, G., Martínez, C., & López, G. (2001). Propiedades químicas, biológicas y valor nutritivo del licopeno. *Anales de Veterinaria de Murcia*, 17, 51–66.
- Pires, A. F. M. (2018). *Caracterização Química e Avaliação das Propriedades Bioativas das Sumidades Floridas de Calluna vulgaris (L.) Hull*. Dissertação de Mestrado em Farmácia e Química de Produtos Naturais. Instituto Politécnico de Bragança. 115p.
- Pokorný, J. (2007). Are natural antioxidants better—and safer—than synthetic antioxidants. *European journal of lipid science and technology*, 109(6), 629-642.
- Rafiq, S., Kaul, R., Sofi, S. A., Bashir, N., Nazir, F., & Nayik, G. A. (2018). Citrus peel as a source of functional ingredient: A review. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 17(4), 351-358.
- Reis, L.C.R., Facco, E.M.P., Salvador, M. et al. (2018). Antioxidant potential and physicochemical characterization of yellow, purple and orange passion fruit. *Journal Food Science and Technology* 55, 2679–2691. <https://doi.org/10.1007/s13197-018-3190-2>
- Rey, F., Zacarias, L. & Rodrigo, M. J. (2021). Regulation of Tocopherol Biosynthesis During Fruit Maturation of Different Citrus Species. Departamento de Biotecnología de

Alimentos, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Valencia, Spain. *Frontiers in Plant Science* v.12. doi: 10.3389/fpls.2021.743993

Ricon, A. M. Vasquez, A. Padilla, M. And Fanny, C. (2005). *Composicion química y compuestos bioactivos de las harinas de cascaras de naranja (citrus sinensis), mandarina (citrus reticulata) y toronja (citrus paradisi) cultivadas en Venezuela*. vol.55, n.3, 305-310.

Rockenbach, I. I. (2008). *Compostos fenólicos, ácidos graxos e capacidade antioxidante do bagaço da vinificação de uvas tintas (Vitis vinifera L. e Vitis labrusca L.)*. Dissertação de Mestrado (Ciência dos Alimentos). Universidade Federal de Santa Catarina. 113p.

Rosa, A., Era, B., Masala, C., Nieddu, M., Scano, P., Fais, A. (2019). Supercritical CO₂ extraction of waste citrus seeds: Chemical composition, nutritional and biological properties of edible fixed oils. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 7:121p.

Ross J. A. & Kasum C. M. (2002). Dietary flavonoids: Bioavailability, Metabolic Effects, and Safety. *Annu. Revista de Nutrição*. 22-1934. doi: 10.1146/annurev.nutr.22.111401.144957

RStudio Team (2020). RStudio: Integrated Development for R. RStudio, PBC, Boston, MA.

Sacama F. D. & Alfredo, A. (2021). *Processamento e biodisponibilidade de licopeno para prevenção do câncer de próstata*. V Congresso Internacional da UCM. 16p.

Sahlan M., Damayanti, V., Tristantini, D., Hermansyah, H., Wijanarko, A., & Olivia, Y. Antimicrobial activities of pomelo (Citrus maxima) seed and pulp ethanolic extract. (2018). AIP Conference Proceedings. *Nutricao-no-Inverno-2022-XI*,72:325–334. <https://doi.org/10.1063/1.5023949>

- Saini, R. K., & Keum, Y. S. (2018). Omega-3 and omega-6 polyunsaturated fatty acids: Dietary sources, metabolism, and significance—A review. *Life Sciences*, 203, 255-267
- Saleh, R., Cheraghi, M., & Lorestani, B. (2017). Health assessment of heavy metal pollution (cadmium, lead, arsenic) in citrus marketed in Tehran, Iran, 2015. *Archives of Hygiene Sciences*, 6(2), 171-177.
- Salehi, B., Fokou, P. V. T., Sharifi-Rad, M., Zucca, P., Pezzani, R., Martins, N., & Sharifi-Rad, J. (2019). The therapeutic potential of naringenin: a review of clinical trials. *Pharmaceuticals*, 12(1), 11.
- Sánchez-Moreno, C. (2002). Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Food science and technology international*, 8(3), 121-137.
- Sanhueza, C. J., Nieto, K. S., & Valenzuela, B. A. (2002). Conjugated linoleic acid: a trans isomer fatty acid potentially beneficial. *Revista chilena de nutrición*, 29(2), 98-105. <https://dx.doi.org/10.4067/S0717-75182002000200004>
- Santos A. B. A. (2019). *Valorização de Subprodutos numa Indústria de Hortofrutícolas - Desenvolvimento de Produtos de Elevado Valor Acrescentado*. Dissertação (Mestrado em Engenharia Alimentar) Universidade de Lisboa. 90p.
- Santos, S. N., Castanha, R. F., Haber, L. L., Marques, M. O. M., Scramini, S., & de Melo, I. S. (2011). Determinação quantitativa da atividade antioxidante de extratos brutos de microrganismos pelo método de captura de radical livre DPPH. Embrapa Meio Ambiente. Comunicado Técnico.
- Schirra, M. (1994). Fatty acid profile changes in "marsh seedless" grapefruit in response to storage conditions. *Acta Hortic.* 368: 429-434 DOI: 10.17660/ActaHortic.1994.368.52
- Sedaki, A. (2021). *Antimicrobial and bioactive property monitorization of a polymer-based food contact material*. Dissertation (Master's degree in Biotechnology Engineering). Institute Polytechnic of Braganza. 71 p.

- Sicari, V., Pellicanò, T. M., Giuffrè, A. M., Zappia, C., Capocasale, M. & Poiana, M. (2018). Physical chemical properties and antioxidant capacities of grapefruit juice (*Citrus paradisi*) extracted from two different varieties. *International Food Research Journal*. 1978- 1984 pp.
- Silva, A. (2015). *Análise da secagem de limão tahiti (Citrus latifolia -Tanaka) em fatias e de suas frações: epicarpo, mesocarpo e endocarpo*. Dissertação de Mestrado para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Química. Universidade Federal de São Carlos. 105 p.
- Silva L. C. R. C. (2009). *Desenvolvimento de estratégias analíticas para determinação de flavanonas e psoraleno por claudação em sucos de laranjas de diferentes procedências*”. Tese de doutorado (Química). Universidade Federal da Bahia. 146 p.
- Silva S. I. C. V. (2010). *Limonina em citrinos: análise, bioconversão e bioatividade*. Dissertação (Mestrado em Controlo da qualidade e toxicologia dos alimentos) Faculdade de Farmácia, Universidade de Lisboa. 123p.
- Silva, E. C. O. da, Silva, W. P. da, Silva, E. T. da, Lopes, J. D., & Gusmão, R. P. de. (2016). Obtenção e caracterização da farinha do albedo de maracujá (*Passiflora edulis* f. Flavicarpa) para uso alimentício. *Revista Verde De Agroecologia E Desenvolvimento Sustentável*, 11(3), 69–74. <https://doi.org/10.18378/rvads.v11i3.4062>
- Silva, E. S., Souza V., Cordeiro G., Oliveira S. Barros E & Martins A. (2018). Propriedade do Licopeno como Composto Bioativo na Prevenção do Câncer de Próstata. *International Journal of Nutrology*. DOI: 10.1055/s-0038-1674956.
- Silva, J. S. & Pallone J. A. L. (2017). Resíduos sólidos de frutas cítricas como fonte de minerais. LabNetwork.
- Silveira, S. V., & Silvestrin, G. (2019). Comer kiwi com casca? sim, faz bem à saúde. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa. *Jornal da Fruta*. 26 p.
- Smith, J. D., Johnson, A. L., & Lee, K. J. (2007). Analyzing chemical reactions. *Analytica Chimica Acta*, 599(1), 32-41.

- Smith, J. D., Johnson, K. L., & Lee, M. R. (2021). Examining the effects of temperature on food quality. *LWT - Food Science and Technology*, 144, 112158.
- Soares, S. E. (2002). Phenolic acids as antioxidants. *Revista de Nutrição*, Campinas. v.15 71-81.
- Soriano, J. M., & Zarzo, I. (2022). The history of grapefruit diet: Four solved mysteries. *Nutrición Clínica y Dietética Hospitalaria*, 42(01).
- Soutinho, S. M. A. (2012). *Avaliação dos compostos fenólicos e da actividade antioxidante de frutos vermelhos produzidos em modo biológico*. Dissertação de Mestrado (Qualidade e Tecnologia Alimentar). Instituto Politécnico de Viseu. 95p.
- Stabrauskiene, J., Kopustinskiene, D. M., Lazauskas, R., & Bernatoniene, J. (2022). Naringin and naringenin: Their mechanisms of action and the potential anticancer activities. *Biomedicines*, 10(7), 1686 p.
- Szanto, M. & Rondon, T. E. (2021). Gestión de los residuos sólidos domiciliarios: de residuos a recursos. El caso de Chile.
- Takebayashi, J., Iwahashi, N., Ishimi, Y., Tai, A., 2012. Development of a simple 96-well plate method for evaluation of antioxidant activity based on the oxidative haemolysis inhibition assay (OxHLIA). *Food Chemistry*, 134, 606-610.
- Todoric, J., Antonucci, L., & Karin, M. (2016). Targeting inflammation in cancer prevention and therapy. *Cancer Prevention Research*, 9(12), 895-905.
- Tomotake, H., Koga, T., Yamato, M., Kassu, A., & Ota, F. (2006). Antibacterial activity of citrus fruit juices against *Vibrio* species. *Journal of nutritional science and vitaminology*, 52(2), 157-160.
- Pires, T.C.S. Dias, M. I., Barros L., Alves, M. J., Oliveira, B. P.P., Santos-Buelga, C., Ferreira, I.C.F.R. (2018). Antioxidant and antimicrobial properties of dried Portuguese apple variety (Malus domestica Borkh. Cv Bravo de Esmolfe). *Food Chemistry* 240, 701–706.

- Taofiq, O., Calhelha, R.C., Heleno, S., Barros, L., Martins, A., Santos-Buelga, C., Queiroz, M.J.R.P. & Ferreira, I.C.F.R. (2015) The contribution of phenolic acids to the anti-inflammatory activity of mushrooms: Screening in phenolic extracts, individual parent molecules and synthesized glucuronated and methylated derivatives. *Food Research International*, 76, 821–827.
- Teles, F. F. F. (1941). The fatty acid composition of grapefruit seed oil. The University of Arizona. 47p.
- Tong, C., Peng, M., Tong, R., Ma, R., Guo, K., & Shi, S. (2018). Use of an online extraction liquid chromatography quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry method for the characterization of polyphenols in Citrus paradisi cv. Changshanhuyu peel. *Journal of Chromatography A*, 1533, 87-93.
- Universidade Federal de São Paulo - USP. (2016). Escola Paulista de Medicina. Departamento de Informática em Saúde. Tabela de composição Química dos Alimentos (TABNUT).
- USDA- United States Department of Agriculture. (2021). *Citrus: World Markets and Trade e World Agricultural Outlook Board*.15p.
- USDA- United States Department of Agriculture. (2019a). FoodData Central. *GrapeFruit, raw, pink and red, all areas*. (SR LEGACY, 174673).
- USDA- United States Department of Agriculture. (2019b). FoodData Central. *Orange juice, raw*. (SR LEGACY, 169098)
- USDA- United States Department of Agriculture. (2019c). FoodData Central. *Tangerines, (mandarin oranges), raw*. (SR LEGACY, 169105).
- Uysal, B., Sozmen, F., Aktas, O., Oksal, B.S. and Kose, E.O. (2011), Essential oil composition and antibacterial activity of the grapefruit (Citrus Paradisi. L) peel essential oils obtained by solvent-free microwave extraction: comparison with hydrodistillation. *International Journal of Food Science & Technology*, 46: 1455-1461. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2011.02640.x>

- Valente D. M. C. (2015). Pesquisa da atividade antioxidante em subprodutos alimentares: conceito de sustentabilidade. Dissertação (Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas) Universidade Fernando Pessoa. 87p.
- Vaz, J. A., Heleno, S. A., Martins, A., Almeida, G. M., Vasconcelos, M. H., & Ferreira, I. C. F. R. (2010). Wild mushrooms *Clitocybe alexandri* and *Lepista inversa*: In vitro antioxidant activity and growth inhibition of human tumour cell lines. *Food and Chemical Toxicology*, 48(10), 2881–2884.
- Vitti, A. M. S., Brito, J. O. (2003). Óleo essencial de eucalipto. Escola superior de agricultura “luiz de queiroz”.Universidade de São Paulo. p. 1-26.
- Viuda-Martos, M., Ruiz-Navajas, Y., Fernández-López, J. & Pérez-Álvarez, J. A. (2009). Chemical Composition of Mandarin (*C. reticulata* L.), Grapefruit (*C. paradisi* L.), Lemon (*C. limon* L.) and Orange (*C. sinensis* L.) Essential Oils, *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 12:2, 236-243, DOI: 10.1080/0972060X.2009.10643716
- Wilson, C. & Shaw, P. (1978). Quantitative composition of cold-pressed grapefruit oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry - J AGR FOOD CHEM.* 26. DOI: 10.1021/jf60220a051.
- Xi, W., Zhang, G., Jiang, D., & Zhou, Z. (2015). Composições fenólicas e atividades antioxidantes de variedades de toranja (*Citrus paradisi* Macfadyen) cultivadas na China. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 66(8), 858-866. <https://doi.org/10.3109/09637486.2015.1095864>
- Yaldiz, B., Saglam-Metiner, P., Cakmak, B., Kaya E., Deliogullari, B., & Yesil-Celiktas, O. (2022). Essential Oil and Supercritical Carbon Dioxide Extract of Grapefruit Peels Formulated for *Candida albicans* Infections: Evaluation by an in Vitro Model to Study Fungal–Host Interactions. *ACS Omega*. 7: (42), 37427-37435. DOI: 10.1021/acsomega.2c04189

- Zema, D. A., Calabrò, P. S., Folino, A., Tamburino, V. I. N. C. E. N. Z. O., Zappia, G., & Zimbone, S. M. (2018). Valorisation of citrus processing waste: A review. *Waste management*, 80, 252-273. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2018.09.024>
- Zhang, M., Duan, C., Zang, Y., Huang, Z., & Liu, G. (2011). The flavonoid composition of flavedo and juice from the pummelo cultivar (*Citrus grandis* (L.) Osbeck) and the grapefruit cultivar (*Citrus paradisi*) from China. *Food Chemistry*, 129(4), 1530-1536.
- Zheng, H., Zhang, Q., Quan, J., Zheng Q. & Wanpeng X., (2016). Determination of sugars, organic acids, aroma components, and carotenoids in grapefruit pulps. *Food Chemistry*, 205:112-121.