

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO  
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**Aproveitamento de Resíduos da Agroindústria Cítrica para  
Investigação de Moléculas com Atividade Antiproliferativa  
em Células de Adenocarcinoma Gástrico (AGS)**

**Use of Waste from the *Citrus* Agroindustry to Investigate Molecules with  
Antiproliferative Activity on Gastric Adenocarcinoma (AGS) Cells**

**Jullia Ramos de Sousa Polese**

**Dissertação de Mestrado em Química**

**Vitória  
2024**

Jullia Ramos de Sousa Polese

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química do Centro de Ciências Exatas da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Química.

**Área de Concentração:** Química

**Linha de Pesquisa:** Química de Produtos Naturais.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Machado Kuster

Coorientadora: Dr.<sup>a</sup> Tamires Aliprandi Lima

**VITÓRIA  
2024**

Ficha catalográfica disponibilizada pelo Sistema Integrado de Bibliotecas - SIBI/UFES e elaborada pelo autor

---

P763a Polese, Jullia Ramos de Sousa, 1999-  
Aproveitamento de Resíduos da Agroindústria Cítrica para Investigação de Moléculas com Atividade Antiproliferativa em Células de Adenocarcinoma Gástrico (AGS) / Jullia Ramos de Sousa Polese. - 2024.  
75 f. : il.

Orientador: Ricardo Machado Kuster.  
Coorientadora: Tamires Aliprandi Lima.  
Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Exatas.

1. Flavonóides. 2. Frutas cítricas. 3. Adenocarcinoma. I. Kuster, Ricardo Machado. II. Lima, Tamires Aliprandi. III. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências Exatas. IV. Título.

CDU: 54

---

Aproveitamento de Resíduos da Agroindústria Cítrica para  
Investigação de Moléculas com Atividade Antiproliferativa em  
Células de Adenocarcinoma Gástrico (AGS)

Jullia Ramos de Sousa Polese

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Química da  
Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para a obtenção  
do grau de Mestre(a) em Química.

Aprovada em 27/03/2024 por:

---

Prof. Dr. Ricardo Machado Kuster<sup>1</sup>  
Orientador  
UFES

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Tamires Aliprandi Lima<sup>1</sup>  
Coorientadora  
IFES

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Leda Mathias<sup>1</sup>  
UENF

---

Prof. Dr. Álvaro Cunha Neto<sup>1</sup>  
UFES

---

<sup>1</sup> O documento será assinado eletronicamente em conformidade com as normas prescritas na Portaria Normativa PRPPG/ UFES nº 08/2021.

Universidade Federal do Espírito Santo  
Vitória, março de 2024





## Documentos de Defesa de Mestrado Jullia Ramos Polese

Data e Hora de Criação: 27/03/2024 às 10:38:13

### Documentos que originaram esse envelope:

- AtaAprovação\_Jullia Ramos de Sousa Polese.pdf (Arquivo PDF) - 1 página(s)
- FolhaAssinaturas\_Jullia Ramos de Sousa Polese.pdf (Arquivo PDF) - 1 página(s)
- FolhaRegistro\_Jullia Ramos de Sousa Polese.pdf (Arquivo PDF) - 1 página(s)



### Hashs únicas referente à esse envelope de documentos

[SHA256]: 5bf6298f551c1f42e422e7627e4fe0872304e6bb83c0c730c579b571f61fd92d

[SHA512]: 0f5b92a0af80aac0d48258f142e61f1eac8998c55de8c7cab3444b0910725b568105e4a4dcbf2b11152e328338b1c6b25885692201456c82ae151b923627b2e5

### Lista de assinaturas solicitadas e associadas à esse envelope



#### ASSINADO - Álvaro Cunha Neto (alvarocunhaneto@gmail.com)

Data/Hora: 27/03/2024 - 11:44:03, IP: 187.36.170.222

[SHA256]: daa732c4343da415608b1ed6cb502d854a60577d0615fc6bf46b6a0523cfe9bd



#### ASSINADO - Leda Mathias (mathias@uenf.br)

Data/Hora: 27/03/2024 - 11:52:08, IP: 179.187.238.103, Geolocalização: [-21.757252, -41.333293]

[SHA256]: 74cf504c031d007183ee36277b24d9392783f6541e54145f227d858225de7018



#### ASSINADO - Ricardo Machado Kuster (ricardo.m.kuster@ufes.br)

Data/Hora: 27/03/2024 - 10:50:23, IP: 177.145.30.35, Geolocalização: [-20.348928, -40.294809]

[SHA256]: c5ee01f8471546c2df1a8ca92801b09f3790a42363bbc1c1a759e45ae7d461ac



#### ASSINADO - Tamires Aliprandi Lima (tamiresaliprandi@gmail.com)

Data/Hora: 27/03/2024 - 10:55:39, IP: 200.137.72.67, Geolocalização: [-20.324173, -40.372625]

[SHA256]: c04b02b0e693bbb289d9326698059f445e1d29350b4de307ae77ae4a3794950b

### Histórico de eventos registrados neste envelope

27/03/2024 11:52:08 - Envelope finalizado por mathias@uenf.br, IP 179.187.238.103

27/03/2024 11:52:08 - Assinatura realizada por mathias@uenf.br, IP 179.187.238.103

27/03/2024 11:51:51 - Envelope visualizado por mathias@uenf.br, IP 179.187.238.103

27/03/2024 11:44:03 - Assinatura realizada por alvarocunhaneto@gmail.com, IP 187.36.170.222

27/03/2024 10:55:39 - Assinatura realizada por tamiresaliprandi@gmail.com, IP 200.137.72.67

27/03/2024 10:55:27 - Envelope visualizado por tamiresaliprandi@gmail.com, IP 200.137.72.67

27/03/2024 10:50:23 - Assinatura realizada por ricardo.m.kuster@ufes.br, IP 177.145.30.35

27/03/2024 10:49:05 - Envelope registrado na Blockchain por ricardo.m.kuster@ufes.br, IP 177.145.30.35

27/03/2024 10:49:04 - Envelope encaminhado para assinaturas por ricardo.m.kuster@ufes.br, IP 177.145.30.35

27/03/2024 10:38:15 - Envelope criado por ricardo.m.kuster@ufes.br, IP 177.145.30.35

Dedico este trabalho a Deus e  
ao meu marido Miguel.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por tantas graças concedidas em minha vida, em especial a de poder realizar a pós-graduação. Pelas provas e providências concedidas durante todo o caminho até a defesa do mestrado.

À Virgem Maria, conforto dos corações aflitos e minha grande inspiração de mulher, exemplo de modéstia e paciência.

A Santo Tomás de Aquino, amigo do céu e padroeiro dos estudantes, a quem recorri a todos os momentos durante a graduação e pós graduação.

Ao meu marido, Miguel Archangelo Barbosa Polese, meu mais sincero e profundo agradecimento pelo apoio incondicional, compreensão e principalmente ao amor que jamais faltou. Desde 2014 estive ao meu lado em absolutamente todos os momentos e em especial, agradeço por não se fazer ausente em meio as minhas crises de ansiedade.

Ao meu filho Tomás, a nova vida que se forma. Mesmo ainda em meu ventre, tão pequeno, já me ensinou valiosas lições sobre a importância das virtudes em todas as circunstâncias. Sem dúvidas você é a maior graça da minha vida e de seu pai.

Aos meus pais Marilza de Souza Ramos e Mario Balbino de Sousa Filho pelo constante incentivo e pelos valores que me foram transmitidos, moldando meu caráter e minha dedicação aos estudos.

Ao meu orientador Ricardo Machado Kuster, pela grande motivação, amizade, confiança em meu trabalho, projeto de pesquisa e pela excelente orientação. Obrigada pelos ricos conhecimentos compartilhados sobre a pesquisa e sobre a vida.

À minha coorientadora Tamires Aliprandi Lima, que além de valiosas contribuições dadas durante a pesquisa, fez o papel de uma irmã mais velha. Obrigada pelos questionamentos, sugestões e por ser um ombro amigo sempre presente.

As colegas de laboratório, M<sup>a</sup>. Lorena Souza Lima, Dr.<sup>a</sup> Larissa Silva de Souza e M<sup>a</sup>. Cristina Luz Tosta, pela amizade, colaboração e troca de ideias que foram fundamentais na pesquisa.

Ao Prof. Dr. Rodrigo Rezende Kitagawa e a M<sup>a</sup>. Jessica Rodrigues Pereira de Oliveira Borlot pela realização dos testes de atividade antiproliferativa em células AGS e macrófagos RAW.

Ao Laboratório Central Analítica da UFRJ, a Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Anne Caroline Candido Gomes e Prof. Dr. Rodolfo Goetze Fiorot pela realização das análises por UPLC-MS e estudos de *docking* molecular.

Ao colega Marcos Valério Vieira Lyrio, pelo auxílio na realização da análise de componentes principais (PCA).

Ao Laboratório de Petroleômica e Forense (LabPetro-UFES), pela realização das análises de espectrometria de massas.

Agradeço à Universidade Federal do Espírito Santo e aos docentes por todos os ensinamentos.

À FAPES e CAPES, pelo suporte financeiro necessário para realização do projeto e das bolsas de estudo.

*“A humildade é o primeiro degrau para a sabedoria.”*

*Santo Tomás de Aquino*

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Laranja seccionada, seus resíduos e compostos presentes em cada seção .....	19
Figura 2 - Exemplo de biossíntese das flavanonas: biossíntese da naringenina. ....	20
Figura 3 - Estrutura base das flavanonas.....	21
Figura 4 - Flavanonas hesperidina e hesperetina. ....	21
Figura 5 - Componentes do espectrômetro de massas.....	27
Figura 6 - Componentes da cromatografia líquida de ultra eficiência.....	29
Figura 7 - Gráficos das intensidades relativas das principais substâncias observadas na espectrometria de massas. ....	43
Figura 8 - Gráfico da análise de componentes principais (PCA) das dez amostras trabalhadas neste estudo. ....	44
Figura 9 - Gráfico de <i>loadings</i> de PC1 e PC2. ....	45
Figura 10 - Identificação dos compostos verificados na PCA.....	46
Figura 11 - Cromatograma UPLC-MS para o extrato etanólico BLT (bagaço limão tahiti).....	49
Figura 12 - Espectro de massas referente ao tempo de retenção 16.27 min (MS e MS2, respectivamente) e proposta de fragmentação. ....	49
Figura 13 - Espectro de massas referente ao tempo de retenção 22.03 min (MS e MS2, respectivamente) e proposta de fragmentação. ....	50
Figura 14 - Presença de flavanonas na região de tempos de retenção entre 15 e 25 minutos no cromatograma UPLC-DAD-MS dos extratos cítricos. ....	51
Figura 15 - Cromatograma UPLC-DAD-MS das amostras BLTxCLT.....	52
Figura 16 - Cromatograma UPLC-MS da amostra CLT. ....	53
Figura 17 - MS <sup>2</sup> referente ao limocitrina-3-hidroxi-3-metilglutaril glicosídeo na fonte ESI (-).....	53
Figura 18 - MS <sup>2</sup> referente ao limocitrol-3-hidroxi-3-metilglutaril glicosídeo na fonte ESI (-).....	53
Figura 19 - Proposta de fragmentação para limocitrina e limocitrol 3-hidroxi-3-metilglutaril glicosídeos na fonte ESI (-).....	54
Figura 20 - Espectros de massas MS <sup>2</sup> de cumarinas na casca do limão tahiti na fonte ESI (+).....	56

Figura 21 - Propostas de fragmentações das cumarinas encontradas na casca do limão tahiti na fonte ESI (+). .....	57
Figura 22 - Estruturas dos flavonoides selecionados para avaliação <i>in silico</i> . .....	59
Figura 23 - Sobreposição do ligante co-cristalizado sinvastatina (em amarelo) e seu ligante redocado na HMG-CoA redutase humana. ....	61
Figura 24 - Conformação (Pose) de ancoragem do ácido sinvastatina (diagrama 2D) no sítio de ligação da HMG-CoA redutase humana. ....	62
Figura 25 - Sobreposição do ligante cocristalizado 5-fluor- 2'-desoxiuridina-5'-monofosfato (FdUMP, em amarelo) e seu ligante redockado no sítio de ligação da timidilato sintase. ....	64
Figura 26 - Pose de ancoragem de FdUMP (diagrama 2D) no sítio de ligação da enzima timidilato sintase humana. ....	65

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Identificação das amostras em estudo <sup>1</sup> .....	35
Tabela 2 - Proposta de possíveis estruturas de flavanonas observadas por espectrometria de massas em cascas de <i>Citrus</i> . ....	41
Tabela 3 - Proposta de possíveis estruturas de flavanonas observados por espectrometria de massas em bagaços de <i>Citrus</i> .....	41
Tabela 4 - Valores IC <sub>50</sub> para as amostras cítricas no teste MTT sobre células RAW 264.7, AGS e padrão de cisplatina. ....	47
Tabela 5 - Energias de interação (em kcal mol <sup>-1</sup> ) de compostos fenólicos e ácido sinvastatina com HMG-CoA redutase, HMGCR. (PDB:1HW9). ....	62
Tabela 6 - Energias de interação (em kcal mol <sup>-1</sup> ) de FdUMP e flavonoides/compostos fenólicos com timidilato sintase. (APO: 6QXG). ....	65

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGS – Adenocarcinoma gástrico

CLUE – Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento

DAD – Detector de Varredura de Diodo

EAG – Equivalentes em ácido gálico

ESI FT-ICR MS – Espectrometria de Massas com Ionização por *Electrospray* e Ressonância Ciclotrônica de Íons por Transformada de Fourier (do inglês, *Mass Spectrometry with Electrospray Ionization and Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance*)

IC<sub>50</sub> – Concentração inibitória de 50%

INCA – Instituto Nacional de Câncer

UPLC-MS – Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência Acoplada a Espectrometria de Massas (do inglês, *Ultra Performance Liquid Chromatography coupled with Mass Spectrometry*)

MTT – Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio

PCA – Análise de Componentes Principais

## LISTA DE SÍMBOLOS

% - Porcentagem

°C – Graus Celsius

bar - Unidade de medida de pressão equivalente a  $10^5$  pascais

g – Gramas

h – Horas

Kg – Quilogramas

Kv – Quilovolts

M – Concentração molar

mg – Miligramas

mL – Mililitros

m/z – Razão massa-carga

nm – Nanometros

v/v - Proporção volume por volume

µg – Microgramas

µM – Micromolar

## RESUMO

A citricultura é uma das atividades agrícolas mais comuns em países tropicais e subtropicais. No entanto, aproximadamente metade da produção total de frutas cítricas é transformada em resíduos com alto teor de matéria orgânica. Esses resíduos são ricos em flavonoides, especialmente flavanonas, que têm sido estudados por suas propriedades medicinais, incluindo seu uso no manejo do câncer gástrico. Extratos de cascas e bagaços de espécies cítricas consumidas no Estado do Espírito Santo, Brasil, foram submetidos a testes de citotoxicidade em células de adenocarcinoma gástrico (AGS) e macrófagos (RAW 264.7) com o objetivo de selecionar aqueles com maior possibilidade de utilização para pessoas com câncer gástrico. A similaridade química entre eles foi avaliada utilizando dados de espectrometria de massa (ESI-FT-ICR MS) submetidos à análise de componentes principais e cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (UPLC-MS). O ESI (-) FT-ICR MS possibilitou determinar a presença das flavanonas hesperidina, eriocitrina, narirutina, hesperetina, eriodictiol e naringenina. A avaliação citotóxica pelo método MTT mostrou atividade antiproliferativa considerável para as amostras do extrato do bagaço do limão tahiti ( $IC_{50} = 38,44 \pm 0,82 \mu\text{g/mL}$ ) e nenhuma toxicidade em macrófagos ( $IC_{50} > 800 \mu\text{g/mL}$ ) nas doses testadas. O extrato da casca do limão tahiti foi considerada citotóxica para AGS ( $IC_{50} = 59,04 \pm 1,06 \mu\text{g/mL}$ ), mas também apresentou citotoxicidade para macrófagos RAW 264.7 ( $IC_{50} = 296,2 \pm 0,13 \mu\text{g/mL}$ ). A técnica UPLC-MS possibilitou distinguir compostos das classes dos flavonoides, cumarinas e limonoides na amostra do extrato da casca do limão tahiti que não estavam presentes na amostra do extrato do bagaço. A atividade antiproliferativa esteve relacionada principalmente à presença das flavanonas hesperidina e eriocitrina, embora amostras de outros resíduos cítricos, mas contendo apenas hesperidina, também apresentaram atividade antiproliferativa com maiores concentrações da mesma. Para justificar essa hipótese sobre a atividade antiproliferativa das flavanonas, foram realizados estudos *in silico* sobre a timidilato sintase (TS) e a hidroximetilglutail-CoA redutase (HMGCR), que são superexpressas em células AGS. Ambas as flavanonas apresentaram excelente ancoragem nos sítios ativos das enzimas, corroborando a hipótese levantada. A partir do estudo realizado, os resíduos do limão tahiti, assim como outras fontes cítricas, podem ser considerados matérias-primas promissoras para gerar novos materiais para o manejo do câncer gástrico.

**Palavras-chave:** Câncer gástrico; *Citrus*; Eriocitrina; Flavanonas; Hesperidina.

## ABSTRACT

*Citrus* farming is one of the most common agricultural activities in tropical and subtropical countries. However, approximately half of the total *citrus* fruit production is transformed into waste with a high organic matter content. These residues are rich in flavonoids, especially flavanones, which have been studied for their medicinal properties, including their use in the management of gastric cancer. Extracts from peels and pomace of *citrus* species consumed in the State of Espírito Santo, Brazil, were subjected to cytotoxicity tests on gastric adenocarcinoma cells (AGS) and macrophages (RAW 264.7) with the aim of selecting those with a greater possibility of use in patients with gastric cancer. The chemical similarity between them was evaluated using mass spectrometry data (ESI-FT-ICR MS) subjected to principal component analysis and liquid chromatography coupled to mass spectrometry (UPLC-MS). ESI (-) FT-ICR MS made it possible to identify the presence of the flavanone's hesperidin, eriocitrin, narirutin, hesperetin, eriodictyol, and naringenin. Cytotoxic evaluation by the MTT method showed considerable antiproliferative activity for samples of Tahiti lemon pomace extract ( $IC_{50} = 38,44 \pm 0,82 \mu\text{g/mL}$ ) and no toxicity in macrophages ( $IC_{50} > 800 \mu\text{g/mL}$ ) at the doses tested. Tahiti lemon peel extract was considered cytotoxic to AGS ( $IC_{50} = 59,04 \pm 1,06 \mu\text{g/mL}$ ), but also showed cytotoxicity to RAW 264.7 macrophages ( $IC_{50} = 296,2 \pm 0,13 \mu\text{g/mL}$ ). The UPLC-MS technique made it possible to distinguish compounds from the flavonoid, coumarin, and limonoid classes in the Tahiti lemon peel extract sample that were not present in the pomace extract sample. The antiproliferative activity was mainly related to the presence of the flavanone's hesperidin and eriocitrin, although samples of other *citrus* residues containing only hesperidin also showed antiproliferative activity at higher concentrations. To justify this hypothesis regarding the antiproliferative activity of flavanones, *in silico* studies were conducted on thymidylate synthase (TS) and hydroxymethylglutaryl-CoA reductase (HMGCR), which are overexpressed in AGS cells. Both flavanones showed excellent anchoring in the effective sites of the enzymes, corroborating the hypothesis raised. Based on the study carried out, Tahiti lemon residues, as well as other *citrus* sources, can be considered promising raw materials to generate new materials for the management of gastric cancer.

**Keyword:** Gastric cancer; *Citrus*; Eriocitrin; Flavanones; Hesperidin.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	16
1.1 Produção de <i>Citrus</i> no Brasil e resíduos gerados .....	18
1.2 Flavanonas: flavonoides presentes em resíduos de <i>Citrus</i> .....	19
1.3 Relevância das flavanonas na medicina .....	23
1.3.1 O câncer gástrico.....	23
1.3.2 Demais estudos sobre flavanonas na medicina.....	24
1.4 Técnicas de identificação das flavanonas.....	26
1.4.1 Espectrometria de massas (EM).....	26
1.4.2 Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (UPLC).....	28
1.4.3 Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas (UPLC-MS).....	30
1.4.4 Quimiometria.....	31
2. OBJETIVOS .....	33
2.1 Objetivo Geral .....	33
2.2 Objetivos Específicos.....	33
3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	35
3.1 Obtenção e processamento dos frutos.....	35
3.2 Análise dos extratos por espectrometria de massas ESI (-) FT-ICR MS.....	35
3.3 Análise dos espectros de massas .....	36
3.4 Análise de componentes principais dos dados ESI (-) FT-ICR MS .....	36
3.5 Linhagem celular .....	36
3.6 Avaliação da citotoxicidade em macrófagos (RAW 264.7) e linhagem de adenocarcinoma gástrico (AGS).....	37
3.7 Cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a espectrometria de massas (UPLC-MS/MS).....	37
3.8 Estudo de acoplamento molecular de flavonoides nas enzimas timidilato sintase (TS) e 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A redutase (HMGCR) .....	38
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	40
4.1 Análise dos extratos por espectrometria de massas ESI (-) FT-ICR MS.....	40
4.2 Análise de componentes principais (PCA) dos dados ESI (-) FT-ICR MS....	44
4.3 Avaliação da citotoxicidade em macrófagos (RAW 264.7) e linhagem de adenocarcinoma gástrico (AGS).....	47

4.4	Cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a espectrometria de massas .....	48
4.5	Estudos <i>in silico</i> .....	58
5.	CONCLUSÃO .....	67
6.	REFERÊNCIAS.....	68

## 1. INTRODUÇÃO

A citricultura está entre as atividades agrícolas mais abundantes em países tropicais e subtropicais. (SHARMA, MAHATO, CHO *et al.*, 2017) O processamento industrial de frutas cítricas está entre as atividades mais relevantes para este mercado, porém cerca de 50 a 60% da produção total é transformada em resíduo com alto teor de matéria orgânica. (CITRUSBR, 2021; IONICS, 2020; PUTRI, CELUS, VAN AUDENHOVE *et al.*, 2022) Cascas, sementes e bagaços fazem parte dos resíduos cítricos e, embora já exista uma estratégia de redução, como a incineração, e o uso na alimentação do gado, esses resíduos podem ser melhor aproveitados, pois são ricos em substâncias de grande importância para a saúde humana, incluindo vitamina C, ácido fólico, potássio, pectina, fibra dietética, carotenoides, limonóides e flavonoides. (HUANG, HU, ZENG *et al.*, 2021; SHARMA, MAHATO, CHO *et al.*, 2017)

As frutas cítricas são ricas em metabólitos secundários biologicamente ativos, com potencial para trazer inúmeros benefícios para a saúde humana. (LV, ZHAO, NING *et al.*, 2015) Dentre esses benefícios destaca-se a atividade anticancerígena, a qual tem sido avaliada para os flavonoides, substâncias consideradas quimiopreventivas do câncer, mas que podem também ser usadas para o tratamento complementar dele. Vários exemplos de flavonoides cítricos, que são potenciais agentes quimioterápicos, são as flavonas polimetoxiladas tangeretina e nobiletina, e as flavanonas hesperetina, hesperidina, naringenina, narirutina, eriodictiol e eriocitrina. (MEIYANTO; HERMAWAN e ANINDYAJATI, 2012)

O adenocarcinoma gástrico é responsável por cerca de 95% dos casos de câncer do estômago e, atinge, em sua maioria, homens entre 60 e 70 anos de idade. No Brasil, o câncer de estômago é o quarto tipo mais frequente entre os homens e o sexto entre as mulheres. (INCA, 2022) Inúmeros flavonoides das cascas de frutos cítricos foram testados para atividade antiproliferativa contra esse tipo de câncer e a indução de apoptose foi o mecanismo mais encontrado. A inibição da enzima timidilato sintase, muito usada em tratamento de câncer, pode induzir a apoptose da célula neoplásica. É o caso, por exemplo, do medicamento 5-fluoruracila (5-FU), também usado no tratamento de câncer gástrico. (BACKUS, WOUTERS, FERREIRA *et al.*, 2003) Digno de nota é a combinação do flavonoide apigenina com a 5-FU, o que

provocou o aumento da atividade anticancerígena do fármaco por indução de apoptose. (CHOI e KIM, 2010) Uma outra enzima, a hidroximetilglutaril coenzima A redutase (HMGCR), também quando inibida, pode induzir a apoptose de células cancerosas. (LONGO, MULLEN, YU *et al.*, 2019) O alvo sobre enzimas que controlam o metabolismo lipídico tumoral é um foco recente da terapia de cânceres gastrointestinais. (GUO, ZHANG, ZHAO *et al.*, 2023) HMGCR está super expressa em células de câncer gástrico e está relacionada à progressão tumoral. (CHUSHI, WEI, KANGKANG *et al.*, 2016) Sua inibição por estatinas e flavonoides tem relação com atividade antineoplásica. (BJARNADOTTIR, FELDT, INASU *et al.*, 2020; GRANDE, OCCHIUZZI, PERRI *et al.*, 2021) Epidemiologicamente, existe um consenso de que câncer gástrico e consumo de frutas cítricas estão inversamente associados. (BERTUCCIO, ALICANDRO, ROTA *et al.*, 2019)

A hesperidina é uma flavanona glicosídica largamente estudada para fins farmacológicos e é abundante em frutas cítricas como laranja e limão. (PANDEY e KHAN, 2021) Um estudo de revisão investigou o potencial antitumoral dela, como indutora de apoptose sobre células tumorais. Uma das pesquisas verificou que a hesperetina (forma aglicona da hesperidina) combinada com a naringenina, mostrou maximização do efeito antimetastático sobre células pancreáticas humanas, sendo também uma promissora estratégia anticâncer. (AGGARWAL, TULI, THAKRAL *et al.*, 2020)

A eriocitrina é encontrada no limão (*Citrus limon*) e é conhecida por sua forte propriedade antioxidante. Wang *et al.* (2016) descobriram que ela pode desencadear apoptose em células de carcinoma hepatocelular. (WANG, TU, WAN *et al.*, 2016) Em outro estudo, os autores observaram que a eriocitrina é um potente aliado na supressão do estresse oxidativo em doenças crônicas decorrentes do estresse oxidativo, como aquele ocorrente em diabetes mellitus. (MINATO, MIYAKE, FUKUMOTO *et al.*, 2003) Além disso, a eriocitrina é uma molécula anticancerígena, ativa contra vários tipos de câncer, entre eles, próstata, cólon e gástrico. (KOOLAJI, SHAMMUGASAMY, SCHINDELER *et al.*, 2020; YAO, LIU, BASHIR *et al.*, 2022) Ávila-Gálvez *et al.* (2021) quantificaram as flavanonas eriocitrina e hesperidina no limão, obtendo como resultado 83,3 mg/g da primeira e 6,3 mg/g da segunda, evidenciando uma maior proporção de eriocitrina, quando comparada à hesperidina em diversos extratos de *Citrus*. (ÁVILA-GÁLVEZ, GIMÉNEZ-BASTIDA, GONZÁLEZ-SARRÍAS *et al.*, 2021)

Diante dos dados apresentados e com o crescimento da utilização de produtos oriundos de plantas, os nutracêuticos ganharam destaque por serem produzidos à base de nutrientes isolados, plantas, ervas, dentre outros, para prevenção e tratamento de doenças. Os nutracêuticos se categorizam como aprimoramento do ciclo alimentar do indivíduo ou no uso como suplemento alimentar, ajudando na reposição nos casos onde a ingestão de vitamina diária do indivíduo está abaixo do indicado. (MOREIRA COSTA e GOMES SILVA JUNIOR, 2019)

### **1.1 Produção de *Citrus* no Brasil e resíduos gerados**

Dentre os ramos da fruticultura, a citricultura tem destaque mundial, sendo o mais produzido no mundo. As árvores de frutas do gênero *Citrus* possuem porte médio, folhas e flores aromáticas, frutos com uma composição rica em nutrientes, como vitamina C, água e açúcares. (ILSA, 2022) As frutas cítricas foram inseridas no Brasil pelas primeiras expedições colonizadoras e foram implementadas nos estados de São Paulo, Rio de Janeiro e Bahia na década de 1930 para comercialização, espalhando por todo país em virtude da adaptação ao clima, relevo e solo. (ILSA, 2022)

Conforme dados da Companhia Nacional de Abastecimento (Conab), 32,8% da produção mundial de laranja na safra de 2020/21 foi produzida pelo Brasil, assim como 62% do volume global de suco de laranja. (ILSA, 2022) A produção de laranjas ganha destaque no Brasil, no cinturão citrícola de São Paulo e Triângulo/Sudoeste Mineiro, o fechamento da safra de laranjas 2022/23 encerrou em 314,21 milhões de caixas de 40,8 kg. (FUNDECITRUS, 2023)

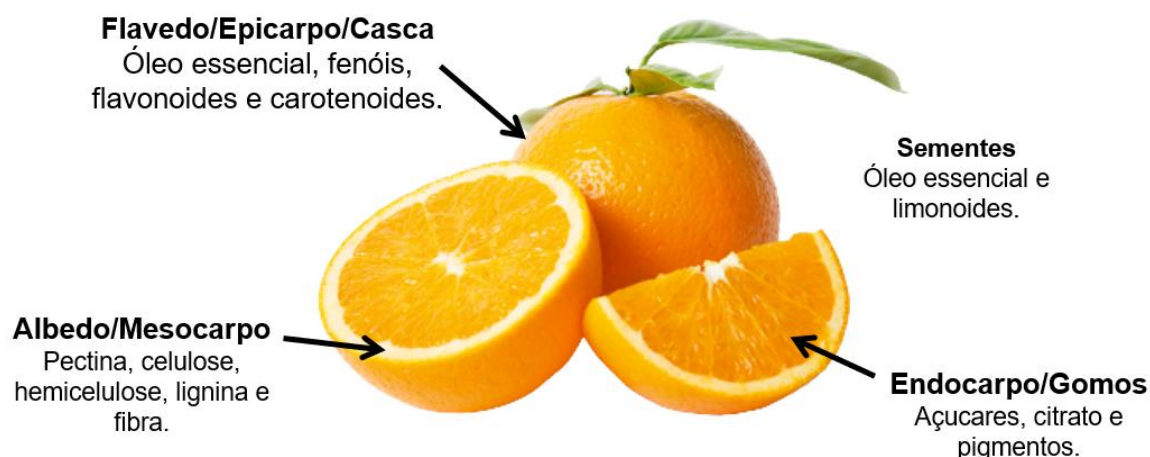
É comum o consumo de frutas cítricas *in natura* nas casas dos brasileiros, de acordo com a Associação Nacional de Exportação de Sucos Cítricos (Citrus BR), todavia, em outros países o que se consome é o suco extraído das frutas, de forma fresca ou industrializado. Neste contexto, em 2020/21 o Brasil produziu cerca de 820,5 mil toneladas de suco de laranja, sendo mais uma vez destaque. A Citrus BR, afirma que a cada cinco copos de suco de laranja consumidos no mundo, três são produzidos nas fábricas brasileiras. (ILSA, 2022)

As frutas cítricas podem também ser utilizadas para produção de bebidas alcoólicas, óleos essenciais, polpas para congelamentos, entre outros produtos e áreas de aplicação. (ILSA, 2022) Entretanto, a produção de sucos cítricos ocasiona a

formação de resíduos que representam cerca de 50% da massa dos *Citrus* fresca. Dentre os resíduos estão inclusas as cascas, representando metade da massa total da fruta, sementes, bagaço e águas residuais. (SURI, SINGH e NEMA, 2022)

O descarte inadequado dos subprodutos cítricos leva a poluição da água e do solo. As cascas de frutas cítricas contêm aproximadamente 80% de água na sua composição e apodrecem rapidamente, atraem micróbios, moscas, mofo e produzem micotoxinas. (SURI, SINGH e NEMA, 2022)

O aproveitamento de resíduos cítricos é importante para evitar a contaminação ambiental, além de proporcionar produtos com baixo custo e com qualidade nutricional, visto que os resíduos são uma importante fonte de vitaminas, fibras, e ricos em metabólitos secundários com excelentes propriedades antioxidantes, como flavonoides, limonoides, cumarinas e carotenoides, de acordo com a figura 1. (AMARAL, BESSA, CAVALCANTE *et al.*, 2021; ILSA, 2022)



**Figura 1** - Laranja seccionada, seus resíduos e compostos presentes em cada secção  
Fonte: Página do Freepik<sup>1</sup>

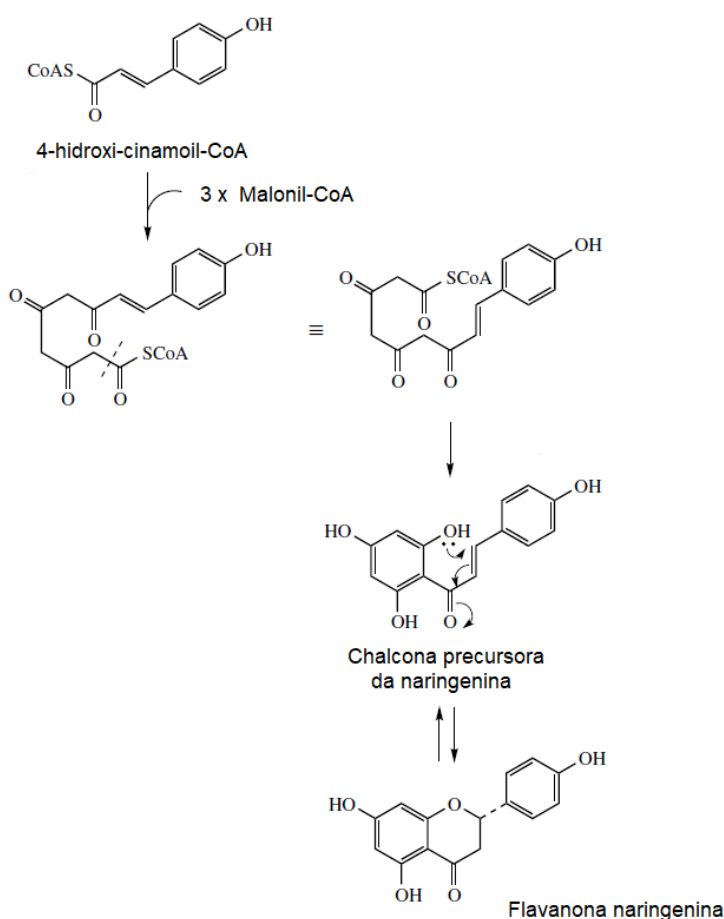
<sup>1</sup> Disponível em: <<https://br.freepik.com/fotos-vetores-gratis/laranja-cortada>>. Acesso em: 25 de nov. 2023.

## 1.2 Flavanonas: flavonoides presentes em resíduos de *Citrus*

Os flavonoides são metabólitos secundários produzidos por plantas ao atuarem como mecanismo de defesa em resposta a ameaças causadas ao reino vegetal e podem ser encontrados em praticamente todas as partes de uma planta, desde suas folhas, até às raízes, flores, frutas, casca e rizomas. (ARNOSO, DA COSTA e SCHMIDT, 2019) Possuem sua estrutura básica composta por três anéis (C6-C3-C6), identificados por A, B, C e dividem-se em sete subclasses, de acordo com a oxidação do seu anel central (anel B), presença de metilas e hidroxilas nos demais anéis, sendo

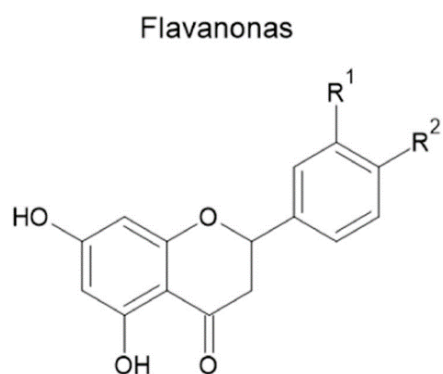
elas: flavonóis, flavanois, flavonas, isoflavonas, antocianidinas, chalconas e flavanonas. (SHEN, WANG, GAN *et al.*, 2022)

As flavanonas, também conhecidas como 2,3-diidroflavonas, são quase estritamente encontradas em frutas cítricas como laranja e limão, estando abundantemente presentes em seus resíduos como cascas, bagaços e sementes. Vale ressaltar que as flavanonas advêm da rota biossintética mista do ácido chiquímico e do acetil-CoA, sendo produto de uma unidade inicial de 4-hidroxi-cinamoil-CoA com uma extensão de três unidades do malonil-CoA, como apresenta a figura 2. (ARNOSO, DA COSTA e SCHMIDT, 2019; DEWICK, 2002)



**Figura 2** - Exemplo de biossíntese das flavanonas: biossíntese da naringenina.  
Fonte: Adaptada de (DEWICK, 2002).

A estrutura química das flavanonas é representada pelo núcleo 2,3-diidro-2-fenilcroman-4-ona, ligada a grupos hidroxílicos e chamada de polifenólica, como apresenta a figura 3. Além disso, possuem o anel central saturado entre os carbonos das posições C2 e C3, sendo uma importante diferença estrutural com relação a outros flavonoides. (DEWICK, 2002)



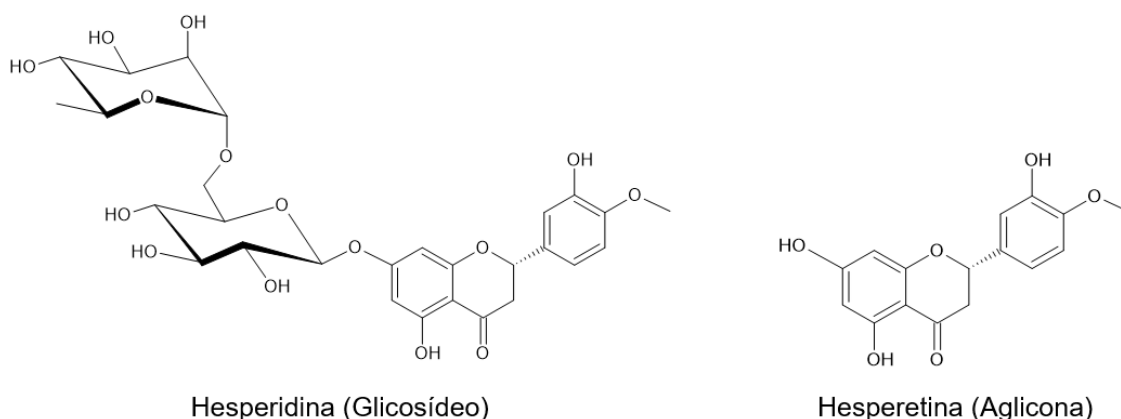
$R_1 = \text{OH}$ ;  $R_2 = \text{OCH}_3$ ; Hesperetina;

$R_1 = \text{OH}$ ;  $R_2 = \text{OH}$ ; Eriodictiol;

$R_1 = \text{H}$ ;  $R_2 = \text{OH}$ ; Naringenina.

**Figura 3** - Estrutura base das flavanonas.  
Fonte: Autoria própria.

Alguns exemplos de flavanonas encontradas em frutas cítricas são: hesperidina, narirutina e eriocitrina. Elas possuem uma molécula glicídica ligada à hesperetina, naringenina e eriodictiol e, por tal motivo, são chamadas de glicosídicas, já as que não possuem esse açúcar são conhecidas como agliconas, de acordo com a figura 4. (ARNOSO, DA COSTA e SCHMIDT, 2019; PEREIRA, 2015)



**Figura 4** - Flavanonas hesperidina e hesperetina.  
Fonte: Autoria própria.

Os flavonoides vêm sendo alvo de muitos estudos na área da saúde por conta de suas relevantes propriedades medicinais. Dentre elas, as flavanonas ganharam destaque por possuírem atividade antioxidante e pesquisas apontam a relevância dessa para a promoção da ação anticâncer. (AGGARWAL, TULI, THAKRAL *et al.*, 2020)

A revisão de Aggarwal *et al.* investigou o potencial antitumoral da flavanona hesperidina, presente em frutas do gênero *Citrus*, através do papel dela na indução de apoptose celular de células tumorais. (AGGARWAL, TULI, THAKRAL *et al.*, 2020) Segundo os autores, o efeito antitumoral provocado pela hesperidina está associado às atividades antioxidantes e antiinflamatórias apresentadas por essa flavanona. A interação com numerosos alvos celulares e a inibição da proliferação de células tumorais induzem a apoptose e a parada do ciclo celular. (AGGARWAL, TULI, THAKRAL *et al.*, 2020)

O processo inflamatório persistente no corpo humano pode ser precursor do câncer, pois mediadores pró-inflamatórios como iNOS (óxido nítrico-sintase induzida), NO (óxido nítrico), citocinas, entre outros, são gerados em nível celular após ataques de vírus, bactérias, fungos, parasitas, poluentes, e outros agentes. Também o estresse oxidativo produzido por radicais livres e que normalmente estão associados à inflamação, estão envolvidos na etiologia do câncer. Inúmeros fatores estão envolvidos na geração de radicais livres, como consumo de alimentos ultraprocessados, álcool, tabaco e exposição à radiação UV e IV. (AGGARWAL, TULI, THAKRAL *et al.*, 2020)

O efeito antioxidante de flavonoides, como resultado da eliminação de radicais livres, ocorre devido a características estruturais dos flavonóides, como presença de grupos hidroxilas doadoras de radical hidrogênio (elétron) e carbonila na estabilização da conjugação eletrônica após a doação de elétrons. Tais características estão presentes na molécula hesperidina, porém sua atividade antioxidante é considerada moderada em comparação com os outros flavonoides. Por exemplo, a hesperetina, a forma não glicosilada da hesperidina, ilustradas pela figura 1, apresenta uma atividade antioxidante mais efetiva em comparação a sua forma glicosídica, visto que possui um grupo hidroxila adicional em sua estrutura molecular, onde estaria ligado o grupamento glicosídico na hesperidina. A O-glicosilação reduz a atividade antioxidante, juntamente com a capacidade de deslocalização eletrônica. (AGGARWAL, TULI, THAKRAL *et al.*, 2020)

Em suma, as flavanonas são componentes indispensáveis no gênero *Citrus*, quando se imagina aplicações nas áreas médica, farmacêutica, cosmética e alimentícia. Associados à promoção da saúde, além das atividades antioxidante e anticâncer, estudos comprovam as ações anti-inflamatória, antiviral, antifúngica, entre outras. (PANCHE, DIWAN e CHANDRA, 2016)

## 1.3 Relevância das flavanonas na medicina

### 1.3.1 O câncer gástrico

O câncer gástrico é uma doença que se desenvolve de acordo com as características genéticas do indivíduo, atreladas a fatores como excesso de consumo de alimentos industrializados e processados ricos em nitritos e nitrosaminas, restringimento de alimentos saudáveis e consumo excessivo de sal. O uso de fumo e álcool, exposição a compostos químicos, em especial agrotóxicos, também aumentam os riscos de contrair a doença. Aproximadamente 10% dos casos de câncer gástrico são familiares, sendo que hereditários representam de 1 a 3% dos casos. Investigações do INCA-2020 calculam 21.230 de novos casos, sendo 7.870 em mulheres e 13.360 em homens. O câncer gástrico consiste em uma neoplasia frequente e que apresenta alta taxa de mortalidade em consequência ao diagnóstico em fases avançadas. (DE ALMEIDA, FERRAZ, JUNIOR *et al.*, 2021)

Os medicamentos comumente utilizados para tratar a doença são epirubicina, cisplatina, 5-FU, paclitaxel, carboplatina, docetaxel, irinotecano, capecitabina, oxaliplatina, trifluridina e tipiracil. O princípio desses medicamentos é atacar células que se dividem rapidamente, como é o caso das células cancerosas. Todavia, algumas células saudáveis como as que revestem a boca, intestinos e medula óssea, também possuem um tempo de divisão celular reduzido e são afetadas pelos medicamentos, provocando efeitos colaterais, por exemplo feridas na boca, perda de apetite, náuseas e vômito, diarreia, infecções, fadiga, hemorragias e perda de cabelo. Vale ressaltar que os efeitos colaterais dependem da dose administrada, tipo do medicamento e tempo do tratamento utilizado. Por conta disso, buscam-se alternativas mais seguras e naturais para prevenção e tratamento do câncer gástrico. Muitos flavonoides de resíduos de frutos cítricos foram testados para atividade antiproliferativa contra esse tipo de câncer e a indução de apoptose foi o mecanismo mais encontrado. (DE ALMEIDA, FERRAZ, JUNIOR *et al.*, 2021)

A revisão de Park *et al.* (2007) afirma que a flavanona hesperidina é capaz de provocar apoptose, via de morte celular induzida, em células de diferentes tipos de câncer. Os autores apresentaram o tratamento de células gástricas humanas, SNU 668, com hesperidina (100 M) e resultados positivos com variações para o mecanismo

apoptótico, como: corpos celulares com morfologia apoptótica, modulação de Bcl-2, ativação de caspase 3 e condensação da cromatina, sinalizando o possível uso da hesperidina em pacientes portadores de câncer gástrico. (PARK, PARK, RA *et al.*, 2007)

Por outro lado, o estudo de Pagliara *et al.* (2019) teve como objetivo investigar novas propriedades biológicas do extrato da casca do limão, não somente de uma flavanona específica, como possível agente anticâncer em células de câncer gástrico humano. Foi analisado o efeito protetor do extrato da casca do limão na migração celular induzida por interleucina-6 (regula diferentes processos fisiológicos e patológicos) ou regulação positiva de MMP-9/2 (enzimas proteolíticas), em células de câncer gástrico MKN-28 e AGS. Os autores analisaram o extrato da casca do limão, possuindo um teor de polifenóis totais de 0,46 mg/ml EAG (equivalentes em ácido gálico), para inibir a proliferação de células MKN-28 e AGS. As células foram expostas a quantidades diferentes e crescentes do extrato da casca do limão, variando de 0,5 a 50,0 µg/ml durante 6 e 24 h, em condições isentas de soro e, em seguida, submetidas a um ensaio de viabilidade celular. Como resultado, o extrato conseguiu inibir a proliferação celular de forma dependente da concentração e do tempo, em uma faixa de 1,0 a 50,0 µg/ml EAG. (PAGLIARA, NASSO, DI DONATO *et al.*, 2019)

Os valores de IC<sub>50</sub> expressos como EAG foram, para 6h: 12,14 e 17,06 µg/ml para MKN-28 e AGS, respectivamente; e para 24h: 7,46 e 5,08 µg/ml para MKN-28 e AGS, respectivamente. Portanto, os resultados de Pagliara *et al.* (2019) demonstraram que o extrato da casca do limão é um possível protetor contra o surgimento do adenocarcinoma gástrico humano, em consequência de bons resultados como expressos pelo IC<sub>50</sub> para linhagens de células cancerígenas e demais testes biológicos realizados com enzimas e proteínas envolvidas no processo de proliferação do câncer gástrico. Efetivamente, a elaboração do extrato da casca de limão é uma estratégia útil para a reciclagem dos resíduos de frutas cítricas, permitindo a produção de novos compostos ou produtos funcionais com propriedades biológicas. (PAGLIARA, NASSO, DI DONATO *et al.*, 2019)

### **1.3.2 Demais estudos sobre flavanonas na medicina**

Atualmente as flavanonas presentes em *Citrus* vêm sendo alvo de pesquisas em função dos seus abundantes benefícios medicinais e atividades biológicas, para

emprego no mercado farmacêutico, alimentício e cosmético. Um exemplo de flavanona, presente em frutas cítricas, já comercializada por conta de suas propriedades, é a hesperidina, que juntamente com a flavona diosmina são utilizadas para tratamento de sintomas de doenças vasculares, como varizes e outros sintomas associados à insuficiência venosa crônica. (PANDEY e KHAN, 2021)

Da Silva *et al.* (2019) avaliaram o efeito da hesperidina na úlcera gástrica crônica, após indução com ácido acético em roedores, modelo que se assemelha à úlcera humana. Os autores administraram a hesperidina em duas dosagens, sendo elas: 3 e 10 mg/kg, uma vez ao dia, durante sete dias, dosagens que foram eficientes para acelerar em 34 e 62%, respectivamente, o processo de cicatrização da úlcera, ao ser comparado ao placebo. Ademais, o efeito cicatrizante da hesperidina foi confirmado por análises histológicas e histoquímicas, com o auxílio da produção de mucina, glicoproteínas protetoras de mucosas. (DA SILVA, PEZZINI, SOMENSI *et al.*, 2019)

Além disso, a hesperidina é o foco de consideráveis estudos que buscam uma via de tratamento e prevenção por meio de medicamentos fitoterápicos para vários tipos de câncer, em função de apresentar mínimos ou nenhum efeito tóxico sobre células saudáveis. Câncer de ovário, endométrio, pulmão, mama, entre outros, foram alguns casos já estudados para verificar o efeito anticâncer da flavanona hesperidina. (ÖNDER, GÖKTEPE, BARAN *et al.*, 2023)

Para estudar o efeito de prevenção da proliferação de células cancerosas, Önder *et al.* (2023) avaliaram duas linhagens celulares de câncer de mama (MCF-7 e MDA-MB-231) através do ensaio MTT. A hesperidina foi administrada em concentrações de 5, 10, 15, 20, 25 30 e 40  $\mu\text{M}$  e incubadas por 24, 48 e 72 h. Segundo os autores, a viabilidade celular foi reduzida de acordo com a concentração de hesperidina aplicada, nas quais as doses de  $\text{IC}_{50}$  para as células MCF-7 e MDA-MB-231 foram calculadas em 30  $\mu\text{M}$  e 20  $\mu\text{M}$ , respectivamente, e de acordo com o tempo de incubação. (ÖNDER, GÖKTEPE, BARAN *et al.*, 2023)

Assim como a hesperidina, outra flavanona de interesse presente em frutas cítricas é a eriocitrina. Vale ressaltar, que sua presença é mais abundante em limões, do que em laranjas ou tangerinas e possui importantes propriedades biológicas como efeitos antiproliferativos celulares e pró-apoptóticos. (YUAN, CHEN, JING *et al.*, 2022)

Em estudos científicos, o estresse oxidativo vem sendo relacionado à sobrevivência de células cancerosas. Yuan *et al.* (2022) investigaram o efeito

antiproliferativo e pró-apoptótico da Eriocitrina em modular a ativação da sinalização de STAT3/MAPKs em células MCF-7 (linhagem celular do câncer de mama). Os resultados demonstraram que a Eriocitrina pode atuar em vários eventos de sinalização ligados à tumorigênese. (YUAN, CHEN, JING *et al.*, 2022)

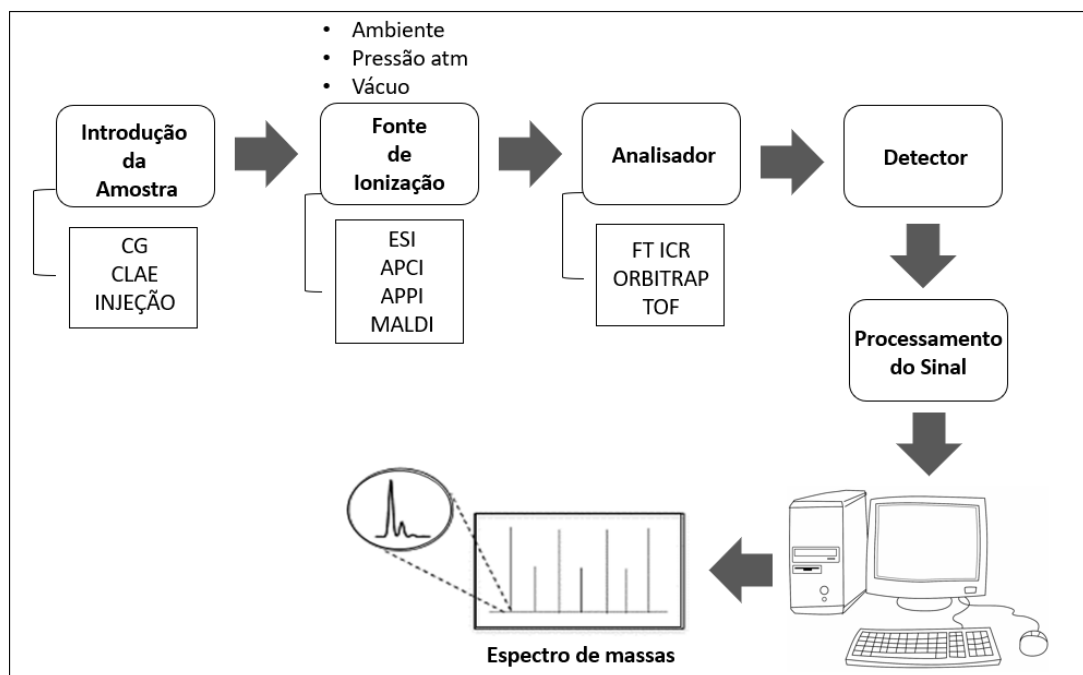
A flavanona eriocitrina anulou a fosforilação de STAT3 através da supressão da ativação de JAK2 e Src quinase, bloqueando a translocação nuclear de STAT3. A eriocitrina ativou fatores pró-apoptóticos como Bax e caspases 7,8, 9 e suprimiu a expressão de Bcl-2 em células MCF-7. Assim como a hesperidina, a eriocitrina pode ser uma nova alternativa para o tratamento de câncer, nesse caso, para tratar o câncer de mama, visto que a flavanona é um forte supressor da sobrevivência celular e induz a apoptose em células MCF-7 por meio da supressão da ativação de JAK/STAT3 e aumentando a ativação de MAPK. (YUAN, CHEN, JING *et al.*, 2022)

Outro tipo de câncer em que a eriocitrina foi testada, foi o pulmonar. No estudo de Yao *et al.* (2022) foi relatado que a eriocitrina apresentou propriedades imunomoduladoras contra o câncer de pulmão, em testes *in vivo* usando camundongos albinos suíços. A eriocitrina modulou os níveis de expressão de marcadores apoptóticos como Bax, caspase-9 e caspase-3 e mitigou a proliferação celular. Além disso, os níveis de expressão de proteínas antioxidantes celulares foram recuperados pela eriocitrina. (YAO, LIU, BASHIR *et al.*, 2022)

## **1.4 Técnicas de identificação das flavanonas**

### **1.4.1 Espectrometria de massas (EM)**

A espectrometria de massas, do inglês *mass spectrometry* ou MS, é aplicada em diversas áreas de pesquisa, como por exemplo, na de produtos naturais. É uma técnica analítico-instrumental que viabiliza a detecção de inúmeros compostos em uma única análise, necessitando de pouco ou nenhum preparo de amostra dependendo da fonte de ionização utilizada. Ademais, a técnica possui alta sensibilidade, baixos limites de detecção e o seu poder de resolução está associado ao analisador. Simplificando, um espectrômetro de massas possui cinco componentes importantes: unidade de entrada da amostra, fonte de ionização, analisador de massa, detector e o sistema de dados, como ilustrado da figura 5. (PAVIA, LAMPMAN, KRIZ *et al.*, 2010)



**Figura 5** - Componentes do espectrômetro de massas.  
Fonte: Autoria própria.

A unidade de entrada é o primeiro componente do espectrômetro, onde a amostra é introduzida no equipamento e submetida a pressões mais baixas. Em seguida, a amostra é levada até a fonte de íons, local onde ocorre a ionização das moléculas da amostra e, posteriormente, os íons são acelerados por um campo eletromagnético. (PAVIA, LAMPMAN, KRIZ *et al.*, 2010)

Dentre as fontes de ionização molecular de amostras, algumas são: a ionização por eletronebulização (ESI), ionização química (CI), ionização eletrônica (EI), ionização química à pressão atmosférica (APCI) e a ionização e dessorção a laser assistida por matriz (MALDI). A ESI é uma técnica branda de ionização que possibilita moléculas de alta polaridade, baixo ou alto peso molecular e complexidade estrutural serem analisadas por meio de pouca fragmentação do analito, preservando as características da amostra. A formação de íons ocorre pelo modo positivo, ocorrendo a protonação de componentes básicos, gerando íons positivos, ou pelo modo negativo, ocorrendo a desprotonação de componentes ácidos, gerando íons negativos, íons esses identificados como  $[M+H]^+$  e  $[M+H]^-$ , respectivamente. Vale ressaltar, que na fonte de ionização por *electronebulização*, moléculas heteroatômicas formam íons com mais facilidade. (PAVIA, LAMPMAN, KRIZ *et al.*, 2010)

O analisador de massas é o próximo componente, ele separa os íons da

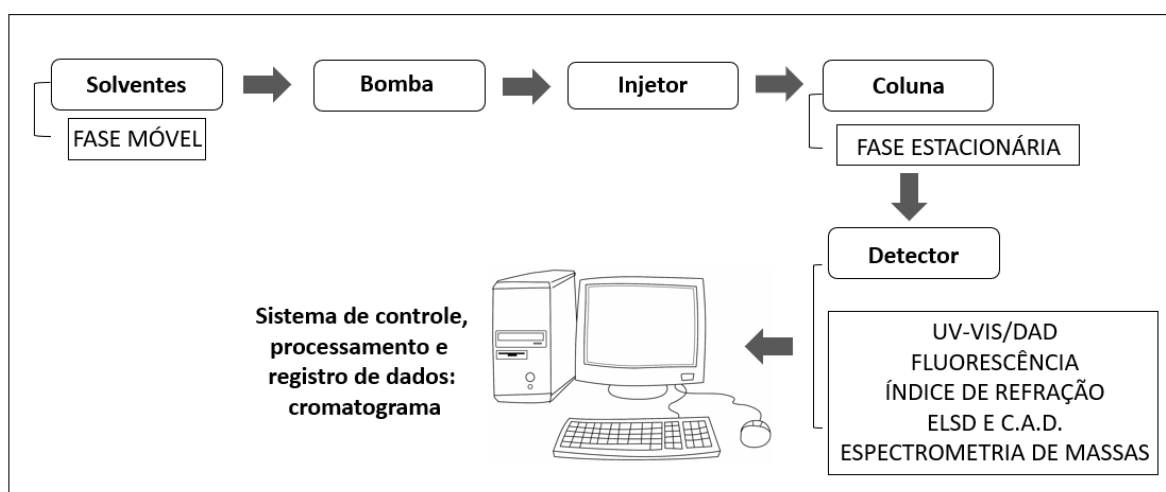
amostra baseado em sua razão massa/carga ( $m/z$ ) e permite com que os espectrômetros de massa possam ser classificados em várias categorias. Uma delas é a espectrometria de massas por Ressonância Ciclotrônica de Íons com Transformada de Fourier (FT-ICR MS), que possui uma ultra-alta resolução e exatidão que, proporciona a investigação da composição elementar dos inúmeros compostos presentes em amostras de alta complexibilidade. (PAVIA, LAMPMAN, KRIZ *et al.*, 2010)

Por fim, ocorre então a contagem dos íons pelo detector, o sinal é processado e registrado pelo sistema de dados. O produto de toda análise é chamado de espectro de massas, um gráfico do número de íons detectados como uma função de sua razão  $m/z$ . (PAVIA, LAMPMAN, KRIZ *et al.*, 2010)

#### **1.4.2 Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (UPLC)**

A cromatografia líquida de ultra eficiência (CLUE), do inglês *Ultra Performance Liquid Chromatography* ou UPLC, é uma forma avançada de cromatografia líquida (LC) na qual são usadas colunas de diâmetro estreito repletas de partículas muito pequenas (1,7  $\mu\text{m}$ ) e sistemas de entrega de fase móvel operando em altas contrapressões. É uma técnica analítica aplicada para a separação, identificação e quantificação de constituintes de uma amostra, onde ocorre o bombeamento dessa, em um sistema de solventes com um fluxo determinado, conhecidos como fase móvel, através de uma coluna, intitulada de fase estacionária. Vale ressaltar, que de acordo com a interação entre amostra e fases móvel e estacionária, ocorrerá a separação dos compostos de interesse. As principais vantagens do UPLC sobre a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) convencional são resolução melhorada, tempos de retenção mais curtos e maior sensibilidade. (GRUZ, NOVÁK e STRNAD, 2008)

A figura 6 apresenta um esquema dos principais componentes do UPLC. Os solventes são conduzidos para uma bomba em alta pressão onde acontecerá, em geral, a sua mistura, quando for o caso de o método adotado apresentar mais de um solvente como fase móvel, e em seguida seguir em direção à coluna. Na trajetória dos solventes, a amostra é inserida no equipamento de forma automática ou manual, por uma válvula de injeção e arrastada para a coluna, onde ocorre a separação. A fase móvel que passa pela coluna é direcionada para o detector, que indica os constituintes eluidos da amostra. (LANÇAS, 2013)



**Figura 6** - Componentes da cromatografia líquida de ultra eficiência.  
Fonte: Autoria própria.

Ademais, o sinal produzido pelo detector é recebido por um software adequado, processado no computador e resulta na criação de um cromatograma que apresenta a intensidade (sinal) do pico do analito de interesse em um determinado tempo (min) de retenção, ou seja, o tempo que decorreu entre a injeção da amostra e o ápice do pico cromatográfico. Vale ressaltar que o tempo de retenção se modifica de acordo com a afinidade entre analito e fase estacionária, além da polaridade da amostra. (LANÇAS, 2013; TECH, 2022)

Outro ponto importante da cromatografia líquida é a polaridade das fases móvel e estacionária. Quando se fala da separação de compostos orgânicos, as fases estacionárias mais empregadas no UPLC são do tipo fase reversa, uma base de sílica com grupos C18. Já as fases móveis consistem em misturas de metanol:água (MeOH:H<sub>2</sub>O) ou acetonitrila:água (ACN:H<sub>2</sub>O), podendo ser necessário adaptação da força cromatográfica, ou seja, a qualidade da fase móvel interagir com os componentes da amostra e a seletividade, até se obter uma boa resolução para que ocorra a separação dos picos cromatográficos. Vale ressaltar que, a adição de ácidos ou base, como por exemplo ácido fórmico e amônia à fase móvel, pode ocorrer para beneficiar o processo de ionização dos analitos, refinando suas interações com as fases móvel e estacionária. (DA SILVA e COLLINS, 2011)

As técnicas como o UPLC se destacam na qualidade de separação em virtude da eficiência e potência de resolução das colunas modernas, dos detectores como índice de refração, ultravioleta, espalhamento de luz e fluorescência, além do auxílio de softwares dinâmicos. Essa associação permite a análise quantitativa dos

componentes das amostras, mesmo em concentrações extremamente baixas. (LANÇAS, 2013)

### **1.4.3 Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas (UPLC-MS)**

A eficiência e o poder de resolução de colunas modernas para separação de componentes presentes em misturas, tornaram as técnicas cromatográficas fundamentais como técnicas de separação, principalmente na análise de substâncias presentes em matrizes complexas, como sedimentos de rio, fluidos biológicos, produtos naturais e outras. (LANÇAS, 2009)

A cromatografia líquida de ultra eficiência (CLUE ou UPLC) é uma das importantes técnicas utilizadas na análise de compostos termicamente instáveis e/ou não voláteis. Todavia, embora seja uma excelente técnica de separação, o UPLC necessita de uma técnica confirmatória quanto aos parâmetros qualitativos. Portanto, dentre as opções existentes no mercado, a espectrometria de massas é a técnica que melhor fornece as informações estruturais necessárias para melhorar o desempenho do UPLC na identificação molecular. O acoplamento de UPLC com espectrometria de massa (MS) de ionização por *electrospray* (ESI) oferece, portanto, uma alternativa potencial ao HPLC-MS/MS convencional. O sistema UPLC-MS/MS foi aplicado em várias análises publicadas recentemente de produtos vegetais/alimentares, por exemplo para determinação de flavonoides. (GRUZ, NOVÁK e STRNAD, 2008)

Diversos estudos comprovam como a técnica de cromatografia líquida, seja de alta, ultra ou ultra-alta eficiência (HPLC, UPLC e UHPLC) acoplada a espectrometria de massas apresenta ótimos resultados para a identificação de compostos fenólicos, como é o caso dos flavonoides, em amostras de frutas cítricas.

A pesquisa de Gómez-Mejía *et al.* (2019) permitiu, por meio do LC-MS/MS, verificar quantidades consideravelmente altas de narirutina, extraída das cascas de limão e, em todos os casos, a hesperidina foi o polifenol extraído mais abundante de todas as amostras cítricas. No mesmo estudo foram realizados procedimentos quimiométricos que contribuíram positivamente para a eficiência das análises e compactação da grande quantidade de dados, facilitando o reconhecimento de informações subjacentes relevantes e para descobrir as melhores condições de extração. Portanto, o método LC-MS/MS fornece uma estratégia simples e eficiente

para caracterização e quantificação rápida de produtos naturais fenólicos provenientes de resíduos. (GÓMEZ-MEJÍA, ROSALES-CONRADO, LEÓN-GONZÁLEZ *et al.*, 2019)

No estudo de Wang e colaboradores, o UPLC-MS/MS foi utilizado para identificação metabólitos presentes em determinada espécie de fruto do gênero *Citrus*, onde foi encontrado um total de 1.878 metabólitos, tendo como compostos principais os flavonóides (62,04%), seguidos pelos ácidos fenólicos (11,97%) e alcaloides (6,11%). (WANG, WANG, XIAO *et al.*, 2024)

Chen *et al.* (2023) investigaram a composição química da casca de *Citrus reticulata* 'Chachi', rica em flavonóides, por meio da técnica de UPLC-ESI-MS/MS. Como resultado revelaram a identificação de um total de 168 flavonóides, incluindo 61 flavonas, 54 flavonóis, 14 flavonas C-glicosídeos, 14 diidroflavonas, 9 flavanonas, 8 isoflavonas, 3 flavonóis, 3 diidroflavonóis e 2 chalconas. Compostos de grande importância de estudo foram encontrados, como hesperidina, hesperetina, quercetina, apigenina, diosmina, entre outros. (CHEN, XU, WEN *et al.*, 2023)

#### 1.4.4 Quimiometria

Empregando métodos matemáticos e estatísticos, a quimiometria é utilizada na química para proporcionar o máximo de informações químicas, com a análise dos dados obtidos, através do planejamento ou seleção de experimentos de maneira otimizada e permite estudar mais de uma variável ao mesmo tempo. (FERREIRA ANTUNES, MELGO *et al.*, 1999)

Dentre os métodos quimiométricos pode-se citar e enfatizar a área de planejamento de experimentos, onde estuda-se as variáveis que mais afetam um determinado processo, do mesmo modo que a interação entre elas. É possível detectar uma tendência nos dados e similaridade entre as amostras, a partir do reconhecimento de padrões. (BRERETON, 2005; DE SOUZA e POPPI, 2012)

A análise de componentes principais (PCA) é um método não supervisionado, ou seja, não requer classificação prévia, é com base nas informações contidas nos dados experimentais que ocorre a formação de agrupamentos. Não há necessidade em construir uma regra que preveja comportamentos, por isso também é conhecida por método de análise exploratória de dados (EAD). (BRERETON, 2005)

Para classificar amostras e identificar padrões, a PCA é a principal técnica

usada na quimiometria. Essa abordagem comprime os dados programando-os em um espaço de menor dimensão, reduzindo a complexidade do conjunto de dados original. Ao agrupar variáveis com informações semelhantes, as informações relevantes (maior variância) são destacadas e tornam-se mais evidentes visualmente. Além disso, essa técnica também permite detectar amostras anômalas (outliers). (DE SOUZA e POPPI, 2012)

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Determinar o perfil químico e a atividade antiproliferativa em células de câncer gástrico (AGS) de extratos produzidos a partir de resíduos agrícolas de frutas do gênero *Citrus* consumidas no estado do Espírito Santo – Brasil.

### 2.2 Objetivos Específicos

Produzir extratos etanólicos a partir dos bagaços e cascas de *Citrus sinensis* L. (laranja pêra e laranja bahia), *Citrus reticulata* Blanco (tangerina ponkan), *Citrus latifolia* Tanaka (limão tahiti) e *Citrus limonia* Osbeck (limão cravo).

Analisar os extratos etanólicos produzidos de resíduos das espécies de *Citrus* por espectrometria de massas, técnica FT-ICR-MS, no modo de ionização ESI (-).

Analisar os extratos etanólicos com maior potencial antiproliferativo, produzidos de resíduos dos *Citrus*, por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas (UPLC-MS/MS).

Determinação da atividade antiproliferativa em células de adenocarcinoma gástrico (AGS) e atividade citotóxica para macrófagos murinos RAW 264.7 dos extratos obtidos.

Realizar Análise de Componentes Principais (PCA) dos espectros de massas obtidos visando estudar as variações químicas existentes.

Correlacionar os resultados do UPLC-MS/MS com os resultados obtidos por espectrometria de massas para caracterização química de flavonoides.

Correlacionar as análises quimiométricas (PCA) com os resultados dos ensaios de atividade antiproliferativa, ESI (-) FT-ICR MS e UPLC-MS/MS.

Estudo de ancoragem molecular (*in silico*) sobre as enzimas timidilato sintase (TS) e a hidroximetilglutailCoA redutase (HMGCR), que são superexpressas em células AGS, com os principais flavonoides encontrados na amostra de maior atividade antiproliferativa de seus resíduos.

### 3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

#### 3.1 Obtenção e processamento dos frutos

Em virtude do presente estudo ser continuidade de pesquisa realizada anteriormente, os extratos foram produzidos com frutos coletados entre os meses de setembro de 2020 e maio de 2021, na zona rural de Colatina-ES. (DE SOUSA, 2021)

Resíduos (bagaços e cascas) de laranja (*Citrus sinensis L.*), limão (*Citrus latifolia Tanaka* e *Citrus limonia Osbeck*) e tangerina (*Citrus reticulata Blanco*) foram secos em forno elétrico, em baixa temperatura (70° a 90 °C) por cerca de 40 minutos. Depois de secos, pesou-se 5 g dos resíduos, separando bagaço e casca. Em um liquidificador os resíduos foram triturados com 25 mL etanol por cerca de 5 minutos. Os dez extratos (cinco dos bagaços e cinco das cascas) foram transferidos para recipientes de vidro e adicionados 50 mL de etanol. A extração permaneceu estática pelo período de 5 semanas. Após a extração, as amostras foram filtradas, concentradas em rotaevaporador e identificadas de acordo com a tabela 1.

**Tabela 1** - Identificação das amostras em estudo<sup>1</sup>.

Amostra	Código 1	Tipo de Resíduo	Código 2
Limão Cravo ( <i>Citrus limonia Osbeck</i> )	LC	Bagaço	BLC
		Casca	CLC
Limão Tahiti ( <i>Citrus latifolia Tanaka</i> )	LT	Bagaço	BLT
		Casca	CLT
Laranja Pêra ( <i>Citrus sinensis L.</i> )	LP	Bagaço	BLP
		Casca	CLP
Laranja Bahia ( <i>Citrus sinensis L.</i> )	LB	Bagaço	BLB
		Casca	CLB
Tangerina Ponkan ( <i>Citrus reticulata Blanco</i> )	TP	Bagaço	BTP
		Casca	CTP

<sup>1</sup>Plantas coletadas na região rural de Colatina-ES e identificadas pelo Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural (ES)

#### 3.2 Análise dos extratos por espectrometria de massas ESI (-) FT-ICR MS

Os extratos etanólicos secos dos bagaços e das cascas (1 mg/mL) foram diluídos em acetonitrila:água (1:1). As soluções resultantes foram infundidas na fonte eletronebulização (ESI) a uma taxa de 5 µL/min, operada no modo negativo para ionização de moléculas na faixa de massas entre m/z 150-1500. Os espectros de

massas foram adquiridos e processados utilizando-se o pacote de software Compass Data Analysis (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha).

### **3.3 Análise dos espectros de massas**

Os espectros de massas obtidos pelo ESI (-) FT-ICR MS dos 5 extratos de bagaços e 5 extratos de cascas dos *Citrus*, foram analisados quanto à diversidade de flavanonas, baseado na fórmula molecular exata. Os resultados serão analisados quimiométricamente, por análise de componentes principais (PCA) para correlacionar os dados, tanto com os ensaios de atividade antiproliferativa, quanto qualificar as amostras para analisar a semelhança entre elas.

### **3.4 Análise de componentes principais dos dados ESI (-) FT-ICR MS**

A Análise de Componentes Principais (PCA) foi empregada nos conjuntos de dados com o propósito de discernir tendências e relações entre as amostras investigadas. Inicialmente, as razões  $m/z$  (massa carga) e intensidades relativas dos sinais encontrados no ESI (-) FT-ICR MS foram organizados por uma matriz no software Excel para a consolidação desses dados. A matriz foi organizada com a  $m/z$  em uma coluna principal e as intensidades relativas dispostas de acordo com as amostras. Por fim, construiu-se modelo PCA utilizando o pacote PCA Toolbox (Ballabio, 2015), executado no software MATLAB R2013a (Mathworks, Natick, EUA).

### **3.5 Linhagem celular**

Os macrófagos murinos RAW 264.7 (ATCC® TIB-71™) e as células de adenocarcinoma gástrico humano AGS (ATCC® CRL-1739) foram fornecidos pelo banco de células do Rio de Janeiro, Brasil. As células foram mantidas em garrafas com Meio de Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado com soro bovino fetal a 10% (v/v) e incubadas durante diferentes períodos a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub> até atingir a confluência de aproximadamente 70-90%. Depois de obter a confluência desejada, as células foram dissociadas utilizando um raspador de células (RAW 264.7) ou tripsinizadas (AGS) e contadas numa câmara de Neubauer para obter

valores de concentração de células.

### **3.6 Avaliação da citotoxicidade em macrófagos (RAW 264.7) e linhagem de adenocarcinoma gástrico (AGS)**

Alíquotas (0,2 mL) de meio contendo macrófagos murinos de células RAW 264.7 e AGS foram semeadas em placas de cultura de tecidos de 96 poços a  $5 \times 10^5$  células/mL e  $6 \times 10^4$  células/mL, respectivamente, e incubadas a 37°C sob 5% de CO<sub>2</sub> por 2 horas (RAW) ou 24 horas (AGS). Após este período, o meio foi removido e as células tratadas com várias concentrações dos extratos produzidos (3,125-200 µg/mL) em meio DMEM e incubadas por 24 horas e 48 horas, para as células RAW 264,7 e AGS, respectivamente, sob mesmas condições. Depois, o meio foi removido e as placas foram preparadas para o ensaio de MTT-tetrazólio 52. Após uma breve agitação, a densidade óptica de cada poço é medida usando um filtro de 540 nm e um comprimento de onda de referência de 620 nm. Análise de regressão linear com limite de confiança de 95% foi usada para definir a curva dose-resposta e para calcular a concentração necessária para reduzir a absorvância do sistema em 50% (IC<sub>50</sub>), o chamado ponto médio citotóxico. A cisplatina é utilizada como agente citotóxico de referência.

### **3.7 Cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a espectrometria de massas (UPLC-MS/MS)**

As amostras foram analisadas por Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (UPLC) equipada com um detector DAD e com um espectrômetro de massas (EM) com fonte de ionização por eletronebulização (ESI) no modo positivo e negativo (LCQ Fleet Ion trap LC/MS<sup>n</sup>, Thermo Fisher Scientific, EUA). A análise por CLAE foi realizada em um sistema Ultimate 3000 HPLC (Dionex, Sunnyvale, CA, EUA) com um detector de arranjo fotodiodo (DAD), com uma bomba de modelo LPG-3400RS. Os canais ultravioletas para observação dos cromatogramas foram fixados em 254, 365, 280 e 220 nm. Os parâmetros utilizados no UPLC foram: pressão entre 0-400 bar, Tempo: 60 min, Fluxo: 0,5 mL/min. Coluna Poroshell EC-C18 (100 x 2,1 x 2,7). O aparelho foi operado em modo negativo, a faixa de massa analisada foi de 100-1000

*m/z*, pressão do gás nebulizador a 0,4 bar, voltagem do capilar a 3,8 kV, e transferência de temperatura capilar de 180 °C. Os solventes utilizados para obtenção do perfil cromatográfico em UPLC foram acetonitrila (Fase A = ACN) e água destilada acidificada com 1mM de ácido fosfórico (Fase B = H<sub>2</sub>O acid.). A eluição em modo gradiente iniciou-se com acetonitrila a 10% e água acidificada a 90%. As amostras foram preparadas na concentração de 20 mg/mL em metanol.

### **3.8 Estudo de acoplamento molecular de flavonoides nas enzimas timidilato sintase (TS) e 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A redutase (HMGCR)**

O estudo *in silico* foi realizado com flavonoides comumente encontrados no limão, muitos deles identificados por UPLC-MS/MS. Selecionou-se as flavanonas eriocitrina, hesperedina, eriodictiol, hesperetina e os flavonóis limocitrina, limocitrol, limocitrina glicosídeo-3-hidroxi-3-metilglutaril, limocitrol glicosídeo-3-hidroxi 3-metilglutaril, além de duas substâncias naturais não pertencentes ao limão, como a alvaxantona, um inibidor da timidilato sintase (MAJ, MORI, SOBICH *et al.*, 2020) e a wogonina que potencializou a atividade citotóxica do 5-fluorouracil (5-FU) no câncer gástrico (MAJ, MORI, SOBICH *et al.*, 2020; ZHAO, WANG, ZOU *et al.*, 2010). As simulações de acoplamento molecular foram realizadas para o complexo da porção catalítica da 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A redutase humana, HMG-CoA redutase (HMGCR) com sinvastatina (Protein Data Bank, PDB ID: 1HW9) (ISTVAN e DEISENHOFER, 2001) e timidilato sintase (TS) com monofosfato de 5-fluoro-2'-desoxiuridina (FdUMP) (Protein Data Bank, PDB ID: 6QXG) (POZZI, FERRARI, LUCIANI *et al.*, 2019) usando o software AutoDock Vina (TROTT e OLSON, 2010). O MarvinSketch foi empregado para elaborar as estruturas dos compostos fenólicos extraídos de moléculas de *Citrus*, que tiveram seus estados protonados ajustados ao pH plasmático (7,4). Suas geometrias foram totalmente otimizadas no software Gaussian09, com os critérios de convergência padrão, no nível da Teoria do Funcional da Densidade (DFT), usando B3LYP/6-31+G(d) (PERDEW, CHEVARY, VOSKO, *et al.*, 1992). Cálculos de frequência foram realizados para confirmar a natureza destas estruturas como pontos estacionários de energia mínima nas superfícies de energia potencial (com todos os valores positivos). Para os cálculos de *docking*, manteve-se

apenas os átomos polares de hidrogênio do receptor e as moléculas pequenas (ligante co-cristalizado, ácido sinvastatina e os compostos fenólicos).

Estabeleceu-se o protocolo de acoplamento definindo o espaço de varredura (Grid Box) centrado no ligante co-cristalizado (para HMGCR, coordenadas cartesianas x; y; z de 4,139; -9,204; -11,326, com dimensões de 16 Å; 11 Å; e 12 Å, respectivamente; e para TS, coordenadas cartesianas x; y; z de 40,352; -33,337; 19,767, com dimensões de 16 Å; 11 Å; e 10 Å, respectivamente), o que foi validado com cálculos de *redocking* de sinvastatina, isto é, sobrepondo sua pose encaixada à estrutura do ligante co-cristalizado. O software Discovery Studio Visualizer 2019 foi utilizado para avaliar as interações formadas entre os ligantes e os resíduos de aminoácidos dos cálculos de *docking*.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Análise dos extratos por espectrometria de massas ESI (-) FT-ICR MS

Cada extrato foi analisado a fim de propor as possíveis flavanonas presentes em cada resíduo. As tabelas 2 e 3 mostram a composição em flavanonas em cascas e bagaços de frutos cítricos, tentativamente identificados pela fórmula molecular exata, obtida a partir dos íons  $[M-H]^-$  e referências bibliográficas que obtiveram as mesmas substâncias para amostras cítricas. (RAGHEB, MASOUD, SHABRAWY *et al.*, 2023; HUNLUN, BEER, SIGGE *et al.*, 2017; SANCHES, CUNHA, VIGANÓ *et al.*, 2022)

A intensidade relativa dos sinais fornece uma avaliação quantitativa preliminar das flavanonas de resíduos de frutas cítricas. Em uma breve análise, observa-se que a hesperidina é a flavanona encontrada, relativamente, em maior abundância em oito dos dez extratos em estudo. O mesmo acontece para outros estudos que quantificaram as flavanonas em amostras do mesmo gênero e espécie. (CAO, YE, CAO *et al.*, 2015; GATTUSO, BARRECA, GARGIULLI *et al.*, 2007; SEMINARA, BENNICI, DI GUARDO *et al.*, 2023)

Dentre as flavanonas em estudo, as amostras de casca e bagaço do limão tahiti, codificadas como CLT e BLT, respectivamente, apresentaram a flavanona eriocitrina como majoritária em sua composição flavonoídica (22,07%/-0,43 ppm para CLT e 2,81%/-0,34 ppm para BLT). No estudo de Gattuso *et al.* (2007) foi verificado em sucos de *Citrus*, dentre eles laranja, limão e tangerina, as quantidades presentes de flavanonas em miligramas por 100 mililitros (mg/ml). Para o suco de limão obteve-se 20,5 mg/100 mL para hesperidina e 16,7 mg/100mL para a eriocitrina, porém quando se compara a quantidade das mesmas flavanonas entre as frutas limão e laranja encontrada pelos autores, é o esperado em comparação com as informações obtidas pela análise por espectrometria de massas no presente artigo. Gattuso *et al.* (2007) encontraram que a quantidade de hesperidina na laranja (28,6 mg/100 mL) é maior do que no limão (20,5 mg/100 mL) e que a quantidade de eriocitrina no limão (16,7 mg/100mL) é maior do que na laranja (0,31 mg/100mL). (GATTUSO, BARRECA, GARGIULLI *et al.*, 2007)

**Tabela 2** - Proposta de possíveis estruturas de flavanonas observadas por espectrometria de massas em cascas de *Citrus*.

<b>Flavanonas de cascas de frutos cítricos capixabas</b>								
<b>Amostras</b> (Intensidade relativa do sinal %/desvio de massa ppm)								
Nome	íon[M-H] <sup>-</sup>	Fórmula Molecular	CLC (Limão Cravo)	CLT (Limão Tahiti)	CLP (Laranja Pêra)	CLB (Laranja Bahia)	CTP (Tangerina Ponkan)	Referência
Naringenina	271,06120	C <sub>15</sub> H <sub>11</sub> O <sub>5</sub>	0,14/-0,05	0,24/0,17	1,19/1,92	0,13/-0,70	0,06/-0,05	(RAGHEB <i>et al.</i> , 2023)
Narirutina	579,17193	C <sub>27</sub> H <sub>31</sub> O <sub>14</sub>	1,21/0,25	1,22/-0,38	4,89/0,04	2,50/-0,97	1,61/-0,79	(HUNLUN <i>et al.</i> , 2017)
Hesperetina	301,07176	C <sub>16</sub> H <sub>13</sub> O <sub>6</sub>	2,56/0,00	0,46/0,27	1,95/0,17	0,32/-0,65	0,13/0,14	(RAGHEB <i>et al.</i> , 2023)
Hesperidina	609,18249	C <sub>28</sub> H <sub>33</sub> O <sub>15</sub>	44,98/-0,40	6,11/-0,56	31,93/-0,16	6,82/-0,99	8,50/-0,98	(SANCHES <i>et al.</i> , 2022)
Eriodictiol	287,05611	C <sub>15</sub> H <sub>11</sub> O <sub>6</sub>	0,86/-0,67	1,33/0,17	0,43/0,010	0,04/0,01	0,21/0,47	(RAGHEB <i>et al.</i> , 2023)
Eriocitrina	595,16818	C <sub>27</sub> H <sub>31</sub> O <sub>15</sub>	20,04/-0,55	22,07/-0,43	0,77/-0,18	0,21/-1,53	0,73/-0,82	(RAGHEB <i>et al.</i> , 2023)

**Tabela 3** - Proposta de possíveis estruturas de flavanonas observados por espectrometria de massas em bagaços de *Citrus*.

<b>Flavanonas de bagaços de frutos cítricos capixabas</b>								
<b>Amostras</b> (Intensidade relativa do sinal %/desvio de massa ppm)								
Nome	íon[M-H] <sup>-</sup>	Fórmula Molecular	BLC (Limão Cravo)	BLT (Limão Tahiti)	BLP (Laranja Pêra)	BLB (Laranja Bahia)	BTP (Tangerina Ponkan)	Referência
Naringenina	271,06120	C <sub>15</sub> H <sub>11</sub> O <sub>5</sub>	0,34/0,10	0,48/2,37	0,35/-0,08	0,18/-0,08	0,30/0,39	(RAGHEB <i>et al.</i> , 2023)
Narirutina	579,17193	C <sub>27</sub> H <sub>31</sub> O <sub>14</sub>	0,60/-0,02	0,09/-0,02	3,98/-0,57	5,77/-0,64	0,00/0,00	(HUNLUN <i>et al.</i> , 2017)
Hesperetina	301,07176	C <sub>16</sub> H <sub>13</sub> O <sub>6</sub>	0,82/0,64	0,13/-0,06	0,38/-0,06	0,30/-0,06	0,13/0,14	(RAGHEB <i>et al.</i> , 2023)
Hesperidina	609,18249	C <sub>28</sub> H <sub>33</sub> O <sub>15</sub>	11,34/-0,17	0,70/0,88	11,95/-0,50	8,63/-0,55	2,39/-0,09	(SANCHES <i>et al.</i> , 2022)
Eriodictiol	287,05611	C <sub>15</sub> H <sub>11</sub> O <sub>6</sub>	0,26/2,76	0,29/0,11	0,17/0,32	0,31/-0,13	0,03/-0,41	(RAGHEB <i>et al.</i> , 2023)
Eriocitrina	595,16818	C <sub>27</sub> H <sub>31</sub> O <sub>15</sub>	1,02/-0,29	2,81/-0,34	1,14/-0,20	0,82/-0,48	0,32/-0,18	(RAGHEB <i>et al.</i> , 2023)

A figura 7 é uma montagem com gráficos elaborados para uma melhor visualização dos resultados, comparando as intensidades relativas de sinal de cada flavanona de interesse nos diferentes extratos.

Observando o gráfico 1, nota-se que as intensidades relativas para a hesperetina são maiores nos extratos de casca do que nos extratos de bagaço. O mesmo acontece no gráfico 2 para a hesperidina, com exceção das amostras CLB e BLB. Comparando os gráficos 3 e 4, referentes às flavanonas eriodictiol e eriocitrina, obteve-se resultados interessantes, ambos os gráficos os extratos das cascas apresentaram maiores intensidades relativas de sinal, porém o diferencial nesses casos é a comparação entre os extratos de limão (BLC, CLC, BLT e CLT) e os demais. Tanto para eriodictiol, quanto para eriocitrina, as amostras BLC, CLC, BLT e CLT apresentaram intensidades relativas consideravelmente superiores às outras amostras. O mesmo ocorreu para o estudo de Gattuso *et al.* citado anteriormente. (GATTUSO, BARRECA, GARGIULLI *et al.*, 2007) Para os extratos dos bagaços, nota-se que possivelmente a eriocitrina está mais presente na amostra BLT, visto que é o extrato que possui uma maior intensidade relativa no gráfico 4.

Os gráficos 5 e 6 mostram as intensidades relativas dos sinais das flavanonas naringenina e narirutina. Analisando esses gráficos é possível observar que os extratos de bagaços apresentaram maiores intensidades relativas para a naringenina, exceto a amostra CLP e BLP. Já para a flavanona narirutina, nota-se que as amostras de laranjas (CLP, BLP, CLB e BLB) possivelmente possuem maior abundância desse composto, se considerado as intensidades relativas encontradas. (CAO, YE, CAO *et al.*, 2015) De modo geral, as intensidades relativas encontradas para naringenina e narirutina foram baixas em relação às outras flavanonas de interesse, que possuíam intensidades relativas interessantes em alguns extratos. No estudo de Cao *et al.* (2015) as flavanonas naringenina e narirutina foram as de menores concentrações na quantificação, sendo 15,16 ng/ml e 1755,56 ng/ml em laranja, respectivamente. Para tangerina e limão apenas foi quantificada a narirutina com 62,89 ng/ml e 19,61 ng/ml, respectivamente. (CAO, YE, CAO *et al.*, 2015)

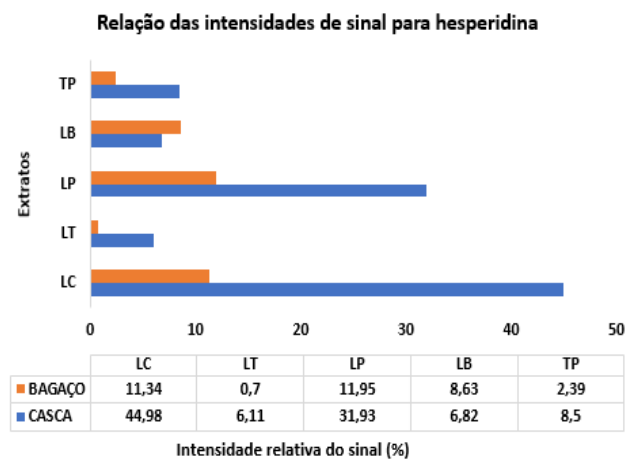


Gráfico 1 – Intensidades dos sinais da flavanona hesperidina em cada extrato.

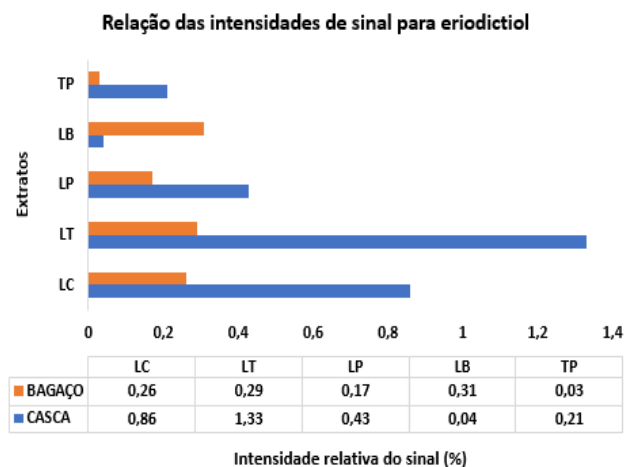


Gráfico 3 – Intensidades dos sinais da flavanona eriodictiol em cada extrato.

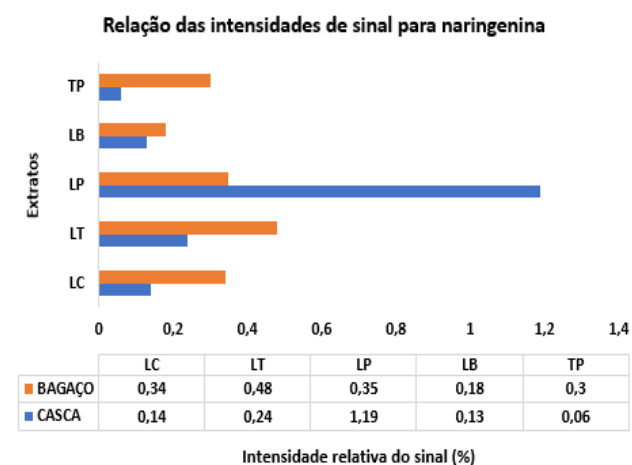


Gráfico 5 – Intensidades dos sinais da flavanona naringenina em cada extrato.

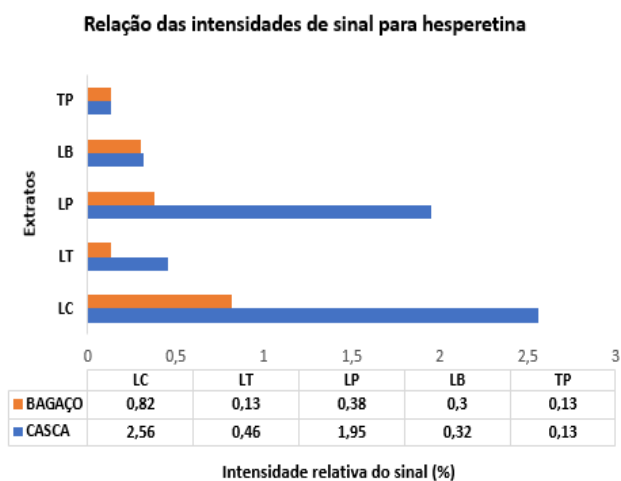


Gráfico 2 – Intensidades dos sinais da flavanona hesperidina em cada extrato.

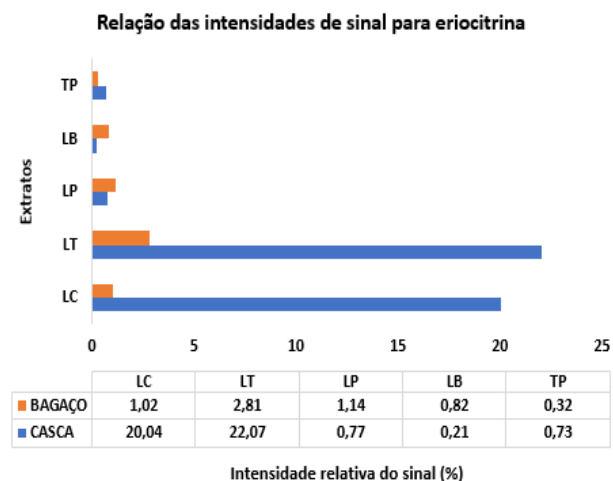


Gráfico 4 – Intensidades dos sinais da flavanona eriocitrina em cada extrato.

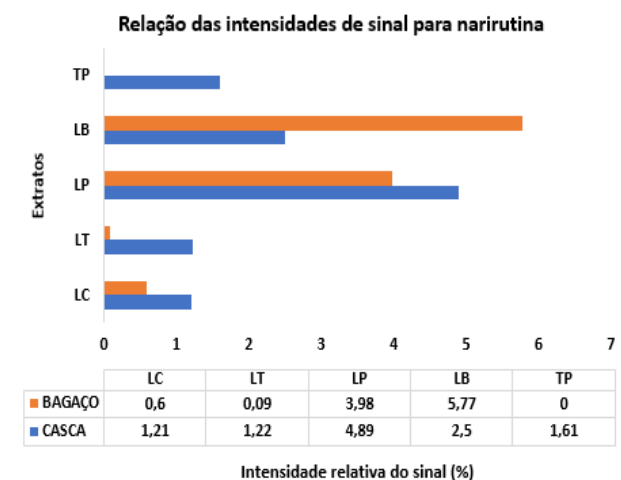
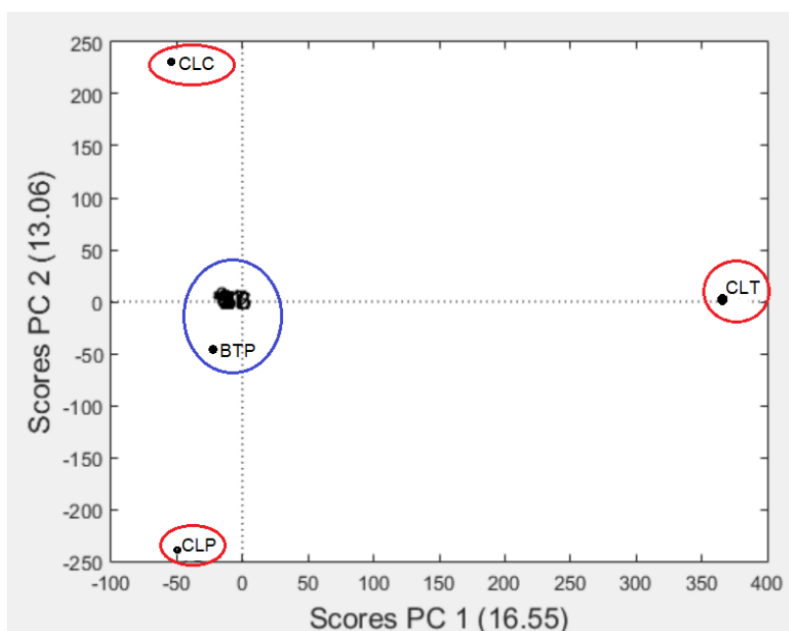


Gráfico 6 – Intensidades dos sinais da flavanona narirutina em cada extrato.

**Figura 7 -** Gráficos das intensidades relativas das principais substâncias observadas na espectrometria de massas.  
Fonte: Autoria própria.

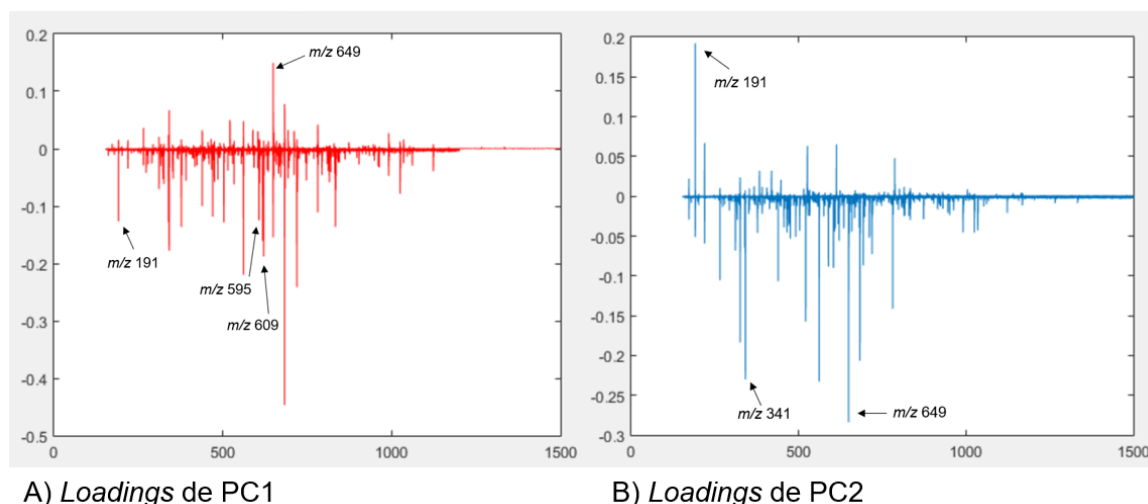
## 4.2 Análise de componentes principais (PCA) dos dados ESI (-) FT-ICR MS

Após a realização da espectrometria de massas de altíssima resolução ESI (-) FT-ICR MS, utilizou-se os valores de íons moleculares  $[M-H]^-$  das amostras trabalhadas, bem como as intensidades relativas dos sinais, como dados de entrada para produzir a PCA. O objetivo na utilização da PCA foi verificar as relações existentes entre as variáveis presentes nos extratos etanólicos das frutas cítricas e realizar um reconhecimento de padrões/classificação das amostras. A figura 8 mostra o resultado da análise de PCA, mostrando os eixos PC1 (16,55%) x PC2 (13,06%). De acordo com o gráfico, nota-se um grupo de amostras quimicamente semelhantes, circulado em azul e três amostras circuladas em vermelho, que se distanciam quimicamente do grupo azul. Na figura 9, temos o gráfico de *loadings*, que nos possibilita reconhecer as regiões de maior importância para o modelo em termo de variância, de forma que quanto maior a intensidade do sinal, maior a importância da variável naquela componente principal estudada.



**Figura 8** - Gráfico da análise de componentes principais (PCA) das dez amostras trabalhadas neste estudo.

Fonte: Autoria própria.



**Figura 9** - Gráfico de *loadings* de PC1 e PC2.  
Fonte: Autoria própria.

Correlacionando os resultados observados nas figuras 8 e 9, temos: as amostras CLC, CLT e CLP, em vermelho, são respectivamente extratos das cascas de limão cravo (*Citrus limonia Osbeck*), limão taiti (*Citrus latifolia Tanaka*) e laranja pera (*Citrus sinensis L.*). Para as amostras em azul, estão todos os extratos de bagaço e o extrato de casca de tangerina ponkan (amostra CTP). A amostra CLT (extrato da casca do limão tahiti) mostrou um comportamento interessante, por estar distante das demais amostras.

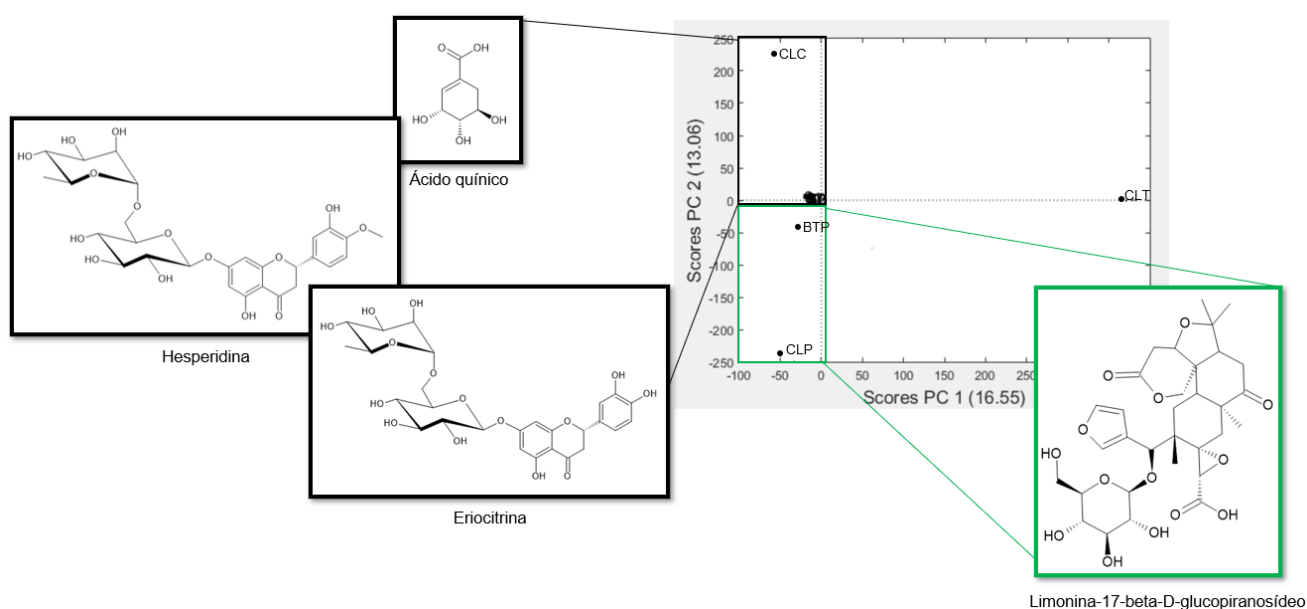
Na tentativa de justificar a disposição das amostras no espaço gráfico, de acordo com o gráfico de *loadings* (figura 9A e B), observa-se para as amostras de bagaços (BLT, BLC, BLB, BLP) e CLC (figura 8), um sinal *m/z* 191 presente tanto em PC1(-), quanto em PC2(+), área onde se encontram as amostras. Ele foi tentativamente identificado como o ácido quínico e é possivelmente responsável pelo agrupamento dessas amostras. Rosa *et al.* (2022) mostraram que o ácido quínico está majoritariamente presente no albedo e flavedo de *Citrus*, regiões do bagaço. (ROSA, PETRETTO, MALDINI *et al.*, 2022) Além disso, observando o *loading* da PC1(-), é possível notar uma maior contribuição, em termos de variância, de uma maior variedade de compostos, entre eles *m/z* 191 (ácido quínico), 595 (eriocitrina) e 609 (hesperidina) que estão ausentes ou com menor intensidade na PC1(+), colaborando para concentração das amostras nessa região, PC1(-). (LEDESMA-ESCOBAR, PRIEGO-CAPOTE e DE CASTRO, 2015)

A distribuição das amostras, quando avaliada pelo eixo da PC2, nos mostra uma situação semelhante; as amostras dispostas no quadrante da PC2(-), BTP e CLP,

apresentam mais de um sinal  $m/z$  que contribuiu para a disposição dessas amostras. Com destaque para o  $m/z$  649, de maior intensidade e ausente na PC2 (+). Portanto, a ausência principalmente deste íon  $m/z$  649 na PC2(+) pode ter influenciado para que grande parte das amostras de bagaço tenham ficado posicionadas juntas na PC2(+). Entre os sinais majoritários presentes, estão  $m/z$  341 e  $m/z$  649, tentativamente identificados como o dissacarídeo sacarose ou isômero e limonina-17-beta-D-glucopiranosídeo, respectivamente.

A análise de componentes principais mostra-se um método quimiométrico eficiente para a separação de amostras de produtos naturais de acordo com seu perfil químico. Soares (2011), encontrou em seu trabalho, utilizando a PCA em dados de HPLC-DAD, diferenças no perfil químico de folhas de laranja pêra e limão cravo, onde essas amostras apresentaram-se em quadrantes opostos tomando PC1 como parâmetro. (SOARES, 2011) De maneira semelhante, cascas de laranja pêra (CLP) e limão cravo (CLC) foram observadas em quadrantes opostos ao analisar-se a PC2 (figura 8).

A figura 10 correlaciona o gráfico de scores de PCA com as áreas em que cada composto descrito teve influência.



**Figura 10** - Identificação dos compostos verificados na PCA.

Fonte: Autoria própria.

Observando a amostra CLT (casca do limão tahiti) presente em PC1(+) e PC2(+), verificou-se um sinal de alta intensidade majoritário em PC1(+) próximo à razão massa-carga  $m/z$  649, substância identificada anteriormente como limonina-17-

beta-D-glucopiranosídeo, um limonoide, onde estudos anteriores quantificaram sua maior presença em espécies de laranjas ( $142 \pm 20 \mu\text{g/mL}$ ), mas não em limões, como é o caso de Miyagi *et al.* (2000). (BENNETT, MIYAKE, OZAKI *et al.*, 1991; HUANG, DONG, XIONG *et al.*, 2021; MIYAGI, OM, CHEE *et al.*, 2000) Portanto, este composto não seria o responsável pelo afastamento da amostra CLT das demais. Além disso, esta variável também se mostrou presente na PC1(-) com mesmo nível de intensidade. De fato, o que discriminou as demais amostras concentradas em sua grande maioria na PC1(-) em relação à amostra CLT na PC1(+) foi a contribuição, citada anteriormente, em termos de variância, de uma maior variedade de compostos, que estão ausentes ou com menor intensidade na PC1(+).

Resultados muito semelhantes foram conseguidos por Wang e colaboradores que analisaram espécies de laranja e limão utilizando a técnica HPLC–DAD–QqTOF–MS/MS. A PCA separou o flavedo (parte da casca) de outros três resíduos, entre eles o bagaço, em todas as espécies, indicando que o flavedo apresenta diferenças em sua composição química quando comparado a outros resíduos. Além disso, os bagaços das espécies mostraram menores variações por estarem localizados próximos, indicando padrões semelhantes no seu perfil. (WANG, YANG, TU *et al.*, 2017)

### 4.3 Avaliação da citotoxicidade em macrófagos (RAW 264.7) e linhagem de adenocarcinoma gástrico (AGS)

Após a análise do perfil químico dos extratos e identificada a presença de importantes flavanonas, realizou-se os testes biológicos a fim de encontrar os extratos com maior atividade citotóxica para células RAW e AGS. A tabela 4 apresenta os resultados para ambos os testes e o valor  $IC_{50}$  para o padrão de cisplatina.

**Tabela 4** - Valores  $IC_{50}$  para as amostras cítricas no teste MTT sobre células RAW 264.7, AGS e padrão de cisplatina.

Amostra	Padrão Cisplatina	CLC	BLC	CLT	BLT	CLP	BLP	CLB	BLB	CTP
RAW ( $\mu\text{g/mL}$ )	$4,13 \pm 0,28$	> 800	> 800	$296,2 \pm 0,13$	> 800	$691 \pm 0,94$	> 800	$513,7 \pm 0,44$	> 800	> 800
AGS ( $\mu\text{g/mL}$ )	$4,35 \pm 0,90$	> 200	> 200	$59,04 \pm 1,06$	$38,44 \pm 0,82$	$101,3 \pm 5,3$	$125,40 \pm 0,82$	$96,89 \pm 2,04$	> 200	> 200

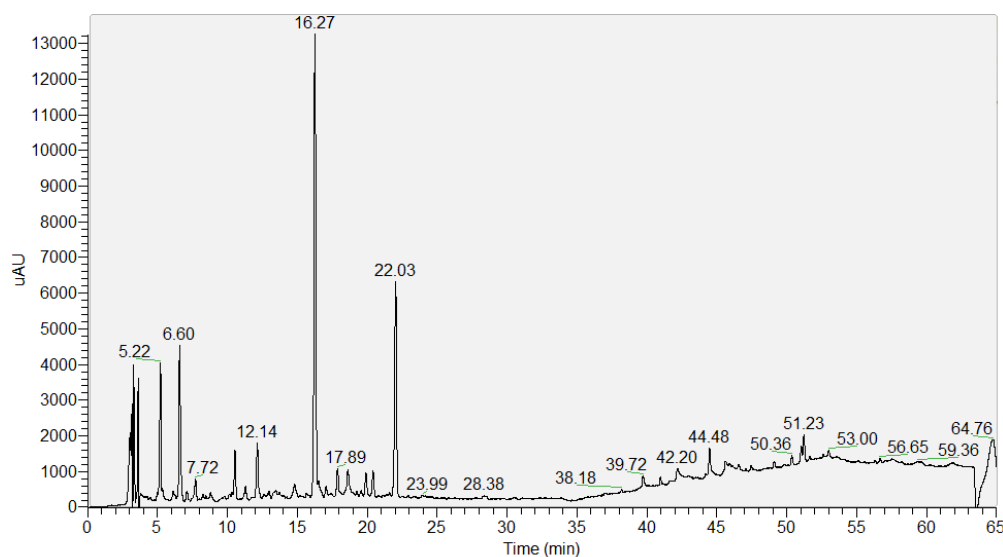
Como resultado, os macrófagos RAW 264.7 apresentaram alta viabilidade frente a maioria dos extratos; entretanto, o extrato de casca de limão tahiti apresentou certa toxicidade ( $296,2 \pm 0,13 \mu\text{g/mL}$ ). Vale ressaltar que, apesar da concentração encontrada para cisplatina (padrão já utilizado em tratamentos quimioterápicos) nos testes em células AGS ( $4,35 \pm 0,90 \mu\text{g/mL}$ ) ser menor do que as concentrações dos extratos de frutas cítricas, ou seja, apresentar maior atividade antiproliferativa, seu resultado para teste em macrófagos RAW é consideravelmente inferior aos dos extratos, visto que em concentrações acima de  $4,13 \pm 0,28 \mu\text{g/mL}$  apresentam toxicidade para células normais.

Nota-se que as melhores atividades antiproliferativas para as células AGS foram das amostras BLT e CLT respectivamente, ou seja, para o limão tahiti. Partindo destes resultados, pressupõe-se que elas tenham uma composição química característica. Desta maneira, para acessá-la, realizou-se análises por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (UPLC-MS).

De maneira semelhante, o estudo de Pagliara e colaboradores também encontrou um bom resultado para atividade antiproliferativa do extrato da casca do limão (*Citrus limon*) em células AGS. Para o mesmo período de tempo de incubação (24h), o resultado IC<sub>50</sub> para esse extrato foi de  $5,08 \mu\text{g/mL}$ . Porém não foram realizados testes em macrófagos RAW para determinar sua citotoxicidade. Não foram encontrados na literatura outros estudos que comparem a atividade antiproliferativa em células AGS para extratos de bagaços e cascas de laranjas e limões. (PAGLIARA, NASSO, DI DONATO *et al.*, 2019)

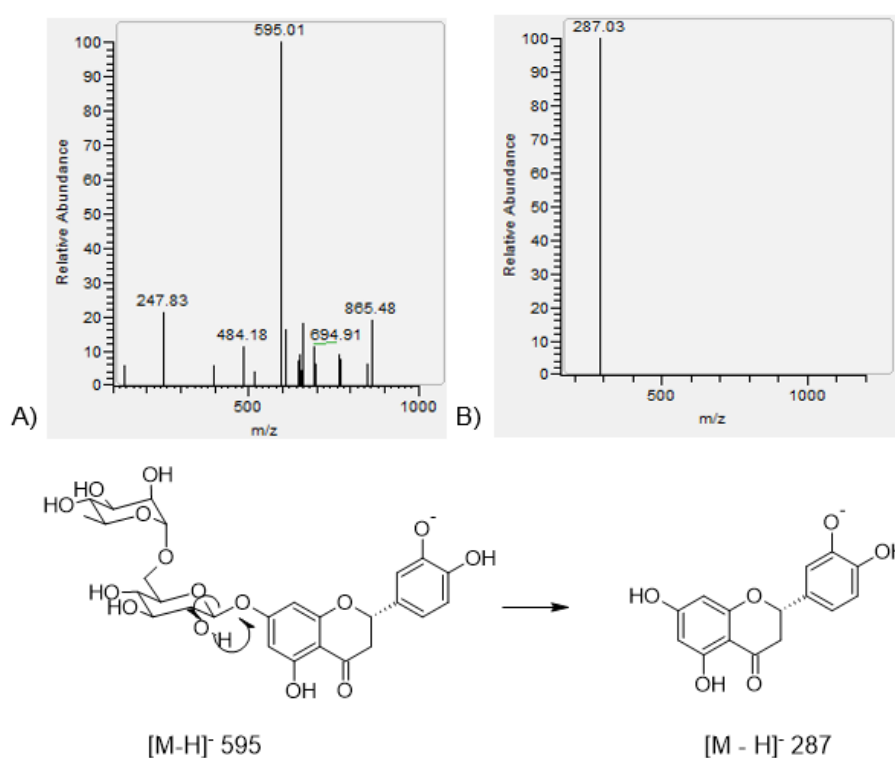
#### **4.4 Cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a espectrometria de massas**

A figura 11 mostra o cromatograma referente ao bagaço do limão tahiti, que apresentou a melhor atividade citotóxica para AGS, onde dois picos mais intensos em 16,27 e 22,03 min, foram identificados como as flavanonas eriocitrina (m/z 595) e hesperidina (m/z 609), respectivamente.



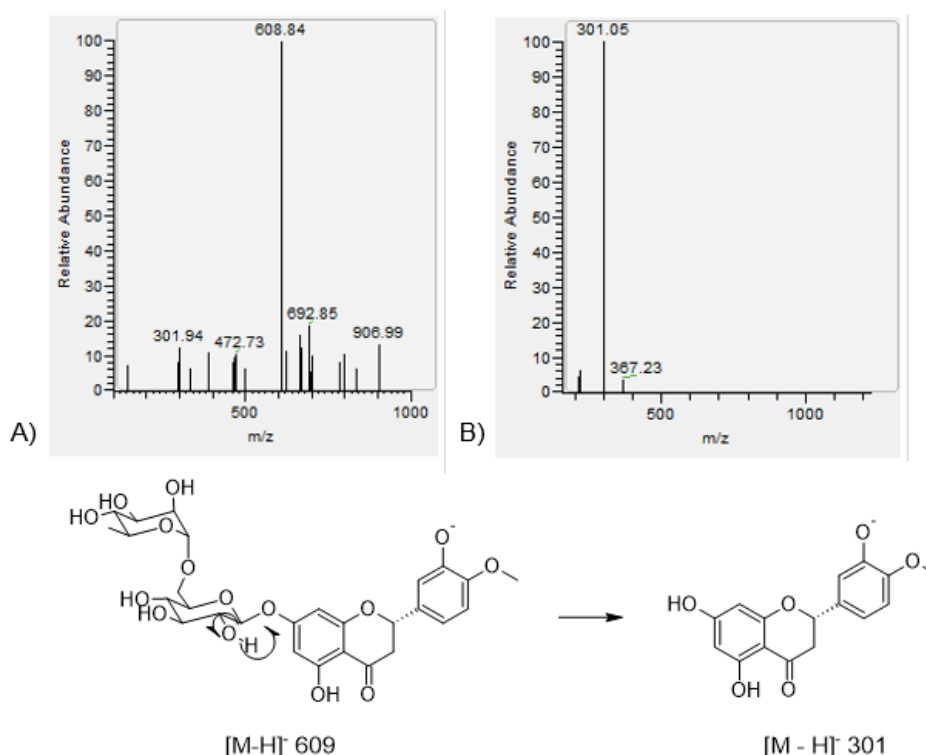
**Figura 11** - Cromatograma UPLC-MS para o extrato etanólico BLT (bagaço limão tahiti).  
Fonte: Autoria própria.

Para o tempo de retenção em 16,27 minutos tem-se o espectro de massas apresentado na figura 12 A, onde observa-se um sinal  $[M-H]^-$  de alta intensidade com  $m/z$  595,01. Este sinal refere-se a flavanona eriocitrina, pois, sob fragmentação  $MS^2$ , apresentado na figura 12 B, produz o fragmento  $m/z$  287,03, que corresponde a flavanona eriodictiol, aglicona da eriocitrina.



**Figura 12** - Espectro de massas referente ao tempo de retenção 16.27 min (MS e  $MS^2$ , respectivamente) e proposta de fragmentação.  
Fonte: Autoria própria.

Já para o tempo de retenção 22.03 minutos, tem-se um espectro de massas apresentado na figura 13 A, onde observa-se um sinal de alta intensidade em  $m/z$  608,84. Esse sinal corresponde a flavanona hesperidina, pois ao ser fragmentado em MS<sup>2</sup>, como mostrado na figura 13 B, produz um sinal  $m/z$  301,05, correspondendo à flavanona hesperetina, aglicona da eriocitrina.

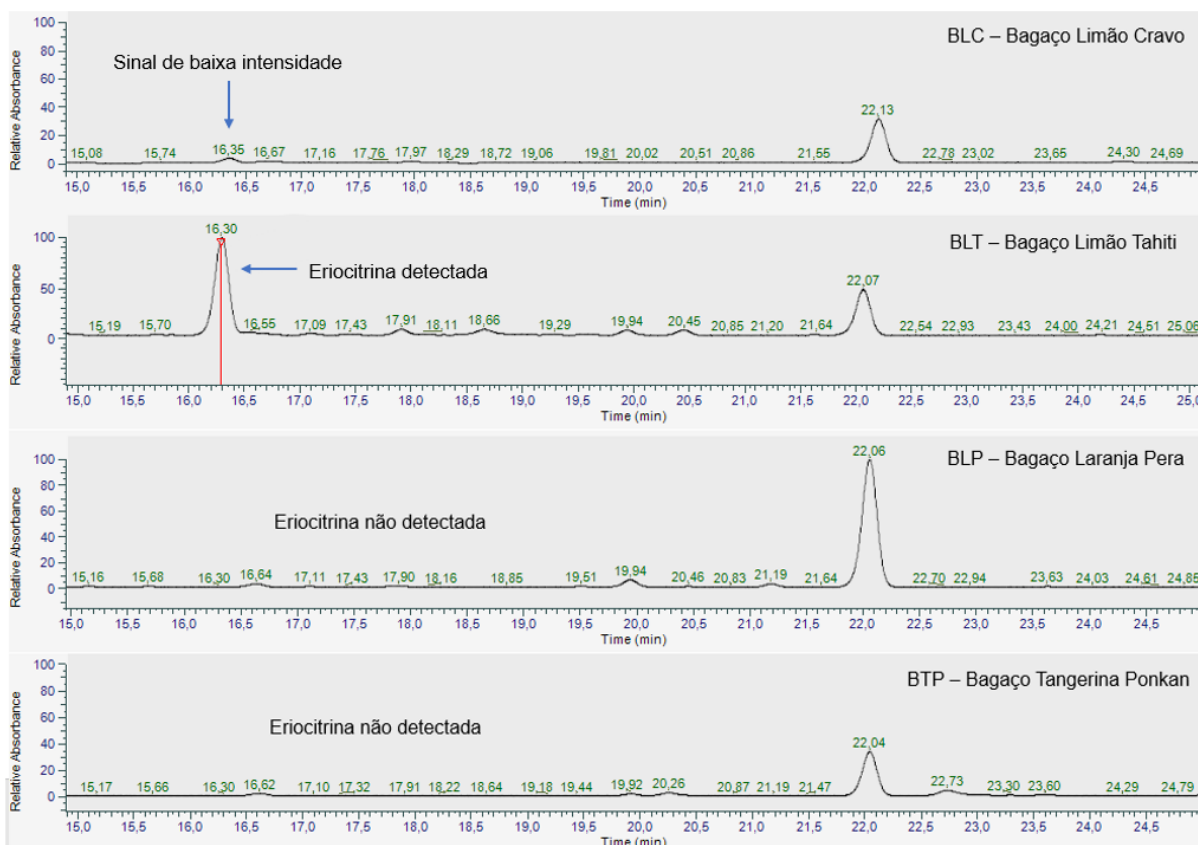


**Figura 13** - Espectro de massas referente ao tempo de retenção 22.03 min (MS e MS<sup>2</sup>, respectivamente) e proposta de fragmentação.  
Fonte: Autoria própria.

O estudo de Canzi (2018) também encontrou essas mesmas flavanonas no suco do limão tahiti através de análises por LC-MS/MS. As flavanonas aparecem com tempo de retenção diferente do encontrado, possivelmente por conta do equipamento e parâmetros utilizados, porém a eriocitrina é observada em um tempo de retenção mais curto em relação a hesperidina, o que vai de acordo com o estudo presente. Os espectros de massas também apresentam sinais muito semelhantes, o que colabora com a fragmentação das substâncias. (CANZI, 2018)

É possível observar que a hesperidina apresenta boas intensidades relativas de sinal para todas as amostras analisadas, porém a eriocitrina ocorre para as amostras de limão (CLC, BLC, CLT e BLT), onde sua intensidade de sinal se destaca

nas amostras CLT e BLT. A figura 14 compara os cromatogramas UPLC-MS das amostras BLC, BLT, BLP e BTP, na região entre 15 a 25 minutos e mostra a detecção da eriocitrina nas amostras de limão, com destaque no limão tahiti. Para BLT observa-se um sinal intenso no tempo de retenção de 16,30 minutos.

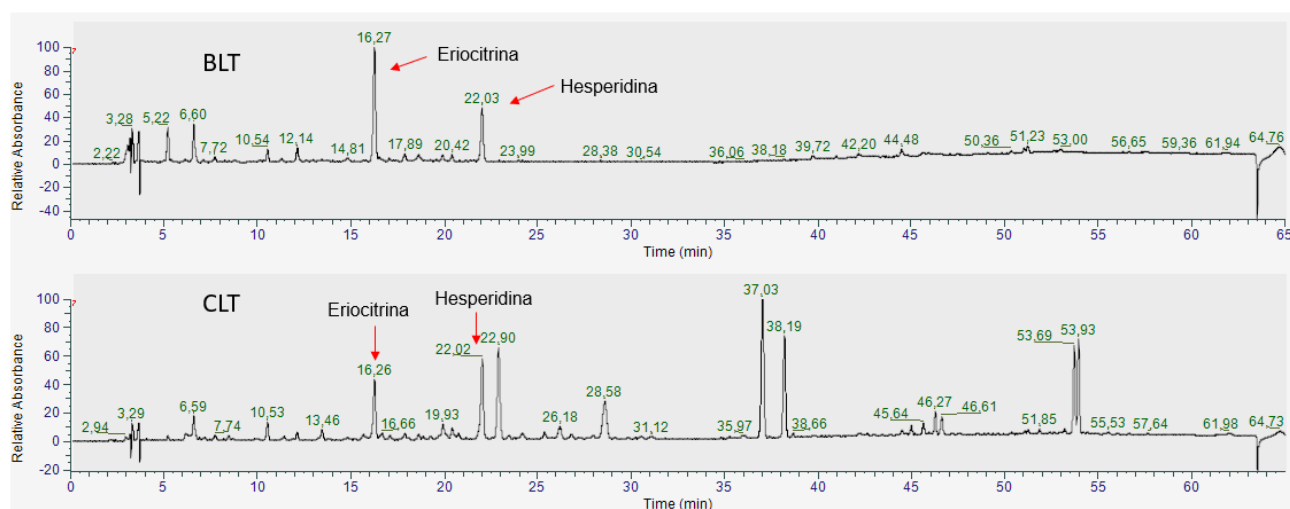


**Figura 14** - Presença de flavanonas na região de tempos de retenção entre 15 e 25 minutos no cromatograma UPLC-DAD-MS dos extratos cítricos.  
Fonte: Autoria própria.

O estudo de Sanches e colaboradores (2022) encontrou resultados próximos ao que foi observado, porém para amostras de cascas dos mesmos *Citrus* em estudo. Sua análise foi realizada por UPLC-Q/TOF MS com as seguintes variedades: limão tahiti (*Citrus latifolia*), limão cravo (*Citrus limonia*), laranja (*Citrus sinensis*) e tangerina ponkan (*Citrus reticulata*). Os autores detectaram a 260 nm, a presença da eriocitrina apenas no limão tahiti e a neoeriocitrina no limão tahiti e limão cravo, com intensidade maior para o primeiro. (SANCHES, CUNHA, VIGANÓ *et al.*, 2022)

Quando comparado ao cromatograma de CLT, que contém maior diversidade de substâncias, BLT é muito mais simples e enriquecido nas flavanonas eriocitrina e hesperidina (figura 15). Além disso, é possível notar a diferença no número de sinais. No cromatograma da amostra BLT (bagaço do limão tahiti) não foi possível detectar

várias substâncias que apareceram em CLT.

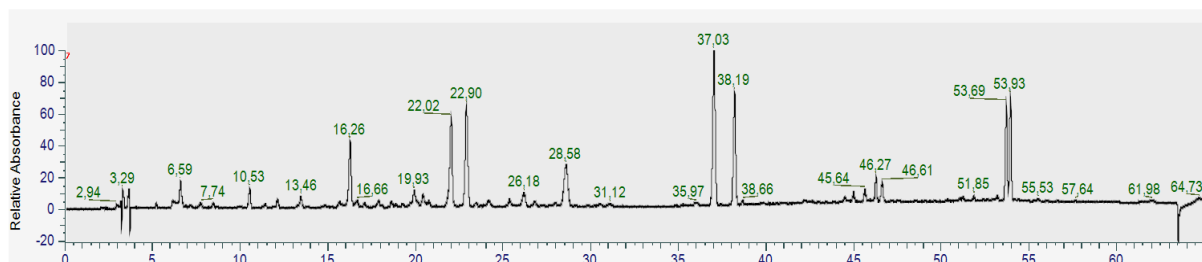


**Figura 15** - Cromatograma UPLC-DAD-MS das amostras BLTxCLT.

Fonte: Autoria própria.

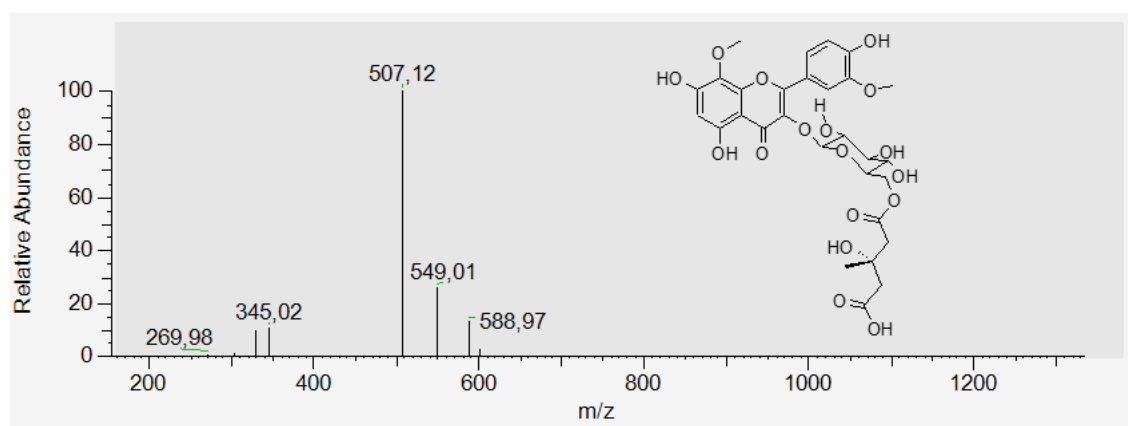
O cromatograma UPLC-DAD-MS da amostra CLT (extrato da casca do limão tahiti), no modo negativo, apresentou a flavanona eriocitrina, entretanto, novos flavonoides foram detectados. Já no modo positivo, cumarinas e limonoides foram observados. Os flavonóis limocitrina-3-hidroxi-3-metilglutaril glicosídeo ( $C_{29}H_{31}O_{17}$ ,  $m/z = 651$ ) e limocitrol-3-hidroxi-3-metilglutaril glicosídeo ( $C_{30}H_{33}O_{18}$ ,  $m/z = 681$ ), por exemplo, foram eluídos como um único sinal em 22,90 minutos. As cumarinas 5,7-dimetoxicumarina (limettina), 5-metoxipsoraleno (bergapteno), os isômeros 5-geraniloxipsoraleno/8-geraniloxipsoraleno e 5-geraniloxi-7-metoxicumarina foram identificadas nos tempos de retenção 37,03, 38,2, 53,7 e 53,9 min., respectivamente.

A figura 16 apresenta o cromatograma UPLC-MS da amostra CLT, as figuras 17, 18 e 19 os espectros de massas  $MS^2$  referente a cada flavonol citado anteriormente e a proposta de fragmentação. Limocitrina 3-hidroxi-3-metilglutaril glicosídeo  $m/z$  651 apresentou os fragmentos  $m/z$  589 (perda de  $CO_2$  e  $H_2O$  de  $m/z$  651),  $m/z$  549 (perda de  $C_4H_6O_3$  de  $m/z$  651) e  $m/z$  507, como pico de base, representando a perda de  $C_2H_2O$  de  $m/z$  549. Estes fragmentos confirmam a presença da cadeia lateral do ácido 3-hidroxi-3-metilglutárico. Estas mesmas perdas podem ser atribuídas aos fragmentos  $m/z$  619, 579 e 537 para limocitrol 3-hidroxi-3-metilglutaril glicosídeo a  $m/z$  681. Os fragmentos  $m/z$  345 e 375 comprovam as agliconas limocitrina e limocitrol respectivamente. (LEDESMA-ESCOBAR, PRIEGO-CAPOTE e DE CASTRO, 2015).



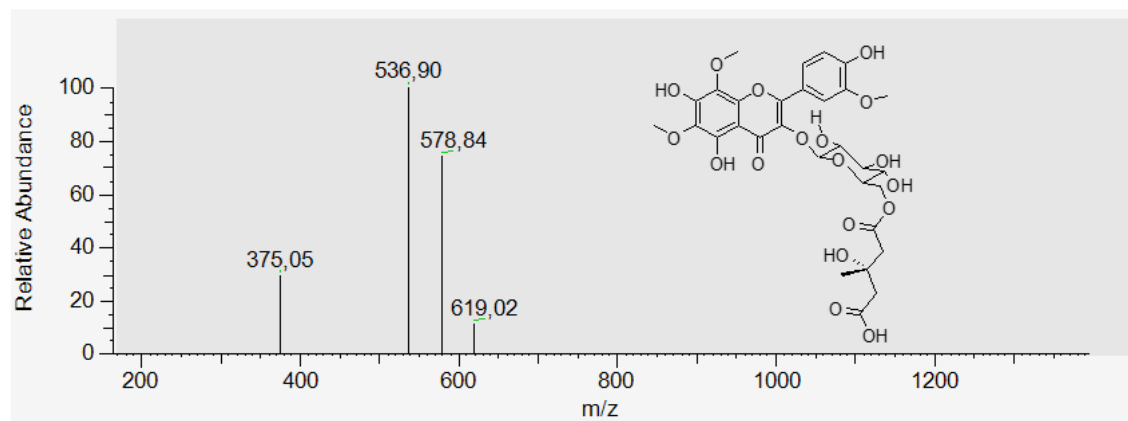
**Figura 16** - Cromatograma UPLC-MS da amostra CLT.

Fonte: Autoria própria.



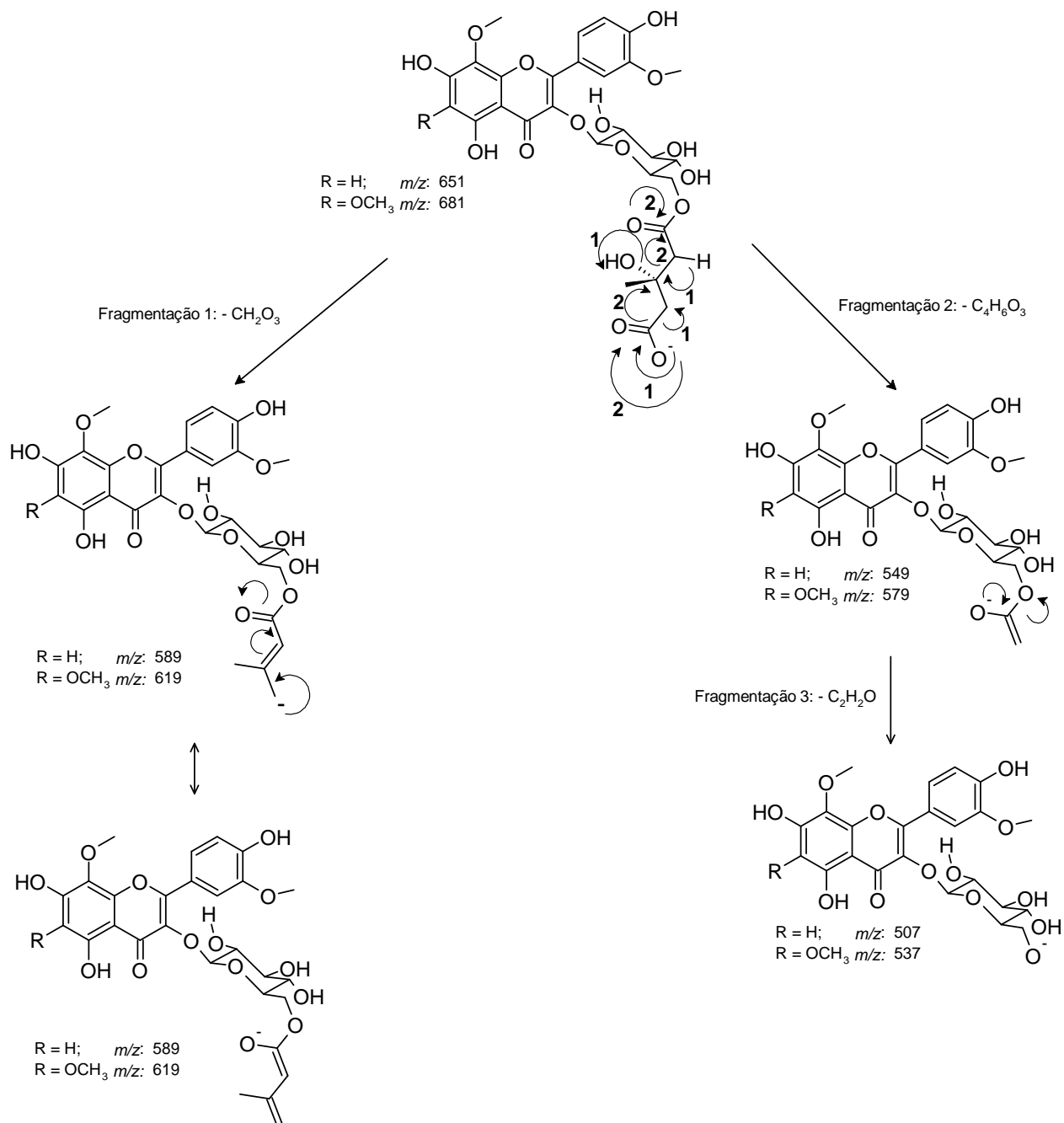
**Figura 17** - MS<sup>2</sup> referente ao limocitrina-3-hidroxi-3-metilglutaril glicosídeo na fonte ESI (-).

Fonte: Autoria própria.



**Figura 18** - MS<sup>2</sup> referente ao limocitrol-3-hidroxi-3-metilglutaril glicosídeo na fonte ESI (-).

Fonte: Autoria própria.



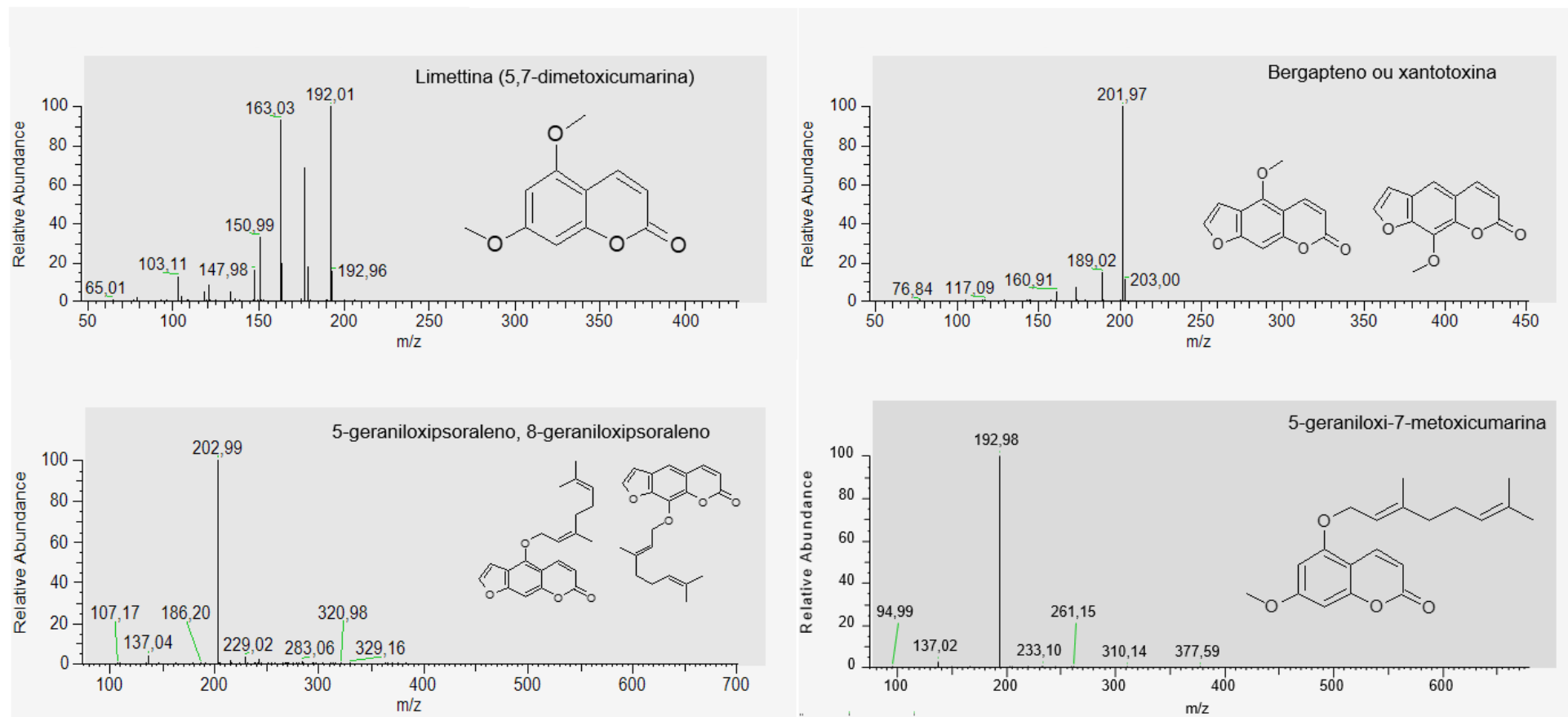
**Figura 19** - Proposta de fragmentação para limocitrina e limocitrin 3-hidroxi-3-metilglutaril glicosídeos na fonte ESI (-).  
 Fonte: Autoria própria.

A pequena toxicidade do extrato de casca de limão Taiti em macrófagos pode ser devida à presença da porção 3-hidroxi-3-metil glutarato de alguns glicosídeos flavônicos (limocitrina e limocitrol). Este ácido orgânico induz estresse oxidativo e perturba a bioenergética celular (DA ROSA, DA ROSA-JUNIOR, PARMEGGIANI *et al.*, 2020). Esses flavonóis só foram encontradas na casca desse resíduo.

Os fragmentos em  $m/z$  192 e 163 para a limettina e  $m/z$  203 para o bergapteno, 5-geraniloxipsoraleno, 8-geraniloxipsoraleno e 5-geraniloxi-7-metoxicumarina comprovam a presença das cumarinas. As figuras 20 e 21 apresentam as estruturas e as propostas de fragmentações para as cumarinas encontradas na amostra CLT.

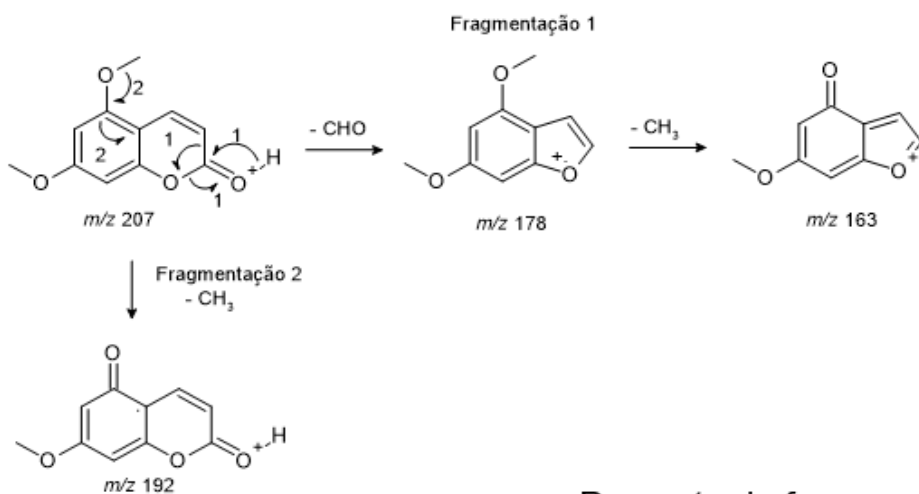
Os estudos de Fernandes *et al.* e Liu *et al.* mostraram resultados próximos aos encontrados pelas análises de UPLC-MS no extrato da casca do limão tahiti. Foram encontradas as cumarinas 5,7-dimetoxicumarina, 5-geraniloxi-7-metoxicumarina, 5-geraniloxipsoraleno. (FERNANDES, SALOMÉ-ABARCA, PEREIRA *et al.*, 2022; LIU, LI e HO, 2022)

Ledesma-Escobar e colaboradores também encontraram um número maior de compostos na casca do limão. Entre eles estão: eriocitrina, hesperidina, limocitrina-3-hidroxi-3-metilglutaril glicosídeo, limocitrol-3-hidroxi-3-metilglutaril glicosídeo e ácido quínico. (LEDESMA-ESCOBAR, PRIEGO-CAPOTE e DE CASTRO, 2015).

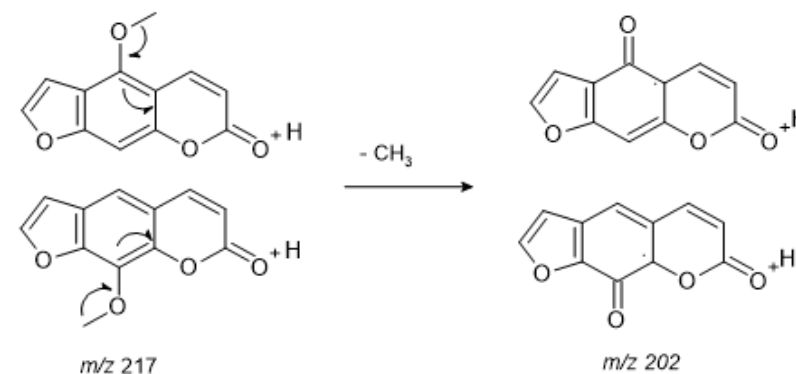


**Figura 20** - Espectros de massas MS<sup>2</sup> de cumarinas na casca do limão tahiti na fonte ESI (+).  
Fonte: Autoria própria.

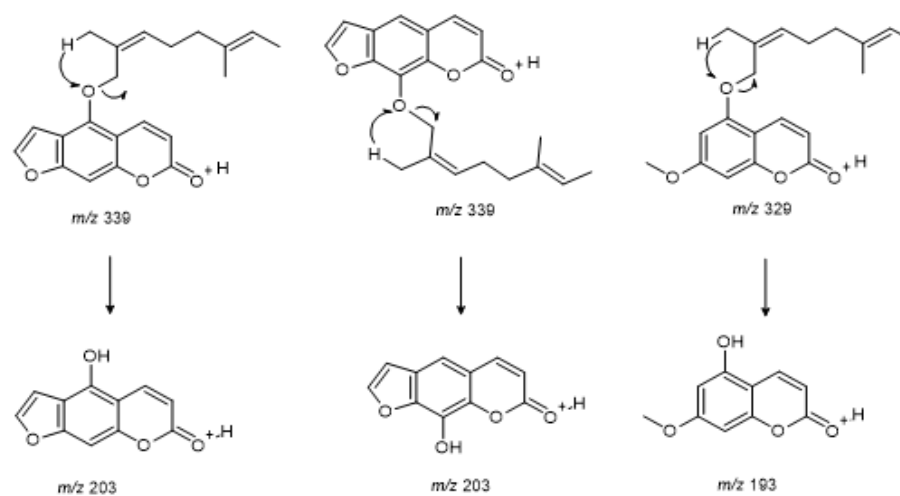
## Proposta de fragmentação da limettina



## Proposta de fragmentação do bergapteno/xantotoxina



## Proposta de fragmentação geraniloxi cumarinas



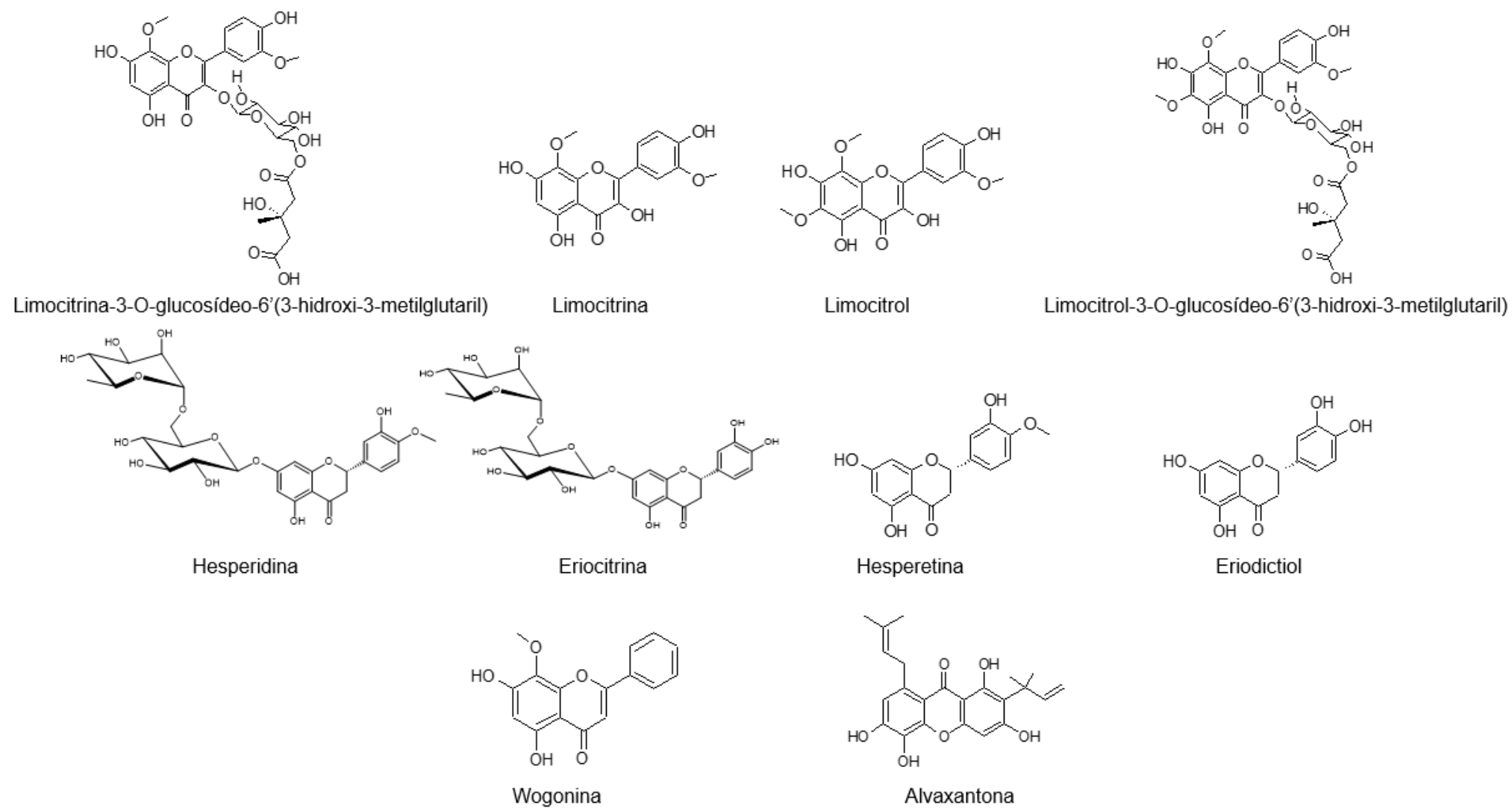
**Figura 21** - Propostas de fragmentações das cumarinas encontradas na casca do limão tahiti na fonte ESI (+).  
Fonte: Autoria própria.

Cumarinas são comumente encontradas em casca de limão tahiti, mas parecem não estar relacionadas à atividade antiproliferativa sobre células AGS, visto que o extrato de casca de limão tahiti foi menos ativo que o de bagaço. As geraniloxi cumarinas suprimem a respiração celular ao atingir a cadeia de transporte de elétrons mitocondrial, podendo se esperar certa toxicidade para as linhagens celulares (LI, MAHDI, DU, *et al.*, 2013).

Curiosamente, as amostras ativas nas células AGS mostraram maiores áreas relativas dos sinais de hesperidina e/ou eriocitrina no UPLC-MS. As áreas para eriocitrina foram de 5,2% (CLT) e 19,4% (BLT), mas não detectadas nas demais amostras. As áreas para hesperidina foram 9,4% (CTP), 34,5% (CLP), 7,1% (CLT), 9,0% (BLT) e 10,6% (CLC). As amostras mais ativas (BLT e CLT) continham eriocitrina e hesperidina. Aqueles contendo apenas hesperidina, mas com áreas percentuais relativas elevadas, foram mais ativos do que aqueles com áreas menores. Parece haver um sinergismo na atividade antiproliferativa, quando ambas as flavanonas estão presentes no extrato, o que torna o limão Tahiti o mais ativo.

#### **4.5 Estudos *in silico***

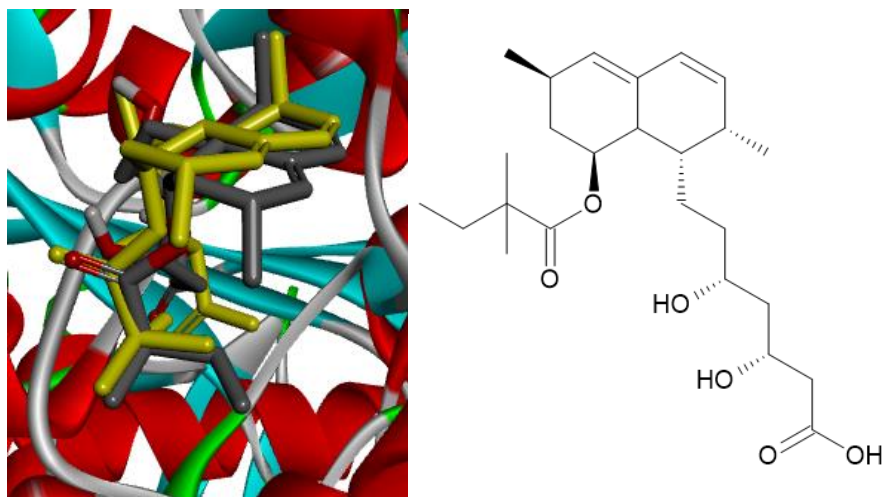
Tendo em vista a importância das flavanonas cítricas para a atividade antiproliferativa de resíduos cítricos, conforme descrito em inúmeros artigos, foi proposto avaliar *in silico* os principais flavonoides (flavanonas e flavonois) encontrados no limão tahiti (*Citrus latifolia Tanaka*), suas estruturas estão representadas na figura 22. Essa escolha se deu pela maior atividade antiproliferativa de seus resíduos.



**Figura 22** - Estruturas dos flavonoides selecionados para avaliação *in silico*.  
 Fonte: Autoria própria.

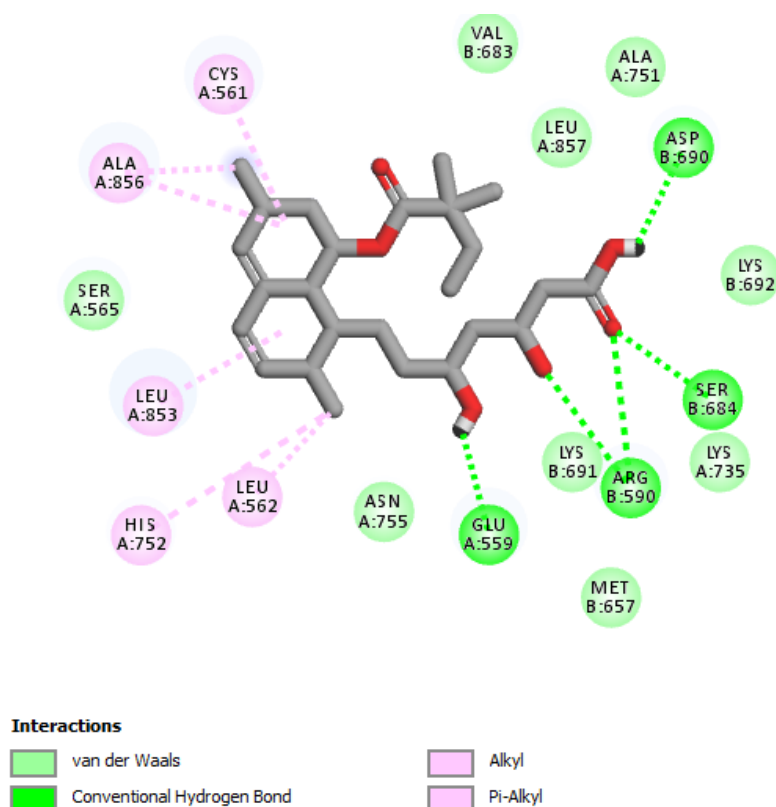
Selecionou-se duas enzimas para o estudo de ancoragem molecular, 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA redutase (HMGCR) e timidilato sintase (TS). A capacidade do limão de reduzir os níveis de colesterol no sangue é conhecida na literatura (MIYAKE, SUZUKI, OHYA *et al.*, 2006). Essa função é estabelecida para medicamentos da classe das estatinas, que são inibidores da HMGCR, enzima limitante da velocidade de síntese do colesterol. Considerando que as estatinas também foram capazes de inibir a proliferação de células neoplásicas, incluindo o câncer gástrico, considerou-se oportuno verificar a possibilidade das flavanonas, bem como outros flavonóides cítricos, também inibir esta enzima e, desta forma, contribuir para o efeito antiproliferativo do limão tahiti. (SINGH e SINGH, 2013) Na tumorigênese, a via do mevalonato para a síntese do colesterol é aumentada, portanto o bloqueio da enzima chave para a biossíntese do mevalonato parece ser um alvo interessante para a terapia do câncer (ORTIZ, DELGADO-CARAZO e DÍAZ, 2021). Chushi e colaboradores demonstraram que o HMGCR é superexpresso no câncer gástrico e que aumentar sua expressão nas células do câncer gástrico acelera seu crescimento e capacidade de migração (CHUSHI, WEI, KANGKANG *et al.*, 2016). Vários trabalhos sugeriram que os compostos fenólicos podem inibir a HMGCR. (LEE, HUH, NAM *et al.*, 2012; LEOPOLDINI, MALAJ, TOSCANO *et al.*, 2010; GRANDE, OCCHIUZZI, PERRI *et al.*, 2021)

Validou-se o protocolo de ancoragem sobrepondo-se a pose ancorada de menor energia à estrutura co-cristalizada da sinvastatina extraída do complexo ligante-proteína (PDB: 1HW9), ou seja, sinvastatina-HMGCR, obtendo-se um valor baixo de desvio quadrático médio calculado (RMSD) de 1,4826 Å (figura 23).



**Figura 23** - Sobreposição do ligante co-cristalizado simvastatina (em amarelo) e seu ligante redocado na HMG-CoA redutase humana.  
Fonte: A autoria própria.

A figura 24 mostra as interações entre a simvastatina e o HMGCR, exibindo extensas interações hidrofóbicas e de hidrogênio. O grupo carboxila da simvastatina estabeleceu ligações de hidrogênio com os aminoácidos Asp690, Ser684 e Arg590. A  $\beta$ -hidroxila também interagiu com Arg590 e a  $\delta$ -hidroxila interagiu com Glu559. Esses resíduos são descritos em interações polares com outras estatinas e HMGCR (ISTVAN e DEISENHOFER, 2001). O anel decalina do ácido simvastatina estabeleceu interações hidrofóbicas com os resíduos de aminoácidos Cys561, Ala856, Leu853, His752 e Leu562. Exceto Cys561 e His752, esses resíduos, além de Val683 e Leu857, estão envolvidos através de interações de van der Waals com estatinas (ISTVAN e DEISENHOFER, 2001).



**Figura 24** - Conformação (Pose) de ancoragem do ácido sinvastatina (diagrama 2D) no sítio de ligação da HMG-CoA redutase humana.

Fonte: Autoria própria.

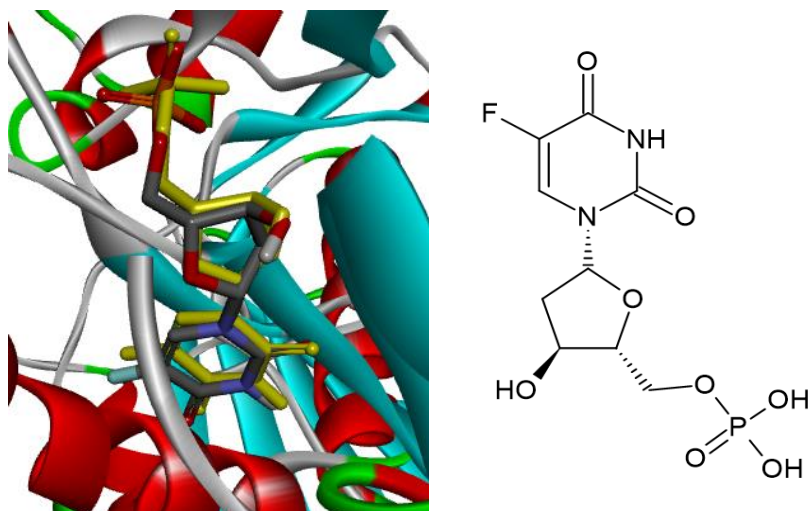
Simulações de docagem molecular de todos os compostos fenólicos no sítio de ligação do HMGCRC humano revelaram energias de interação variando de  $-6,8$  a  $-8,0$  kcal mol<sup>-1</sup>, de acordo com a tabela 5, enquanto o ácido sinvastatina mostrou  $-7,2$  kcal mol<sup>-1</sup> sugerindo que todos os compostos fenólicos de *Citrus* podem interagir com o sítio ativo da enzima.

**Tabela 5** - Energias de interação (em kcal mol<sup>-1</sup>) de compostos fenólicos e ácido sinvastatina com HMG-CoA redutase, HMGCRC. (PDB:1HW9).

Composto	Energia de interação (kcal mol <sup>-1</sup> )
Sinvastatina (ligante cristalográfico)	-7.2
Alvaxantona	-7.9
Eriocitrina	-7.7
Eriodictiol	-7.6
Hesperidina	-8.0
Hesperetina	-6.8
Limocitrol glicosídeo-3-hidroxi-3- metilglutaril	-7.3
Limocitrina	-7.3
Limocitrina glicosídeo-3-hidroxi-3- metilglutaril	-7.8
Limocitrol	-6.8
Wogonina	-8.0

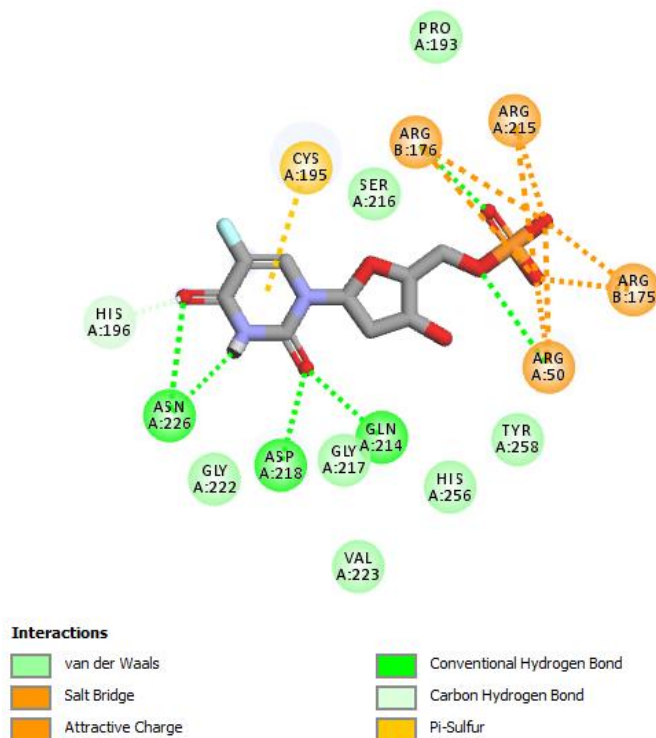
As simulações indicam que, para a maioria dos ligantes, ligações de hidrogênio e interações  $\pi$  são formadas com pelo menos um dos aminoácidos descritos nas interações com o ácido sinvastatina e outras estatinas (ISTVAN e DEISENHOFER, 2001). A eriocitrina, a hesperidina e a hesperetina estabelecem ligações de hidrogênio com os resíduos Arg590 e Asp690, também identificados para o ácido sinvastatina. His752 e Ser684, que estavam envolvidos em interações hidrofóbicas com a sinvastatina, estabelecem ligações de hidrogênio com eriocitrina, limocitrina e limocitrina glicosídeo-3-hidroxi-3-metilglutaril. Entre os compostos fenólicos, a hesperidina e a wogonina exibiram valores de interação energética mais estabilizadores, e estabeleceram interações hidrofóbicas com Val683 e Leu857. Além disso, a hesperidina também interage com His752 e Leu562, e a wogonina interage com Leu853. Com exceção da hesperetina e do limocitrol, todos os compostos fenólicos apresentaram maior afinidade pelo HMGCR do que pelo ácido sinvastatina, o que pode estar associado à existência de ligações de hidrogênio e interações  $\pi$  com aminoácidos essenciais, em vez de interações mais fracas, como do tipo alquila, como visto para a sinvastatina. Nossos cálculos sugerem que os compostos fenólicos dos cítricos têm potencial para serem agentes anticancerígenos, possivelmente, através da interação com o HMGCR.

Nas últimas décadas, a monoterapia com 5-fluorouracil (5-FU) ou sua combinação com outros medicamentos convencionais, como a cisplatina, emergiu consistentemente como a abordagem primária para o tratamento do câncer gástrico avançado (XU, TANG, XIE *et al.*, 2015). O monofosfato de 5-fluoro-2'-desoxiuridina (FdUMP) é o metabólito ativo do 5-FU, que inibe a timidilato sintase (TS), resultando na diminuição da produção de monofosfato de desoxitimidina (dTMP) e prejudicando a síntese de DNA (ZHANG, YIN, XU *et al.*, 2008). Vários artigos sugeriram que compostos fenólicos, como flavonóides e xantonas, podem inibir a timidilato sintase (MAJ, MORI, SOBICH *et al.*, 2020; ZHAO, CHEN, WANG *et al.*, 2010; SIRAGUSA, LUCIANI, BORSARI *et al.*, 2016). Neste contexto, escolheu-se a timidilato sintase para avaliar um possível modo de ação anticancerígena para compostos fenólicos de *Citrus*. Assim como o HMGCR, o protocolo de acoplamento foi validado sobrepondo a conformação (pose) ancorada de menor energia à estrutura co-cristalizada de FdUMP extraída do complexo ligante-proteína com timidilato sintase (PDB: 6QXG) (POZZI, FERRARI, LUCIANI *et al.*, 2019), obtendo um valor baixo de Desvio Quadrático Médio (RMSD) de 0,3047 Å (figura 25).



**Figura 25** - Sobreposição do ligante cocristalizado 5-fluor- 2'-desoxiuridina-5'-monofosfato (FdUMP, em amarelo) e seu ligante redockado no sítio de ligação da timidilato sintase.  
Fonte: Autoria própria.

A Figura 26 mostra a interação entre FdUMP e TS, mostrando principalmente ligações de hidrogênio com os resíduos de aminoácidos do sítio ativo de TS, como visto entre os grupos ceto do anel uracila e Asn226, Asp218 e Gln214, e também para –NH e Asn226. A porção fosfato esteve envolvida em interações de cargas atrativas com Arg50, Arg175, Arg215 e Arg176. De acordo com trabalhos anteriores, as interações com Arg50, Ser216, Asn226 e Asp218 são essenciais para a inibição da timidilato sintase (TIWARI, SEIJAS, VAZQUEZ-TATO *et al.*, 2016; EWEAS, ABDALLAH e HASSAN, 2014).



**Figura 26** - Pose de ancoragem de FdUMP (diagrama 2D) no sítio de ligação da enzima timidilato sintase humana.  
Fonte: Autoria própria.

Simulações de ancoragem molecular foram realizadas para avaliar as interações de todos os compostos fenólicos encontrados em *Citrus* no sítio de ligação da TS humana. Os valores de energia de ligação calculados variaram de  $-5,4$  a  $-8,2$  kcal mol<sup>-1</sup>, em contraste com a molécula de referência, FdUMP ( $-9,2$  kcal mol<sup>-1</sup>), conforme descrito na tabela 6.

**Tabela 6** - Energias de interação (em kcal mol<sup>-1</sup>) de FdUMP e flavonoides/compostos fenólicos com timidilato sintase. (APO: 6QXG).

Composto	Energia de interação (kcal mol <sup>-1</sup> )
FdUMP (ligante cristalográfico)	-9.2
Alvaxantona	-8.2
Eriocitrina	-7.6
Eriodictiol	-7.6
Hesperidina	-7.6
Hesperetina	-7.5
Limocitrina glicosídeo-3-hidroxi-3-metil-glutaril	-5.4
Limocitrina	-7.9
Limocitrol glicosídeo-3-hidroxi-3-metil-glutaril	-5.4
Limocitrol	-7.5
Wogonina	-7.5

Notavelmente, os valores de energia de ligação mais baixos ( $-5,4$  kcal mol<sup>-1</sup>) estão associados às moléculas ligadas ao grupo glicosídeo-3-hidroxi-3-metil-glutaril, enquanto outros compostos exibiram valores de energia de ligação variando de  $-7,5$

kcal mol<sup>-1</sup> a -8,2 kcal mol<sup>-1</sup>. Isso sugere que esses compostos poderiam interagir com esse alvo molecular.

Todos os compostos fenólicos acoplados mostraram ser capazes de estabelecer ligações de hidrogênio com pelo menos um dos aminoácidos descritos nas interações com o FdUMP, ou considerados resíduos-chave para a inibição da TS, conforme representado na figura 26. Como observado para FdUMP, ocorreram interações de ligações de hidrogênio entre alvaxantona, eriocitrina, hesperetina, limocitrina, limocitrina glicosídeo-3-hidroxi-3-metil-glutaril e Asn226. Além da Asn226, a limocitrina e seu heterosídeo estabeleceram ligações de hidrogênio com o Asp218. Essa interação também ocorreu para eriodictiol, limocitrol, limocitrol glicosídeo-3-hidroxi-3-metil-glutaril e wogonina. Ao contrário do FdUMP, a alvaxantona, a eriocitrina, o eriodictiol, o limocitrol, o limocitrol glicosídeo-3-hidroxi-3-metil-glutaril e a wogonina foram capazes de interagir com o Ser216, um aminoácido importante para a inibição da TS. Em vez de interação iônica, como visto para FdUMP, hesperidina, limocitrina e limocitrina glicosídeo-3-hidroxi-3-metil-glutaril, limocitrol glicosídeo glicosídeo-3-hidroxi-3-metil-glutaril e wogonina interagiram com Arg50, que também é considerado um aminoácido chave, através de ligação de hidrogênio. Dentre os compostos fenólicos, a alvaxantona exibiu o melhor valor de interação energética e foi capaz de estabelecer interações hidrofóbicas extras com Ala312, Phe225, Trp109 e Ile108, o que provavelmente contribui para sua acomodação no sítio ativo da TS. Maj *et al.* (2020) descreveram o efeito antiproliferativo da alvaxantona em células tumorais e associado à inibição da TS (MAJ, MORI, SOBICH *et al.*, 2020). Além de uma possível ação sobre o HMGR, sugere-se que os fenólicos dos *Citrus* podem interagir com a timidilato sintase e figurar como potenciais agentes antitumorais ao inibir esta enzima.

## 5. CONCLUSÃO

As técnicas empregadas neste estudo demonstraram ser eficazes para identificação do perfil químico das flavanonas presentes em amostras de resíduos de frutas cítricas. Os ensaios de atividade antiproliferativa sobre células AGS e em macrófagos RAW 264.7 foram bem-sucedidos, fornecendo bons resultados para a amostra BLT (bagaço do limão tahiti), variedade facilmente encontrada no Brasil, com concentrações citotóxicas  $IC_{50}$  de  $38,44 \pm 0,82 \mu\text{g/mL}$  e superior a  $800 \mu\text{g/mL}$  para células AGS e RAW, respectivamente. Vale destacar que, o resultado de citotoxicidade para macrófagos RAW foi melhor para a amostra BLT em relação ao padrão de cisplatina ( $4,13 \pm 0,28 \mu\text{g/mL}$ ), mostrando-o ser não citotóxico em concentrações mais elevadas. A aplicação da UPLC-MS permitiu diferenciar quimicamente as amostras BLT e CLT, mostrando uma menor variedade de moléculas para amostra BLT com melhor atividade citotóxica, o que sugere haver uma maior diluição em CLT das moléculas ativas. Hesperidina e eriocitrina são sugeridas como moléculas responsáveis pela atividade antiproliferativa dos extratos, o que é reforçado por resultados da literatura. Através de estudos *in silico*, essas substâncias foram capazes de se ligar aos sítios ativos da timidilato sintase e do HMGCR, enzimas importantes para a proliferação celular, as quais estão super expressas em células de câncer. Os resultados apresentados são de grande relevância para a agroindústria brasileira, pois permite o aproveitamento desses subprodutos para o desenvolvimento de novos produtos de maior valor agregado, como para gerar novos produtos úteis no tratamento ou no manejo do câncer gástrico.

## 6. REFERÊNCIAS

- AGGARWAL, V.; TULI, H. S.; THAKRAL, F.; SINGHAL, P.; AGGARWAL, D.; SRIVASTAVA, S.; PANDEY, A.; SAK, K.; VAROL, M.; KHAN, M. A.; SETHI, G. Molecular mechanisms of action of hesperidin in cancer: Recent trends and advancements. *Exp Biol Med*, **245**, 486–497, 2020.
- AMARAL, S. M. B.; BESSA, M. J.; CAVALCANTE, M. R. F.; DE FREITAS, F. N. F.; MAIA, M. B. V.; DA COSTA JÚNIOR, R. A.; DAMACENO, M. N. Resíduos da laranja na elaboração de produtos alimentícios: Uma revisão. *Res., Soc. Dev.*, **10**, 6, 2021.
- ARNOSO, B. J. DE M.; DA COSTA, G. F.; SCHMIDT, B. Biodisponibilidade e classificação de compostos fenólicos. *Nutrição Brasil*, **18**, 39-48, 2019.
- ÁVILA-GÁLVEZ, M. Á.; GIMÉNEZ-BASTIDA, J. A.; GONZÁLEZ-SARRÍAS, A.; ESPÍN, J. C. New insights into the metabolism of the flavanones eriocitrin and hesperidin: A comparative human pharmacokinetic study. *Antioxidants*, **10**, 1–20, 2021.
- BACKUS, H. H. J.; WOUTERS, D.; FERREIRA, C. G.; VAN HOUTEN, V. M. M.; BRAKENHOFF, R. H.; PINEDO, H. M.; PETERS, G. J. Thymidylate synthase inhibition triggers apoptosis via caspases-8 and -9 in both wild-type and mutant p53 colon cancer cell lines. *Eur. J. Cancer*, **39**, 1310–1317, 2003.
- BENNETT, R. D.; MIYAKE, M.; OZAKI, Y.; HASEGAWA, S. Limonoid glucosides in citrus aurantium. *Phytochemistry*, **30**, 3803–3805, 1991.
- BERTUCCIO, P.; ALICANDRO, G.; ROTA, M.; PELUCCHI, C.; BONZI, R.; GALEONE, C.; BRAVI, F.; JOHNSON, K. C.; HU, J.; PALLI, D.; FERRARONI, M.; LÓPEZ-CARRILLO, L.; LUNET, N.; FERRO, A.; MALEKZADEH, R.; ZARIDZE, D.; MAXIMOVITCH, D.; VIOQUE, J.; NAVARRETE-MUNOZ, E. M.; PAKSERESHT, M.; HERNÁNDEZ-RAMÍREZ, R. U.; LÓPEZ-CERVANTES, M.; WARD, M.; POURFARZI, F.; TSUGANE, S.; HIDAKA, A.; ZHANG, Z. F.; KURTZ, R. C.; LAGIOU, P.; LAGIOU, A.; BOFFETTA, P.; BOCCIA, S.; NEGRI, E.; LA VECCHIA, C. Citrus fruit intake and gastric cancer: The stomach cancer pooling (StoP) project consortium. *Int. J. Cancer*, **144**, 2936–2944, 2019.
- BJARNADOTTIR, O.; FELDT, M.; INASU, M.; BENDAHL, P. O.; ELEBRO, K.; KIMBUNG, S.; BORGQUIST, S. Statin use, HMGCR expression, and breast cancer survival – The Malmö Diet and Cancer Study. *Sci. Rep.*, **10**, 1–10, 2020.
- BRERETON, R. G. Chemometrics : Data Analysis for the Laboratory and Chemical Plant. *J. Anal. Chem.*, **60**, 1115–1118, 2005.
- Câncer de estômago. Disponível em: <<https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/tipos/estomago%0A>>. Acesso em: 6 jun. 2023.
- CANZI, E. F. **Avaliação do potencial biológico do suco de limão tahiti (citrus latifolia) no controle do fluxo menstrual.** Tese (Doutorado em Química), Universidade Federal do Paraná (UFPR), Curitiba, 2018.

CAO, W.; YE, L. H.; CAO, J.; XU, J. J.; PENG, L. Q.; ZHU, Q. Y.; ZHANG, Q. Y.; HU, S. S. Quantitative analysis of flavanones from citrus fruits by using mesoporous molecular sieve-based miniaturized solid phase extraction coupled to ultrahigh-performance liquid chromatography and quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, **1406**, 68–77, 2015.

CHEN, Y.; XU, Y.; WEN, J.; YU, Y.; WU, J.; CHENG, L.; CHEANG, W. S.; LIU, W.; FU, M. Analysis of Flavonoid Metabolites in *Citrus reticulata* 'Chachi' at Different Collection Stages Using UPLC-ESI-MS/MS. *Foods*, **12**, 2023.

CHOI, E. J.; KIM, G.-H. 5-Fluorouracil combined with apigenin enhances anticancer activity through induction of apoptosis in human breast cancer MDA-MB-453 cells. *Oncol. Rep.*, **23**, 861–867, 2010.

CHUSHI, L.; WEI, W.; KANGKANG, X.; YONGZENG, F.; NING, X.; XIAOLEI, C. HMGR is up-regulated in gastric cancer and promotes the growth and migration of the cancer cells. *Gene*, **587**, 42–47, 2016.

Cinco conceitos importantes sobre cromatografia. Disponível em: <<https://modumtech.com.br/conceitos-importantes-sobre-cromatografia/>>. Acesso em: 17 jul. 2023.

DA ROSA, M. S.; DA ROSA-JUNIOR, N. T.; PARMEGGIANI, B.; GLÄNZEL, N. M.; DE MOURA, A. L.; RIBEIRO, R. T.; GRINGS, M.; WAJNER, M.; LEIPNITZ, G. 3-Hydroxy-3-Methylglutaric Acid Impairs Redox and Energy Homeostasis, Mitochondrial Dynamics, and Endoplasmic Reticulum–Mitochondria Crosstalk in Rat Brain. *Neurotox Res*, **37**, 314–325, 2020.

DA SILVA, C. G. A.; COLLINS, C. H. Applications of high performance liquid chromatography for the study of emerging organic pollutants. *Quím.*, **34**, 4, 665–676, 2011.

DA SILVA, L. M.; PEZZINI, B. C.; SOMENSI, L. B.; BOLDA MARIANO, L. N.; MARIOTT, M.; BOEING, T.; DOS SANTOS, A. C.; LONGO, B.; CECHINEL-FILHO, V.; DE SOUZA, P.; DE ANDRADE, S. F. Hesperidin, a citrus flavanone glycoside, accelerates the gastric healing process of acetic acid-induced ulcer in rats. *Chem Biol Interact*, **308**, 45–50, 2019.

DA SILVEIRA, J. Q. **Biodisponibilidade de flavanonas e atividade antioxidante do suco de laranja fresco versus suco de laranja pasteurizado em humanos saudáveis**. Tese (Doutorado em Ciências Nutricionais), Universidade Estadual Paulista (UNESP), Araraquara, 2014.

DE ALMEIDA, S. T.; FERRAZ, E.; JUNIOR, L. A. R. M.; LIRA, M.; DE ALMEIDA, A. P. T. Perfil do câncer gástrico: experiência no hospital das clínicas-ufpe-inca. **Medicina e adesão à inovação**. Ponta Grossa-PR: Atena Editora, 2021, 135–143 p.

DE SOUSA, J. R. **Flavanonas antivirais de espécies de *Citrus* cultivadas no**

**Espírito Santo.** Monografia (Graduação em Química), Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), Vitória, 2021.

DE SOUZA, A. M.; POPPI, R. J. Experimento Didático de Quimiometria Para Análise Exploratória de Óleos Vegetais Comestíveis por Espectroscopia no Infravermelho Médio e Análise de Componentes Principais: Um Tutorial, Parte I. *Quím.*, **35**, 223–229, 2012.

DEWICK, P. M. **Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach**, 7ª Ed. Nottingham, UK, Editora John Wiley & Sons, LTD, 2002. 486 p.

EWEAS, A. F.; ABDALLAH, Q. M. A.; HASSAN, E. S. I. Design, synthesis, molecular docking of new thiopyrimidine-5-carbonitrile derivatives and their cytotoxic activity against HepG2 cell line. *J Appl Pharm Sci*, **4**, 102–111, 2014.

Fechamento da Safra de Laranja 2022/2023. Disponível em:  
<<https://www.fundecitrus.com.br/comunicacao/noticias/integra/safra-de-laranja-202223-e-encerrada-com-producao-total-de-31421-milhoes-de-caixas/1307>>.  
Acesso em: 1 jul. 2023.

FERNANDES, H. P.; SALOMÉ-ABARCA, L. F.; PEREIRA, R. G.; SEIBERT, J. B.; SILVA-JUNIOR, G. J.; DA SILVA, M. F. DAS G. F.; CHOI, Y. H. Metabolomic Investigation of Citrus latifolia and the Putative Role of Coumarins in Resistance to Black Spot Disease. *Front Mol Biosci*, **9**, 2022.

FERREIRA, M. M. C.; ANTUNES, A. M.; MELGO, M. S.; VOLPE, P. L. O. Quimiometria I: Calibração Multivariada, Um Tutorial. *Quím.*, **22**, 724–731, 1999.

GATTUSO, G.; BARRECA, D.; GARGIULLI, C.; LEUZZI, U.; CARISTI, C. Flavonoid composition of citrus juices. *Molecules*, **12**, 1641–1673, 2007.

GÓMEZ-MEJÍA, E.; ROSALES-CONRADO, N.; LEÓN-GONZÁLEZ, M. E.; MADRID, Y. Citrus peels waste as a source of value-added compounds: Extraction and quantification of bioactive polyphenols. *Food Chem*, **295**, 289–299, 2019.

GRANDE, F.; OCCHIUZZI, M. A.; PERRI, M. R.; IOELE, G.; RIZZUTI, B.; STATTI, G.; GAROFALO, A. Polyphenols from citrus tacle extract endowed with hmgcr inhibitory activity: An antihypercholesterolemia natural remedy. *Molecules*, **26**, 2021.

GRUZ, J.; NOVÁK, O.; STRNAD, M. Rapid analysis of phenolic acids in beverages by UPLC-MS/MS. *Food Chemistry*, **111**, 789–794, 2008.

GUO, C.; ZHANG, L.; ZHAO, M.; AI, Y.; LIAO, W.; WAN, L.; LIU, Q.; LI, S.; ZENG, J.; TANG, J. Targeting lipid metabolism with natural products: A novel strategy for gastrointestinal cancer therapy. *Phytother Res*, **37**, 2036–2050, 2023.

HUANG, S.; DONG, T.; XIONG, B.; QIU, X.; SUN, G.; LIAO, L.; FAN, N.; WANG, X.; DENG, H.; HE, S.; HU, Y.; WANG, Z. Variation in the content and composition of limonoids in fruits of four pomelo varieties during fruit development: The natural debittering process in pomelo fruits. *J Food Compost Anal*, **100**, 103928, 2021.

- HUANG, W. Q.; HU, X.; ZENG, J. R.; TIAN, X. F.; WU, Z. Q. Changing the nutrient composition and enhancing the hydrolytic enzyme activity of citrus pulp residue by cofermentation with *Candida utilis* and *Bacillus subtilis*. *Process Biochem*, **107**, 83–90, 2021.
- HUNLUN, C.; DE BEER, D.; SIGGE, G. O.; WYK, J. VAN. Characterisation of the flavonoid composition and total antioxidant capacity of juice from different citrus varieties from the Western Cape region. *Journal of Food Composition and Analysis*, **62**, 115–125, 2017.
- ISTVAN, E. S.; DEISENHOFER J. Structural Mechanism for Statin Inhibition of HMG-CoA Reductase. *Science*, **292**, 1160-1164, 2001.
- KIM, J.; WIE, M. B.; AHN, M.; TANAKA, A.; MATSUDA, H.; SHIN, T. Benefits of hesperidin in central nervous system disorders: A review. *Anat. Cell Biol.*, **52**, 4, 369–377, 2019.
- KOOLAJI, N.; SHAMMUGASAMY, B.; SCHINDELER, A.; DONG, Q.; DEGHANI, F.; VALTCHEV, P. Citrus Peel Flavonoids as Potential Cancer Prevention Agents. *Curr. Dev. Nutr.*, **4**, 2020.
- LANÇAS, F. M. A Cromatografia Líquida Moderna e a Espectrometria de Massas: finalmente “compatíveis”? *Sci. Chromatogr.*, **1**, 27–46, 2009.
- LANÇAS, F. M. A cromatografia líquida moderna e a espectrometria de massas : Finalmente “ compatíveis ”? II . A escolha do analisador de massas. *Sci. Chromatogr.*, **5**, 27–46, 2013.
- LEDESMA-ESCOBAR, C. A.; PRIEGO-CAPOTE, F.; LUQUE DE CASTRO, M. D. Characterization of lemon (*Citrus limon*) polar extract by liquid chromatography-tandem mass spectrometry in high resolution mode. *J. Mass Spectrom.*, **50**, 1196–1205, 2015.
- LEE, Y-S.; HUH, J-Y.; NAM, S-H.; MOON, S-K.; LEE, S-B. Enzymatic bioconversion of citrus hesperidin by *Aspergillus sojae* naringinase: Enhanced solubility of hesperetin-7-O-glucoside with in vitro inhibition of human intestinal maltase, HMG-CoA reductase, and growth of *Helicobacter pylori*. *Food Chem*, **135**, 2253–2259, 2012.
- LEOPOLDINI, M.; MALAJ, N.; TOSCANO, M.; SINDONA, G.; RUSSO, N. On the Inhibitor Effects of Bergamot Juice Flavonoids Binding to the 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA Reductase (HMGR) Enzyme. *J Agric Food Chem*, **58**, 10768–10773, 2010.
- LI, J.; MAHDI, F.; DU, L.; JEKABSONS, M. B.; ZHOU, Y-D.; NAGLE, D. G. Semisynthetic studies identify mitochondria poisons from botanical dietary supplements Geranyloxycoumarins from *Aegle marmelos*. *Bioorg Med Chem*, **21**, 1795–1803, 2013.
- LIU, S.; LI, S.; HO, C. T. Dietary bioactives and essential oils of lemon and lime fruits.

*Food Sci Hum Wellness*, **11**, 753–764, 2022.

LONGO, J.; MULLEN, P. J.; YU, R.; VAN LEEUWEN, J. E.; MASOOMIAN, M.; WOON, D. T. S.; WANG, Y.; CHEN, E. X.; HAMILTON, R. J.; SWEET, J. M.; VAN DER KWAST, T. H.; FLESHNER, N. E.; PENN, L. Z. An actionable sterol-regulated feedback loop modulates statin sensitivity in prostate cancer. *Mol. Metab.*, **25**, 119–130, 2019.

LV, X.; ZHAO, S.; NING, Z.; ZENG, H.; SHU, Y.; TAO, O.; XIAO, C.; LU, C.; LIU, Y. Citrus fruits as a treasure trove of active natural metabolites that potentially provide benefits for human health. *Chem. Cent. J.*, **9**, 1–14, 2015.

MAJ, P.; MORI, M.; SOBICH, J.; MARKOWICZ, J.; URAM, Ł.; ZIELIŃSKI, Z.; QUAGLIO, D.; CALCATERRA, A.; CAU, Y.; BOTTA, B.; RODE W. Alvaxanthone, a Thymidylate Synthase Inhibitor with Nematocidal and Tumoricidal Activities. *Molecules*, **25**, 2020.

MEIYANTO, E.; HERMAWAN, A.; ANINDYAJATI. Natural products for cancer-targeted therapy: Citrus flavonoids as potent chemopreventive agents. *Asian Pac J Cancer Prev*, **13**, 427–436, 2012.

MINATO, K. I.; MIYAKE, Y.; FUKUMOTO, S.; YAMAMOTO, K.; KATO, Y.; SHIMOMURA, Y.; OSAWA, T. Lemon flavonoid, eriocitrin, suppresses exercise-induced oxidative damage in rat liver. *Life Sci.*, **72**, 1609–1616, 2003.

MIYAGI, Y.; OM, A. S.; CHEE, K. M.; BENNINK, M. R. Inhibition of azoxymethane-induced colon cancer by orange juice. *Nutr. Cancer.*, **36**, 224–229, 2000.

MIYAKE, Y.; SUZUKI, E.; OHYA, S.; FUKUMOTO, S.; HIRAMITSU, M.; SAKAIDA, K.; OSAWA, T.; FURUICHI, Y. Lipid-Lowering Effect of Eriocitrin, the Main Flavonoid in Lemon Fruit, in Rats on a High-Fat and High-Cholesterol Diet. *J Food Sci*, **71**, 2006.

MOREIRA COSTA, G.; GOMES SILVA JUNIOR, G. DA. O Uso De Suplementos Nutracêuticos: Uma Breve Revisão the Use of Nutritional Supplements: a Brief Review. *Braz J Surg Clin Res*, **28**, 77–81, 2019.

O mercado de frutas desidratadas no Brasil. Disponível em: <<https://www.ionics.com.br/o-atual-mercado-de-frutas-citricas-no-brasil>>. Acesso em: 31 mar. 2022.

ÖNDER, G. Ö.; GÖKTEPE, Ö.; BARAN, M.; BITGEN, N.; AYDIN, F.; YAY, A. Therapeutic potential of hesperidin: Apoptosis induction in breast cancer cell lines. *Food Chem. Toxicol.*, **176**, 2023.

ORTIZ, N.; DELGADO-CARAZO, J. C.; DÍAZ, C. Importance of mevalonate pathway lipids on the growth and survival of primary and metastatic gastric carcinoma cells. *Clin Exp Gastroenterol*, **14**, 217–228, 2021.

PAGLIARA, V.; NASSO, R.; DI DONATO, P.; FINORE, I.; POLI, A.; MASULLO, M.; ARCONE, R. Lemon peel polyphenol extract reduces interleukin-6-induced cell

migration, invasiveness, and matrix metalloproteinase-9/2 expression in human gastric adenocarcinoma mkn-28 and TECHags cell lines. *Biomolecules*, **9**, 1-16, 2019.

PANCHE, A. N.; DIWAN, A. D.; CHANDRA, S. R. Flavonoids: An overview. *J. Nutr. Sci.*, **5**, 1-15, 2016.

PANDEY, P.; KHAN, F. A mechanistic review of the anticancer potential of hesperidin, a natural flavonoid from citrus fruits. *Nutr. Res.*, **92**, 21–31, 2021.

PARK, H. J.; PARK, H. J.; RA, J.; HAN, M. Y.; CHUNG, J.-H. Hesperidin induces apoptosis in SNU-668, human gastric cancer cells. *Mol Cell Toxicol*, **3**, 1–7, 2007.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; VYVYAN, J. R. **Introdução à Espectroscopia**. 4ª Ed. Bellingham, Washington, Cengage, 2010. p. 685.

PERDEW, J. P.; CHEVARY, J. A.; VOSKO, S. H.; JACKSON, K. A.; PEDERSON, M. R.; SINGH, D. J.; FIOLEHAIS, C. Atoms, molecules, solids, and surfaces: Applications of the generalized gradient approximation for exchange and correlation. *Phys Rev B*, **46**, 6671–6687, 1992.

PEREIRA, R. **Influência dos flavonoides cítricos na inflamação e controle da obesidade**. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia-Bioquímica), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara, 2015.

POZZI, C.; FERRARI, S.; LUCIANI, R.; TASSONE, G.; COSTI, M.; MANGANI, S. Structural Comparison of Enterococcus faecalis and Human Thymidylate Synthase Complexes with the Substrate dUMP and Its Analogue FdUMP Provides Hints about Enzyme Conformational Variabilities. *Molecules*, **24**, 1257, 2019.

Produção Brasileira de Citros. Disponível em: <<https://ilsabrazil.com.br/producao-brasileira-de-citros/>>. Acesso em: 1 jul. 2023.

Produção de sucos. Disponível em: <<https://citrusbr.com/estatisticas/producao-de-suco/>>. Acesso em: 31 mar. 2022.

PUTRI, N. I.; CELUS, M.; VAN AUDENHOVE, J.; NANSEERA, R. P.; VAN LOEY, A.; HENDRICKX, M. Functionalization of pectin-depleted residue from different citrus by-products by high pressure homogenization. *Food Hydrocoll*, **129**, 107638, 2022.

RAGHEB, A. Y.; MASOUD, M. A.; EL SHABRAWY, M. O.; FARID, M. M.; HEGAZI, N. M.; MOHAMMED, R. S.; MARZOUK, M. M.; ABOUTABL, M. E. MS/MS-based molecular networking for mapping the chemical diversity of the pulp and peel extracts from Citrus japonica Thunb.; in vivo evaluation of their anti-inflammatory and anti-ulcer potential. *Scientific African*, **20**, 2023.

ROSA, A.; PETRETTO, G. L.; MALDINI, M.; TIRILLINI, B.; CHESSA, M.; PINTORE, G.; SARAI, G. Chemical characterization, antioxidant and cytotoxic activity of hydroalcoholic extract from the albedo and flavedo of Citrus limon var. pompia Camarda. *J Food Meas Charact*, **17**, 627–635, 2023.

SANCHES, V. L.; CUNHA, T. A.; VIGANÓ, J.; DE SOUZA MESQUITA, L. M.; FACCIOLI, L. H.; BREITKREITZ, M. C.; ROSTAGNO, M. A. Comprehensive analysis of phenolics compounds in citrus fruits peels by UPLC-PDA and UPLC-Q/TOF MS using a fused-core column. *Food Chemistry: X*, **14**, 2022.

SEMINARA, S.; BENNICI, S.; DI GUARDO, M.; CARUSO, M.; GENTILE, A.; LA MALFA, S.; DISTEFANO, G. Sweet Orange: Evolution, Characterization, Varieties, and Breeding Perspectives. *Agriculture*, **13**, 2, 2023.

SHARMA, K.; MAHATO, N.; CHO, M. H.; LEE, Y. R. Converting citrus wastes into value-added products: Economic and environmently friendly approaches. *Nutrition*, **34**, 29-46, 2017.

SHEN, N.; WANG, T.; GAN, Q.; LIU, S.; WANG, L.; JIN, B. Plant flavonoids: Classification, distribution, biosynthesis, and antioxidant activity. *Food Chem*, **383**, 132531, 2022.

SINGH, P. P.; SINGH, S. Statins are associated with reduced risk of gastric cancer: a systematic review and meta-analysis. *Annals of Oncology*, **24**, 1721–1730, 2013.

SIRAGUSA, L.; LUCIANI, R.; BORSARI, C.; FERRARI, S.; COSTI, M. P.; CRUCIANI, G.; SPYRAKIS F. Comparing Drug Images and Repurposing Drugs with BioGPS and FLAPdock: The Thymidylate Synthase Case. *Chem Med Chem*, **11**, 1653–1666, 2016.

SOARES, M. S. **Estudo da variação do perfil químico de *citrus sinensis* sobre *citrus limonia* após a inoculação da bactéria *xylella fastidiosa***. Tese (Doutorado em Ciências – Química Orgânica), Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), São Carlos, 2011.

SURI, S.; SINGH, A.; NEMA, P. K. Current applications of citrus fruit processing waste: A scientific outlook. *Appl. Food Res.*, **2**, 100050, 2022.

TIWARI, S.; SEIJAS, J.; VAZQUEZ-TATO, M.; SARKATE, A.; LOKWANI, D.; NIKALJE A. Ultrasound Mediated One-Pot, Three Component Synthesis, Docking and ADME Prediction of Novel 5-Amino-2-(4-chlorophenyl)-7-Substituted Phenyl-8,8a-dihydro-7H-(1,3,4) thiadiazolo (3,2- $\alpha$ ) pyrimidine-6-carbonitrile Derivatives as Anticancer Agents. *Molecules*, **21**, 894–906, 2016.

TROTT, O.; OLSON, A. J. AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J Comput Chem*, **31**, 455–461, 2010.

WANG, P.; WANG, H.; XIAO, Y.; ZOU, J.; CHEN, H.; CHEN, L.; WANG, F.; HU, Y.; LIU, Y. Insights into metabolic characteristics and biological activity changes in Zangju (*Citrus reticulata* cv. Manau Gan) peel at different maturity stages through UPLC–MS/MS-based metabolomics. *Food Chemistry: X*, **21**, 2024.

WANG, S.; TU, H.; WAN, J.; CHEN, W.; LIU, X.; LUO, J.; XU, J.; ZHANG, H. Spatio-

temporal distribution and natural variation of metabolites in citrus fruits. *Food Chem*, **199**, 8–17, 2016.

WANG, S.; YANG, C.; TU, H.; ZHOU, J.; LIU, X.; CHENG, Y.; LUO, J.; DENG, X.; ZHANG, H.; XU, J. Characterization and Metabolic Diversity of Flavonoids in Citrus Species. *Sci Rep*, **7**, 2017.

XU, Z-Y.; TANG, J-N.; XIE, H-X.; DU, Y-A.; HUANG, L.; YU, P-F.; CHENG, X. 5-Fluorouracil Chemotherapy of Gastric Cancer Generates Residual Cells with Properties of Cancer Stem Cells. *Int J Biol Sci*, **11**, 284–924, 2015.

YAO, L.; LIU, W.; BASHIR, M.; NISAR, M. F.; WAN, C. Eriocitrin: A review of pharmacological effects. *Biomed Pharmacother*, **154**, 2022.

YUAN, C.; CHEN, G.; JING, C.; LIU, M.; LIANG, B.; GONG, G.; YU, M. Eriocitrin, a dietary flavonoid suppressed cell proliferation, induced apoptosis through modulation of JAK2/STAT3 and JNK/p38 MAPKs signaling pathway in MCF-7 cells. *J Biochem Mol Toxicol*, **6**, 1–8, 2022.

ZHANG, N.; YIN, Y.; XU, S-J.; CHEN, W-S. 5-Fluorouracil: Mechanisms of Resistance and Reversal Strategies. *Molecules*, **13**, 1551–1569, 2008.

ZHAO, L.; CHEN, Z.; WANG, J.; YANG, L.; ZHAO, Q.; WANG, J.; QI, Q.; MU, R.; YOU, Q.; GUO, Q. Synergistic effect of 5-fluorouracil and the flavanoid oroxylin A on HepG2 human hepatocellular carcinoma and on H22 transplanted mice. *Cancer Chemother Pharmacol*, **65**, 481–489, 2010.

ZHAO, Q.; WANG, J.; ZOU, M-J.; HU, R.; ZHAO, L.; QIANG, L.; RONG, J.; YOU, Q.; GUO, Q. Wogonin potentiates the antitumor effects of low dose 5-fluorouracil against gastric cancer through induction of apoptosis by down-regulation of NF-kappaB and regulation of its metabolism. *Toxicol Lett*, **197**, 201-210, 2010.