

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS E NUTRIÇÃO

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E
QUANTIFICAÇÃO DOS PRINCIPAIS CONSTITUINTES
BIOATIVOS DE ALGUMAS VARIEDADES DE FRUTAS
CÍTRICAS

Alexandra Gelsleichter Duzzioni

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Célia Maria de Sylos

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição da
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara para obtenção do título de
Doutora em Alimentos e Nutrição

Araraquara - SP
2009

Ficha Catalográfica
Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

D988a Duzzioni Alexandra Gelsleichter
Avaliação da atividade antioxidante e quantificação dos principais
constituintes bioativos de algumas variedades de frutas cítricas. / Alexandra
Gelsleichter Duzzioni. – Araraquara, 2009.
115 f.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita
Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação
em Alimentos e Nutrição.

Orientador: Célia Maria de Sylos.

1. Frutas cítricas. 2. Atividade antioxidante. 3. Constituintes bioativos. 4.
Flavanonas. I.Sylos, Célia Maria de, orient. II. Título.

CAPES: 50700006

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Célia Maria De Sylos

(Orientadora)

Profa. Dra. Nancy Preising Aptekmann

Profa. Dra. Neura Bragagnolo

Profa. Dra. Thaís Borges César

Profa. Dra. Veridiana Vera De Rosso

Araraquara, 13 de julho de 2009.

*As duas pessoas que enchem de alegria os meus dias e que
iluminam as minhas noites, meu marido Eduardo e minha
filha Maria Eduarda, que muito contribuíram para esse
resultado.*

Muito obrigada sempre. Amo vocês!!!!

A todas as forças divinas presentes nesta caminhada.

SUMÁRIO

RESUMO	9
ABSTRACT	10
INTRODUÇÃO GERAL	11
OBJETIVOS	14
CAPÍTULO 1	15
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
Radicais livres e defesa do organismo	16
Principais compostos antioxidantes presentes nas frutas cítricas.....	19
<i>Ácido ascórbico</i>	19
<i>Compostos fenólicos</i>	20
<i>Carotenóides</i>	23
Cor	25
Referências Bibliográficas	27
CAPÍTULO 2	35
RADICAL SCAVENGING ACTIVITY OF ORANGE AND TANGERINE VARIETIES CULTIVATED IN BRAZIL	35
Abstract	36
Introduction	37
Materials and methods	38
<i>Chemicals</i>	38
<i>Citrus juice samples</i>	39
<i>Physicochemical characteristics</i>	39
<i>Analysis of ascorbic acid (AA)</i>	39
<i>Determination of total phenolics</i>	39
<i>Determination of total carotenoids</i>	40
Statistical analysis	41
Results and discussion	41
<i>Physicochemical characteristics of citrus juice</i>	41
<i>Ascorbic Acid Content</i>	42

<i>Total phenolic content</i>	42
<i>Total carotenoid</i>	43
<i>Free radical scavenging activity</i>	43
Conclusion.....	45
References	45
CAPÍTULO 3	51
DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E CONSTITUINTES BIOATIVOS EM FRUTAS CÍTRICAS	51
Resumo.....	52
Introdução.....	53
Material e Métodos.....	55
<i>Amostras</i>	55
<i>Determinação de sólidos solúveis totais (SST), de acidez titulável total (ATT) e do ratio</i>	56
<i>Determinação de ácido ascórbico (AA)</i>	56
<i>Determinação de compostos fenólicos</i>	56
<i>Determinação do teor de flavonóides totais</i>	56
<i>Determinação do teor de carotenóides totais</i>	57
<i>Determinação da atividade antioxidante pelo método de DPPH*</i>	57
Análise estatística	58
Resultados e Discussão	58
<i>Sólidos solúveis totais (SST), acidez titulável total (ATT) e ratio</i>	58
<i>Ácido ascórbico, fenólicos totais, flavonóides totais e carotenóides totais</i> .	59
<i>Atividade antioxidante (EC₅₀)</i>	61
<i>Sobrenadante</i>	61
<i>Precipitado em metanol</i>	63
<i>Precipitado em acetona</i>	64
Conclusão	66
Referências	66
CAPÍTULO 4	69
ATIVIDADE ANTIOXIDANTE, VIA RADICAL LIVRE DPPH*, DOS	

EXTRATOS DE CAROTENÓIDES TOTAIS E FLAVANONAS DE ALGUMAS VARIEDADES DE LARANJAS CULTIVADAS NO BRASIL	69
Resumo.....	70
Introdução.....	71
Material e métodos.....	74
<i>Amostras</i>	74
<i>Determinação da cor</i>	74
<i>Determinação do teor de carotenóides totais</i>	75
<i>Determinação do teor das flavanonas glicosídicas (FGs)</i>	75
<i>Determinação da atividade antioxidante dos extratos de carotenóides totais e flavanonas pelo método de DPPH'</i>	76
Análise estatística.....	77
Resultados e discussão.....	77
<i>Medida da cor</i>	77
<i>Conteúdo de carotenóides totais</i>	78
<i>Conteúdo de flavanonas glicosídicas (FGs)</i>	80
<i>Atividade antioxidante dos extratos de carotenóides totais e flavanonas</i>	81
Conclusão.....	86
Referências.....	87
CAPÍTULO 5	91
QUANTIFICAÇÃO DE FLAVANONAS E DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE, VIA RADICAL LIVRE DPPH', DOS EXTRATOS DE CAROTENÓIDES TOTAIS E FLAVANONAS EM ALGUMAS VARIEDADES DE FRUTAS CÍTRICAS CULTIVADAS NO BRASIL	91
Resumo.....	92
Introdução.....	93
Material e métodos.....	96
<i>Reagentes</i>	96
<i>Amostras</i>	96
<i>Medida da cor</i>	97
<i>Determinação de carotenóides totais</i>	97

<i>Determinação das flavanonas glicosídicas (FGs)</i>	97
<i>Determinação da atividade antioxidante dos extratos de carotenóides totais e flavanonas pelo método de DPPH</i>	99
Análise estatística	99
Resultados e discussão	100
<i>Medida da cor</i>	100
<i>Conteúdo de carotenóides totais</i>	101
<i>Conteúdo de flavanona glicosídicas (FGs)</i>	102
<i>Atividade antioxidante dos extratos de carotenóides e flavanonas</i>	104
Conclusão	111
Referências	112
Conclusões Gerais	114

RESUMO

As frutas cítricas são muito consumidas e apreciadas por todo o mundo, não só devido ao seu paladar agradável como também ao seu valor nutricional. São fontes de constituintes bioativos que podem atuar como antioxidantes em defesa ao nosso organismo. Existem relatos principalmente sobre os fitoquímicos e o potencial antioxidante das laranjas, no entanto as tangerinas, que também apresentam estes constituintes e atividade antioxidante, ainda são pouco estudadas. O Brasil se destaca na produção e exportação do suco das laranjas, sendo o maior exportador mundial do suco da fruta, já a produção das tangerinas e limão tahiti vem crescendo a cada ano que passa. O ácido ascórbico, os compostos fenólicos totais e carotenóides são alguns dos componentes bioativos presentes nas frutas cítricas. Considerando a importância das frutas cítricas com relação aos seus benefícios para a saúde, os objetivos deste estudo foram analisar sete variedades de frutas cítricas quanto aos principais constituintes bioativos, a atividade antioxidante via radical livre DPPH[•] de dois diferentes extratos (sobrenadante e precipitado) do suco das frutas em três diferentes solventes (água, metanol e acetona) e a atividade antioxidante dos extratos de carotenóides totais e flavanonas isolados das frutas. A variedade limão *tahiti* apresentou o maior teor de ácido ascórbico e menor de fenólicos totais, já a variedade tangerina poncã conteve o maior teor de flavonóides totais e carotenóides totais. A atividade antioxidante foi maior no extrato aquoso do que nos extratos metanólico e cetônico. Das diferentes flavanonas analisadas (eriocitrina, naringina, neohesperidina, hesperidina e poncirina), somente a hesperidina esteve presente em todas as variedades, sendo que a variedade tangerina cravo foi a que apresentou o maior teor deste flavonóide. A atividade antioxidante de cada extrato analisado (carotenóides totais e flavanonas) contribuiu de um modo diferente para cada tipo ou variedade de fruta.

Palavras chaves: Frutas cítricas, atividade antioxidante, constituintes bioativos e flavanonas.

ABSTRACT

The citrus fruits are consumed and enjoyed by the whole world, not only because of its pleasant taste but also by its nutritional value. They are sources of bioactive constituents that can act as antioxidants to defend our body. There are reports mainly on the phytochemical and antioxidant potential of oranges; however the tangerines, which also have these constituents and antioxidant activity, are still little studied. Brazil stands out in the production and exportation of the juice of oranges, the world's largest exporter of fruit juice, since the production of tangerine and Tahiti lemon is growing each year that passes. Some bioactive components present in citrus fruits are ascorbic acid, the total phenolic compounds, and carotenoids. Taking into account the benefits of citrus fruits to the human health, the objectives of this study were to analyze the main bioactive constituents, the antioxidant activity by DPPH[•] free radical of two different extracts (supernatant and precipitate) of fruit juice in three different solvents (water, methanol and acetone), and the antioxidant activity of extracts of total carotenoids and flavanones isolated from seven varieties of citrus fruits (*pera* orange, *lima* orange, *valencia* orange, *ponkan* tangerine, *cravo* tangerine, *murcote* tangor, and *tahiti* lemon). The *tahiti* lemon presented the highest content of ascorbic acid and the lowest content of total phenolic, since the variety *ponkan* tangerine contained the highest content of total flavonoids and total carotenoids. The antioxidant activity was higher in the aqueous extract than in the methanolic and cetones extracts. Analyzed the different flavanones (eriocitrin, naringin, neohesperidin, hesperidin, and poncirin), the only one presented in all varieties was the hesperidin, so that the *cravo* tangerine presented the highest content of this flavonoid. The antioxidant activity of each extract analyzed (total carotenoids and flavanones) contributed in a different way for each variety of fruit.

Keywords: Citrus fruits, antioxidant activity, bioactive constituents and flavanones.

INTRODUÇÃO GERAL

A citricultura é um dos setores mais competitivos e de maior potencial de crescimento do agronegócio (NEVES e JANK, 2006). Destes, as tangerinas, que tem como finalidade principal o consumo *in natura*, vêm crescendo em importância no grupo dos citros, principalmente em termos de volumes. Elas já representam 23% da produção mundial e a tendência é continuar em expansão visto que sua produção aumentou 24% se comparadas as safras 2007/08 (FAS, 2008). Os maiores produtores são China, Espanha e Japão sendo a Espanha responsável por mais da metade (58% em 2007/08) de toda a exportação mundial de tangerinas (FAS, 2008). A produção de tangerina brasileira é concentrada nos estados de São Paulo, Paraná, Rio Grande do Sul e Minas Gerais que somam 84% da área total plantada no País perfazendo a 90% da produção brasileira. O Estado de São Paulo é o principal produtor, segundo o IBGE (2008), respondendo por 35% da produção nacional.

Estima-se que 70% da produção mundial de limão, outra fruta cítrica, seja referente aos limões verdadeiros (Siciliano e Eureka) e o restante as de limas ácidas (Tahiti e Galego) (AMARO *et al.*, 2003). No entanto, quase a maior parte da produção brasileira é constituída de limas ácidas da variedade Tahiti. Segundo a FAO (2008), o Brasil é o quarto produtor mundial de limões, ficando atrás apenas de México, Índia e Argentina. A Região Sudeste é a principal produtora, com aproximadamente 88% do total, sendo que o Estado de São Paulo é o principal produtor e exportador do Brasil (IBGE, 2006). Segundo o IBGE, em 2006, o Estado de São Paulo foi responsável por 80% da produção brasileira de lima ácida.

Diferente das tangerinas e dos limões, a maior parte da produção brasileira de laranja destina-se à indústria do suco, que está concentrada no Estado de São Paulo. O setor emprega diretamente cerca de 400 mil pessoas, é atividade econômica essencial de 322 municípios paulistas e 11 mineiros, gerando divisas superiores a US\$1 bilhão anuais, no centro de uma cadeia produtiva que gera PIB equivalente a US\$5 bilhões. Como os Estados Unidos se dedica a abastecer o seu mercado interno, o Brasil transformou-se no maior exportador mundial de suco de laranja, atendendo hoje cerca de 50% da demanda e 75% das transações internacionais (ABECITRUS, 2008).

Nos últimos anos, têm-se observado um aumento no consumo de frutas em virtude do potencial na prevenção de doenças cardiovasculares, câncer, diabetes, uma vez que estes alimentos são fontes diferenciadas de compostos bioativos, compostos estes que apresentam atividade antioxidante, como o ácido ascórbico, os carotenóides e os compostos fenólicos.

Existem diversos métodos para determinar a atividade antioxidante em frutas e alimentos em geral (ANTOLOVICH *et al.*, 2002; MOREIRA e MANCINI, 2003; ROBARDS *et al.*, 1999). Uma das estratégias mais aplicada nas medidas *in vitro* da capacidade antioxidante total de um composto consiste em determinar a atividade do antioxidante frente a substâncias cromógenas de natureza radical, onde a perda da cor ocorre de forma proporcional com a concentração (ARENA *et al.*, 2001; MOYER *et al.*, 2002).

O radical livre 2,2-difenyl-1-picrylhydrazil (DPPH[•]) tem sido utilizado em testes para verificar a habilidade de vários constituintes antioxidantes na captura do radical (SÁNCHEZ-MORENO *et al.*, 1998; BRAND-WILLIAMS *et al.*, 1995). O valor EC₅₀ (definido como a concentração do substrato que causa perda

de 50% da atividade antioxidante) é um parâmetro que pode ser usado para interpretação dos resultados do método DPPH• (MOLYNEUX, 2004).

OBJETIVOS

- Avaliar a atividade antioxidante (EC_{50}) pelo método do radical livre DPPH[•] em sete variedades de frutas cítricas em três diferentes solventes, água metanol e acetona;
- determinar os teores de sólidos solúveis totais, acidez titulável total e a cor das frutas;
- quantificar os principais constituintes bioativos presentes (ácido ascórbico, fenólicos totais, flavonóides totais, carotenóides totais e flavanonas);
- comparar a capacidade antioxidante de cada suco com seus principais compostos bioativos presentes e;
- avaliar a contribuição dos extratos de carotenóides totais e flavanonas na atividade antioxidante (% de inibição) via radical livre DPPH[•] nas frutas cítricas.

CAPÍTULO 1
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Radicais livres e defesa do organismo

Nas últimas décadas, foram realizadas inúmeras pesquisas para esclarecer o papel dos radicais livres em processos fisiopatológicos como envelhecimento, e pelas doenças degenerativas associadas ao envelhecimento, como câncer, aterosclerose, inflamação, doenças cardiovasculares, catarata, declínio do sistema imune e disfunções cerebrais (FERREIRA *et al.*, 1997; ATOUI *et al.*, 2005). As moléculas orgânicas e inorgânicas e os átomos que contêm um ou mais elétrons não pareados, com existência independente, podem ser classificados como radicais livres (HALLIWELL, 1995). São exemplos de radicais livres: oxigênio molecular (O_2), radical hidroxila (OH^\bullet), ânion superóxido (O_2^-), radical peroxila (ROO^\bullet), radical alcoxila (RO^\bullet) e óxido nítrico (NO^\bullet) (SJODIN *et al.*, 1990; PEREIRA, 1994; ARUOMA, 1994; YU, 1994). Destes radicais livres, o OH^\bullet e o O_2^- são os que têm maior importância biológica porque são formados durante o processo normal ou exacerbado de redução do O_2 no interior das mitocôndrias (BENZI, 1993).

Os radicais livres podem ser gerados no citoplasma, nas mitocôndrias ou na membrana e o seu alvo celular (proteínas, lipídeos, carboidratos e DNA) está relacionado com o seu sítio de formação (ANDERSON, 1996; YU e ANDERSON, 1997). A formação de radicais livres *in vivo* ocorre via ação catalítica de enzimas, durante os processos de transferência de elétrons que ocorrem no metabolismo celular e pela exposição à fatores exógenos (ozônio, radiações gama e ultravioleta, medicamentos, dieta, cigarro, álcool, estilo de vida). Contudo, na condição de pró-oxidante a concentração desses radicais pode aumentar devido à maior geração intracelular ou pela deficiência dos mecanismos

antioxidantes (CERUTTI, 1991, 1994; VALKO *et al.*, 2004; EL-AGAMEY *et al.*, 2004; OMONI *et al.*, 2005).

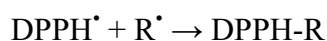
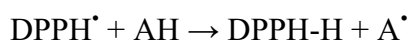
Atualmente, existe um grande interesse no estudo dos antioxidantes devido, principalmente, às descobertas sobre os efeitos dos radicais livres no organismo (VISIOLI *et al.*, 2000), pois estes são controlados nos seres vivos por diversos compostos antioxidantes como o ácido ascórbico, os polifenóis, o selênio e os carotenóides (VALKO *et al.*, 2004; EL-AGAMEY *et al.*, 2004; OMONI *et al.*, 2005)

O termo antioxidante pode ser definido como uma substância sintética ou natural adicionada a produtos para prevenir ou retardar a deterioração produzida pela ação do oxigênio do ar (HALLIWELL, 1995). Os antioxidantes estão presentes de forma natural ou intencional nas gorduras e alimentos para retardar o aparecimento dos fenômenos de oxidação, mantendo intactas suas características sensoriais. Os antioxidantes que se adicionam aos alimentos não devem causar efeitos fisiológicos negativos, produzir cores, odores e nem sabores anômalos. Devem ser lipossolúveis, resistentes aos tratamentos a que seja submetido o alimento, ativos em baixas temperaturas e econômicos (ORDÓÑEZ *et al.*, 2005).

Os alimentos contêm compostos oxidantes, os quais podem ocorrer naturalmente ou ser introduzidos durante o processamento para o consumo (WATERS *et al.*, 1996). Por outro lado, os alimentos, principalmente as frutas, verduras e legumes, também contêm agentes antioxidantes, tais como as vitaminas C, E e A, a clorofila, os flavonóides, os carotenóides, a curcumina e outros que são capazes de restringir a propagação das reações em cadeia e as lesões induzidas pelos radicais livres (STAVRIC, 1994; FOTSIS *et al.*, 1997; POOL-ZOBEL *et al.*, 1997).

Os testes para medir a atividade anti-radical livre em alimentos e sistemas biológicos podem ser divididos em dois grupos: métodos diretos, que avaliam a peroxidação lipídica no qual sob condições padronizadas usa-se um substrato (lipídico, lipoproteína) e mede-se o grau de inibição da oxidação, sendo que os mais utilizados são: TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico) e dienos conjugados (ROGINSKY e LISSI, 2005), e aqueles indiretos que medem a habilidade de aprisionar (scavenger) radicais livres e podem ser empregados na avaliação da capacidade anti-radical livre de compostos puros e de extratos complexos. Devido à estabilidade, facilidade de manipulação e simplicidade de procedimento, os radicais mais utilizados são derivados do 1,1-difenil-2-picrilidrazil (DPPH[•]) e do ácido 2,2-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina)-6-sulfônico (ABTS) (ROGINSKY e LISSI, 2005).

Quando utilizado o radical DPPH[•], a atividade antioxidante de um composto ou extrato pode ser estimada após sua adição em solução metanólica do radical. A redução do DPPH[•] é acompanhada pelo monitoramento do decréscimo da absorvância a um determinado comprimento de onda. O DPPH[•] absorve a 515 nm, mas quando reduzido por um antioxidante (AH) ou por radicais livres (R[•]), a absorvância diminui (BRAND-WILLIANS *et al.*, 1995).



Os resultados podem ser expressos em % de redução da absorvância da mistura (DPPH[•]+antioxidante) em relação a absorvância inicial do radical DPPH[•] ou ainda como a quantidade de antioxidante necessária para diminuir em 50% a concentração inicial de DPPH[•] (EC₅₀ ou IC₅₀) em um tempo de reação fixo (CHOI *et al.*, 2002) ou até formação de um patamar (BRAND-WILLIANS *et al.*, 1995).

Principais compostos antioxidantes presentes nas frutas cítricas

As frutas cítricas são conhecidas como fontes de constituintes antioxidantes (SANCHES-MORENO *et al.*, 2003), que apresentam várias ações benéficas ao ser humano, como por exemplo a atividade antioxidante. Dentre esses compostos bioativos, destacam-se o ácido ascórbico, os compostos fenólicos e os carotenóides (JOHNSTON *et al.*, 2002; PUPIN *et al.*, 1999).

Ácido ascórbico

O ácido ascórbico é o nome comum dado ao ácido 2,3-enediol-*L*-gulônico, é um sólido branco, cristalino, muito solúvel em água. No estado sólido, é relativamente estável. No entanto, quando em solução, é facilmente oxidado reversivelmente a ácido dehidroascórbico que, por sua vez, pode ser oxidado irreversivelmente ao 2,3 ácido dicetogulônico com perda da atividade (RIBEIRO e SERAVALLI, 2004).

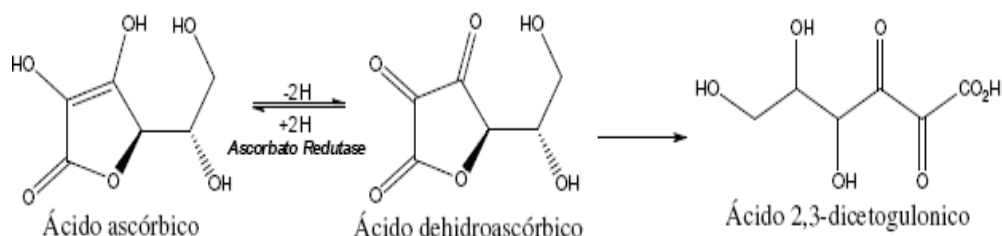


Figura 1: Mecanismo de conversão do ácido ascórbico em ácido 2,3-dicetogulônico.

O ácido ascórbico ou vitamina C é comumente encontrado em nosso organismo na forma de ascorbato. O ascorbato desempenha papéis metabólicos fundamentais no organismo humano, atuando como agente redutor, reduzindo metais de transição (em particular Fe^{3+} e Cu^{2+}) presentes nos sítios ativos das enzimas ou nas formas livres no organismo (HALLIWELL, 1999; LEVINE *et al.*,

1998; PODMORE, *et al.*, 1998). Por ser um bom agente redutor o ascorbato pode ser oxidado pela maioria das espécies reativas de oxigênio (ERO) e espécies reativas de nitrogênio (ERN) que chegam ou são formadas nos compartimentos aquosos dos tecidos orgânicos (BABIOR, 1997; HALLIWELL, 1999; LEVINE *et al.*, 1998; PODMORE, *et al.*, 1998).

O ascorbato possui também propriedades pró-oxidantes, pois os íons Fe^{2+} e Cu^{1+} reagem com o peróxido de hidrogênio gerando o radical hidroxila. Indiretamente, o ascorbato pode induzir as reações de radicais livres. Porém, em função do ferro encontrar-se, na maior parte do tempo, ligado a proteínas de transporte ou armazenamento, em situação normal, as propriedades antioxidantes do ascorbato suplantam suas propriedades pró-oxidantes HALLIWELL, 1999; LEVINE *et al.*, 1998; PODMORE, *et al.*, 1998).

A concentração de ácido ascórbico nas frutas cítricas varia de acordo com o tipo de cultivar, estágio de maturação, condições de cultivo entre outras. Os principais fatores que podem afetar a degradação do ácido ascórbico em sucos de fruta incluem o tipo de processamento, condições de estocagem, tipo de embalagem, pH, presença de oxigênio, luz, catalisadores metálicos e enzimas. Alguns autores também relatam a influência da concentração de sais e de açúcar, concentração inicial de ácido ascórbico e carga microbiana (LEE e CHEN, 1998; LEE e COATES, 1999). A estabilidade do ácido ascórbico aumenta em baixas temperaturas e a sua perda ocorre com facilidade durante o aquecimento dos alimentos (BOBBIO e BOBBIO, 1992; DOSUNMU e JOHNSON, 1995).

Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos são uma das maiores classes de metabólitos secundários de plantas. Quimicamente podem ser definidos como substâncias que

possuem um anel aromático contendo um ou mais grupos hidroxila. Os compostos fenólicos existentes nos alimentos abrangem ácidos fenólicos, cumarinas, flavonóides e taninos (DUBICK e OMAYE, 2001).

Os flavonóides constituem o mais importante grupo de compostos fenólicos e podem ser divididos nos seguintes subgrupos: antocianinas (cianidina, delphinidina), flavanas (catequina, epicatequina, luteoforol, procianidina, theaflavina), flavanonas (hesperidina, naringenina), flavonas (apigenina, luteolina, diomestina, tangeritina, nobiletina, tricetina), flavonóis (quercetina, rutina, miricetina) e isoflavonóides (daidzeína, genisteína) (LOPES *et al.*, 2000).

A estrutura dos flavonóides, como mostra a figura 2, consiste de um esqueleto de difenil propano (C₆-C₃-C₆) com dois anéis benzênicos (A e B) ligado a um anel pirano (C) (BEHLING *et al.*, 2004).

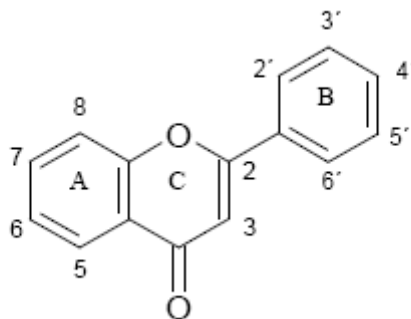


Figura 2 - Estrutura básica dos flavonóides.

Três tipos de flavonóides ocorrem com frequência em frutas cítricas: flavanonas, flavonas e flavonóis (BENAVENTE-GARCIA *et al.*, 1997). As flavanonas existem como mono ou diglicosídeos e contribuem para o sabor dos cítricos. São exemplos de flavanonas: a hesperidina, a narirutina, a naringina, e a neohesperidina (SIVAM, 2002).

As laranjas contêm as flavanonas agliconas hesperitina e naringina, mas raramente ocorrem como agliconas livres no próprio fruto. As flavanonas glicosídicas dominantes nas laranjas doces (*C. sinensis*) são a hesperidina e a narirutina, enquanto que nas laranjas azedas (*C. aurantium*) as duas flavanonas glicosídicas predominantes são a neohesperidina e naringina. A principal diferença entre as flavanonas glicosídicas de laranjas doces e de laranjas azedas está em suas moléculas de açúcar, que influenciam o gosto. O açúcar rutinose (6-O- α -D-rhamnosyl- β -D-glucose) causa nas flavanonas hesperidina e narirutina um sabor neutro e é relativamente elevada em laranjas doces, tangerinas, e tangor. Enquanto que o açúcar neohesperidose (2-O- α -L-rhamnosyl- β -D-glicose) é elevado em tangelos e laranjas azedas e transmite um sabor amargo ou picante às flavanonas glicosídicas neohesperidina e naringina (PETERSON *et al.*, 2006).

Os compostos fenólicos são efetivos doadores de hidrogênio e seu potencial antioxidante está correlacionado com o número e a posição dos grupos hidroxílicos e conjugações assim como com a presença de elétrons doadores no anel B devido à capacidade que esse anel aromático possui de suportar o desapareamento de elétrons deslocalizados do sistema de elétrons π (RAMIREZ-TORTOZA *et al.*, 2001).

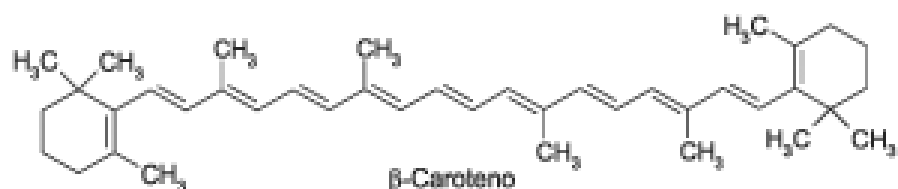
A atividade antioxidante dos flavonóides depende da sua estrutura e pode ser determinada por cinco fatores: reatividade como agente doador de H e elétrons, estabilidade do radical flavanoil formado, reatividade frente a outros antioxidantes, capacidade de quelar metais de transição e solubilidade e interação com as membranas (BARREIROS *et al.*, 2006). A atividade de seqüestro está diretamente ligada ao potencial de oxidação dos flavonóides e das espécies a serem seqüestradas. Quanto menor o potencial de oxidação do flavonóide, maior é

sua atividade como seqüestrador de radicais livres. Flavonóides com potencial de oxidação menor que o do Fe^{+3} e Cu^{+2} e seus complexos podem reduzir esses metais, sendo potencialmente prooxidantes (RICE-EVANS, 1997). Quanto maior o número de hidroxilas, maior a atividade como agente doador de H e de elétrons (CAO *et al.*, 1997).

Carotenóides

Os carotenóides são substâncias coloridas amplamente distribuídas na natureza, principalmente nos cloroplastos das plantas, sempre acompanhando as clorofilas. A mudança de cor durante o amadurecimento dos frutos ou envelhecimento dos vegetais é causada pelo desaparecimento das clorofilas, que, quando presentes, mascaram as cores de outros pigmentos (BELITZ e GROSH, 1997).

Até o momento mais de 600 carotenóides já foram encontrados na natureza (MERCADANTE e EGELAND, 2004). Podem ser obtidos facilmente por extração a frio com solventes orgânicos. Têm cor intensa, que varia do amarelo ao vermelho e se dividem em: carotenos, carotenóides constituídos por carbono e hidrogênio, e xantofilas, derivados do caroteno que possuem um ou mais átomo de oxigênio (FRANCKI *et al.*, 2005) (Figura 3).



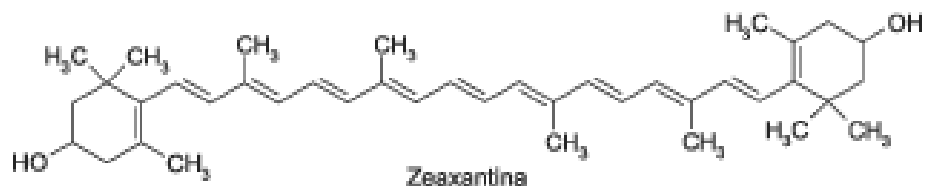


Figura 3-Exemplo de estrutura química de um caroteno (β -caroteno) e de uma xantofila (zeaxantina).

Estes pigmentos têm mostrado outras ações no sistema fisiológico e estão associados com a proteção de doenças crônicas (OLSON, 1999), na prevenção e proteção contra uma série de doenças humanas como o câncer, doenças cardiovasculares, degeneração macular, catarata e infecções pelo vírus HIV (WILBERG E RODRIGUEZ-AMAYA, 1995; OLSON, 1999; OLIVER E PALOU, 2000).

Os carotenóides com mais de sete ligações duplas conjugadas são capazes de aprisionar ou desativar (quencher) o oxigênio singlete (1O_2), sendo que esta atividade aumenta com o aumento do sistema de ligações duplas conjugadas (DI MASCIO *et al.* 1989). Os carotenóides podem desativar o oxigênio singlete de duas maneiras, reagindo com ele e formando produtos de oxidação (processo químico) ou dissipando a energia adquirida do oxigênio singlete na forma de calor (processo físico) e, desta forma, voltam ao estado fundamental. Esta segunda maneira é a que ocorre preferencialmente (STRATTON *et al.*, 1993).

Outro aspecto da atividade dos carotenóides diz respeito à polaridade. Aqueles que possuem grupos polares nos anéis são efetivos na prevenção da oxidação das membranas. Essa polaridade os localiza de maneira tal que estão em contato mais próximo com a fase aquosa, reagindo com os radicais que penetram

a membrana. Os apolares, tais como o licopeno e o β -caroteno são mais regeneradores que preventivos, combatendo os radicais formados com mais eficiência no interior da membrana (WOODALL *et al.*, 1997).

Os carotenóides presentes em citros formam uma mistura complexa de mais de 115 substâncias naturais, mas nem todas essas substâncias são precursores da vitamina A (KLAUI e BAUERNFEIND, 1981). O suco de laranja é a mais importante fonte alimentar de vitamina A, carotenóides (β -caroteno, α -caroteno e β -criptoxantina) e antioxidantes carotenóides (β -caroteno, β -criptoxantina, luteína e zeaxantina), devido ao seu conteúdo e ao seu elevado consumo (GIOVANNUCCI, 1999; KRITCHEVSKY, 1999; TIBBLE, 1999; SLATERRY *et al.*, 2000; TEMPLE, 2000).

Cor

Estudos têm demonstrado que não só o valor nutricional é importante para a determinação da qualidade dos alimentos, mas também a cor é muito importante por causa dos estímulos visuais. O sentido da visão é a primeira a ser utilizado na escolha de itens alimentares e por isso é um fator decisivo para a escolha de um produto (LIMA *et al.*, 2005). Cor mental é uma resposta ao estímulo que produz uma radiação visível sobre a retina, que é transmitida ao cérebro através do nervo óptico. (MELÉNDEZ-MARTINEZ *et al.*, 2005).

Com o intuito de obter a caracterização objetiva da cor, a CIE (Commission Internationale de l'Éclairage), em 1976, estabeleceu o sistema CIELAB ($L^*a^*b^*$), em que uma particular cor tem uma única localização, especificada numericamente em um espaço tridimensional esférico, definido por três eixos perpendiculares (Figura 4): o eixo L^* (luminosidade) varia do preto (0)

ao branco (100); o eixo a^* , do verde ($-a$) ao vermelho ($+a$) e o eixo b^* , do azul ($-b$) ao amarelo ($+b$) (MCGUIRE, 1992) .

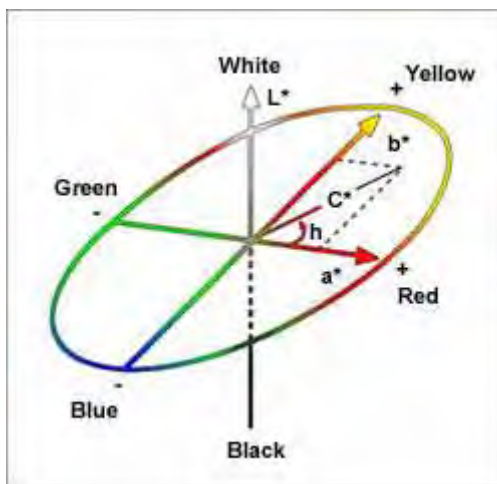


Figura 4: Parâmetros do sistema de cor CIELAB.

Fonte: <http://www.athloneextrusions.ie/athlone/colours/colour.php>

A colorimetria tem sido utilizada para caracterizar a cor de diferentes pigmentos, a exemplo das antocianinas (MONTES *et al.*, 2005), clorofila (SINNECKER *et al.*, 2002) e carotenóides (MELÉNDEZ-MARTÍNEZ *et al.*, 2003), bem como para avaliar a cor de alimentos.

A cor dos sucos cítricos é devido principalmente à presença dos pigmentos carotenóides. Eles fornecem a cor amarela, laranja e vermelho de muitos alimentos (MELÉNDEZ-MARTÍNEZ *et al.*, 2005). Citros, em geral, são excelentes fontes de carotenóides, com uma larga variedade destes pigmentos (GROSS, 1987).

Referências Bibliográficas

- ABECITRUS – Associação Brasileira dos Exportadores de Cítricos. Disponível em http://www.abecitrus.com.br/industria_br.html, acessado em outubro de 2008.
- AMARO, A. A.; CASER D. V.; DE NEGRI, J.D. Tendências na produção e comércio de limão. *Informações Econômicas*, São Paulo, v. 33, n. 4, p. 37-47, abr. 2003.
- ANDERSON, D. Antioxidant defences against reactive oxygen species causing genetic and other damage. *Mutat. Res.*, Amsterdam, v.350, n.1, p.103-108, 1996.
- ANTOLOLOVICH, M.; PRENZLER, P. D.; PATSALIDES, E.; MCDONONALD, S.; ROBARDS, K. Methods for testing antioxidant activity. *Analyst.*, v. 127, p.183-198, 2002.
- AOAC International 1995. Official methods of analysis of AOAC International (vol. II). Gaithersburg: AOAC International.
- ARENA, E.; FALLICO, B.; MACCARONE, E. Evaluation of antioxidant capacity of blood orange juices as influenced by constituents, concentration process and storage. *Food Chem.*, v. 74, p.423-427, 2001.
- ARUOMA, O.I. Free radicals and antioxidant strategies in sports. *J. Nutr. Biochem.*, v. 5, p. 370-381, 1994.
- ATOUI, A. K.; MANSOURI, A.; BOSKOU, G.; KEFALAS, P.; Tea and herbal infusions: Their antioxidant activity and phenolic profile. *Food Chem.*, v. 89, n. 1, p. 27-36, 2005.
- AULENBACH, B. B.; WORHINGTON, J. T. Sensory evaluation of muskmelon: is soluble solids content a good quality index? *Hort Science.*, v. 9, p. 136-137, 1974.
- BABIOR, B. M. Superoxide: a two-edged sword. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, n. 30, p.141-155, 1997.
- BEHLING, E.; SENDÃO, M.; FRANCESCATO, H.; ANTUNES, L.; BIANCHI, M. Flavonóide quercetina: Aspectos gerais e ações biológicas. *Alim. Nutr.* Araraquara - ISSN: 0103-4235 América do Norte, v. 15, n. 3, p. 285-292, 2004.
- BELITZ, H. D.; GROSH, W. Química de los alimentos. 2ª Ed. Zaragoza: Acribia, 1979.

- BENAVENTI-GARCIA, O.; CASTILLO, J.; MARIN, F. R.; ORTUÑO, A.; DEL RÍO, J. A. Uses and properties of *citrus* flavonoids. **J. Agric. Food Chem.**, v. 45, n. 12, p. 4505-4515, 1997.
- BENZI, G. Aerobic performance and oxygen free-radicals. **J. Sports Med. Physical Fitness.**, v.33, p. 205-222, 1993.
- BOBBIO, F.; BOBBIO P. Introdução a Química de Alimentos. 2. ed. São Paulo: Livrarias Varela, 1992.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensm. Wiss. Technol.**, v. 22, p. 25-30, 1995.
- CAO, G.; SOFIC, E.; PRIOR, R. L. Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. **Free Radical Biol. Med.**, v. 22, p. 749-760, 1997.
- CERUTTI, P. A. Oxidant stress and carcinogenesis. **Eur. J. Clin. Invest.**, Oxford, v.21, n.1, p.1-5, 1991.
- CERUTTI, P.A. Oxy-radicals and cancer. **Lancet**, v.344, p.862-863, 1994.
- CHOI, C.; KIM, S. K.; HWANG, S. S.; CHOI, B. K.; AHN, H. J.; LEE, M. Y.; PARK, S. H.; KIM, S. K. Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparison. **Plant Sci.**, v. 163: p.1161-1168, 2002.
- CLYDESDALE, F. M. Color measurement. In: GRUENWEDEL, D. W; WHITAKER, J. P. **Food Analysis: Principles and Techniques.** v. 1, New York: Marcel Dekker Inc., p. 95-150, 1984.
- DI MASCIO, P.; KAISER, S.; SIES, H. Lycopene as the most efficient biological carotenoid singlet oxygen quencher. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 274, p. 532-538, 1989.
- DOSUNMU, M. I.; JOHNSON, E. C. Chemical evaluation of the nutritive value and changes in ascorbic acid content during storage of the fruit of bitter kola (*Garcinia kola*). **Food Chem.**, v.54, p.67-71, 1995.
- DUBICK, M. A.; OMAYE, S. T. Modification of atherogenesis and heart disease by grape wine and tea polyphenols. In: Wildman, R. E.C. (org). Handbook of Nutraceutical and Functional Food. Boca Raton: CRC Press, v. 14, p. 143-153, 2001.

- EL-AGAMEY, A.; LOWE, G. M.; MCGARVEY, D. J.; MORTENSEN, A.; PHILLIP, D. M.; TRUSCOTT, T. M.; YOUNG, A. J.; ARCH. Carotenoid radical chemistry and antioxidant/pro-oxidant properties. **Biochem. Biophys.**, v. 430, p. 37-48, 2004.
- FERREIRA, A. L. A; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Rev. Ass. Med. Brasil.** v. 43, p. 61-8, 1997
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION - FAO - FAOSTAT. Disponível em: <http://www.fao.org>. Acessado em: 11 abr. 2008.
- FOTSIS, T. *et al.* Flavonoids, dietary-derived inhibitors of cell proliferation and *in vitro* angiogenesis. **Cancer Res.**, Baltimore, v.57, n.14, p.2916-2921, 1997.
- FRANCKI, V. M.; GOLLUCKE, A. P. B.; PIMENTEL, C. V. B. Alimentos funcionais: introdução às principais substâncias bioativas em alimentos. Ed.Varela, 2005.
- GIOVANNUCCI, E. Tomatoes, tomato-based products, lycopene and cancer: a review of the epidemiological literature. **J. Nat. Cancer Instit.**, v. 91, p. 317–331, 1999.
- GROSS, J. Pigments in fruits. London: Academic Press, 1987.
- HALLIWELL, B. Vitamin C: poison, prophylactic or panacea? **Trends Biochem. Sci.**, v. 24, n. 7, p. 255-259, 1999.
- HALLIWELL, B.; AESCHBACH, R.; LOLIGER, J.; AROUMA, O. I. The Characterization of Antioxidants. **Food Chem.Toxicol.**, v. 33, n. 7, p. 601-617, 1995.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. Produção Agrícola Municipal. Rio de Janeiro: 2001-2006. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br>. Acessado em: 10 mar. 2008.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE) – PRODUÇÃO AGRÍCOLA MUNICIPAL. RJ: IBGE, 2006. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br>. Acessado em 10. jun. 2008.
- JOHNSTON, C. S., & BOWLING, D. L. J. Stability of ascorbic acid in commercially available orange juices. **J. Am. Diet. Assoc.**, v. 102, p. 525-529, 2002.

- KLAUI, H.; BAUERNFEIND, J. C. Carotenoids as colorants and vitamin A precursors. In: Bauernfeind, J.C. (Ed.). Academic Press, New York, 1981, p. 47 (Chapter 2).
- KRITCHEVSKY, S. B. b-Carotene, carotenoids and the prevention of coronary heart disease. **J. Nutr.**, v. 129, p. 5–8, 1999.
- LEE, H. S.; CHEN, C. S. Rates of vitamin C loss and discoloration in clear orange juice concentrate during storage at temperature of 4-24°C. **J. Agric. Food Chem.**, v. 46, p. 4723-4727, 1998.
- LEE, H. S.; COATES, G. A. Vitamin C in frozen, fresh squeezed, unpasteurized, polyethylene-bottled, orange juice: a storage study. **Food Chem.**, v. 65, p. 165-168, 1999.
- LEVINE, M.; DARUWALA, R. C.; PARK, J. B.; RUMSEY, S. C.; WANG, Y. Does vitamin C have a pro-oxidant effect? **Nature**, n. 395, p. 231, 1998.
- LIMA, V. L. A. G.; MÉLO, E. A.; MACIEL, M. I. S.; PRAZERES, F. G.; MUSSER, R. S.; LIMA, D. E. S. Total phenolic and carotenoid contents in acerola genotypes harvested at three ripening stages. **Food Chem.**, v.90, p.565-568, 2005.
- LOPES, R. M. et al., Flavonóides. R. Biotecnologia, Ciencia & Desenvolvimento. São Paulo, 17, 18-22, nov/dez 2000.
- MCGUIRE, R. G. Reporting of objective color measurements. **Hort Science**, v. 27, n. 12, p. 1254-1555, 1992.
- MELÉNDEZ-MARTÍNEZ, A. J., VICARIO, I. M., HEREDIA, F. J. Instrumental measurement of Orange juice colour: a review. **J. Sci. Food Agric.**, v. 85, p. 894-901, 2005.
- MELÉNDEZ-MARTÍNEZ, A. J.; VICARIO, I. M.; HEREDIA, F. J. Application of tristimulus colorimetry to estimate the carotenoids content in ultrafrozen orange juices. **J. Agric. Food Chem.**, v. 51, n. 25, p. 7266-7270, 2003.
- MERCADANTE, A. Z.; ENGELAND, E. S. Carotenoids Handook, 1 st.; Britton, G.; Liaaen-Jensen, S.; Pfander, H., Eds.; Birkhauser: Basel, Switzerland, 2004.
- MOLYNEUX P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. **J. Sci. Technol.**, v. 26, n. 2, p. 211-219, 2004.

- MONTES, C.; VICARIO, I. M.; RAYMUNDO, M.; FEET, R.; HEREDIA, F. J. Application of tristimulus colorimetry to optimize the extraction of anthocyanins from jaboticaba (*Myrcia jaboticaba* Berg). **Food Res. Int.**, v. 38, n. 8-9, p. 983-988, 2005.
- MOREIRA, A. V. B.; MANCINI-FILHO, J. Atividade antioxidante das especiarias mostarda, canela e erva doce em sistemas aquoso e lipídico. **Nutrire**, v. 24, 2003.
- MOYER, R. A.; HUMMER, K. E.; FINN, C. E.; FREI, B.; WROLSTAD, R. E. Anthocyanins, phenolics, and antioxidant capacity in diverse small fruits: *Vaccinium*, *Rubus*, and *Ribes*. *J. Agric. Food Chem.*, v. 50, p. 519-525, 2002.
- NATIONAL AGRICULTURAL SERVICE - NASS. Agricultural Statistics Board/ U.S. Department of Agriculture. Crop Production. Disponível em: <http://www.fas.usda.gov/psdonline/psdHome.aspx>. Acessado em: 10 jun. 2008.
- OLIVEIRA, A. P. V. Caracterização sensorial de sobremesas lácteas de chocolate empregando Perfil Livre e Mapa de Preferência Interno e medidas de cor e textura. 2002. Dissertação (Mestre em Ciência de Alimentos) – Departamento de Tecnologia de Alimentos e Medicamentos, Universidade Estadual de Londrina, Londrina.
- OLIVEIRA, A. P. V.; FRASSON, K.; YAMASHITA, F. & BENASSI, M. T. Medida Instrumental de cor em sobremesas lácteas de chocolate: uma técnica de baixo custo e versátil utilizando câmara digital. **Braz. J. Food Technol.**, v.6, n. 2, p. 191-196, 2003.
- OLIVER, J.; PALOU, A. Chromatographic determination of carotenoids in foods. **J. Chromatogr. A**, v. 881, n.1-2, p. 543-555, 2000.
- OLSON, J. A. Carotenoids and human health. **Arch. Latinoam. Nutr.**, Guatemala, v.49, p.7-11, 1999.
- OMONI, A. O.; ALUKO, R. E. The anti-carcinogenic and anti-atherogenic effects of lycopene: a review. **Trends Food Sci. Technol.**, v. 16, n. 8, p. 344-350, 2005.
- ORDÓÑEZ, J. A. *et al.* Tecnologia de alimentos: componentes dos alimentos e processos. Porto Alegre: Artmed, p.33-49, 2005.
- PEREIRA, B. Exercício físico como pró-oxidante. **Rev. Paul.**, Ed. Fís. v.8, p. 77-89, 1994.

- PETERSON, J. J.; DWYER, J. T.; BEECHER, G. R.; BHAGWAT, S. A.; GEBHARDT, S. E.; HAYTOWITZ, D. B.; HOLDEN, J. M. Flavanones in oranges, tangerines (mandarins), tangors, and tangelos: a compilation and review of the data from the analytical literature. **J. Food Compos. Anal.**, v.19, p. S66–S73, 2006
- PINHEIRO, R. V. R.; MARTELETO, L. O.; SOUZA, A. C. G. de; CASALI, W. W. D.; CONDÉ, A. R. Produtividade e qualidade dos frutos de dez variedades de goiaba, em Visconde do Rio Branco, Minas Gerais, visando ao consumo ao natural e à indústria-lizeira. **Revista Ceres**, Viçosa, v.31, p. 360-387, 1984.
- PODMORE, I. D.; GRIFFITHS, H. R.; HERBERT, K. E.; MISTRY, N.; MISTRY, P.; LUNEC, J. Vitamin C exhibits pro-oxidant properties. **Nature**, n. 392, p.559, 1998.
- POOL-ZOBEL, B. L.; BUB, A.; MÜLLER, H.; WOLLOWSKI, I.; RECHKEMMER, G. Consumption of vegetables reduces genetic damage in humans: first results of a human intervention trial with carotenoid-rich foods. **Carcinogenesis**, New York, v.18, n.9, p.1847-1850, 1997.
- PUPIN, A. M., DENNIS, M. J., & TOLEDO, M. C. F. Analysis of carotenoids in orange juice. **Food Chem.**, v. 64, p. 269-275, 1999.
- RAMIREZ-TORTOZA, C.; ANDERESSEN, O.M.; GARDNER, P. T.; MORRICE, P. C.; WOOD, S. G.; DUTHIE, S. J.; COLLINS, A. R.. Anthocyanin-rich extract decreases indices of lipid peroxidation and DNA damage in vitamin E depleted rats. **Free Radical Biol. Med.**, v. 46, p. 1033-1037, 2001.
- RIBEIRO, E. A.; SERAVALLI, E. A. G. Química de Alimentos. São Paulo: Edgard Blücher Ltda, p.179-181, 2004.
- RICE-EVANS, C. A; MILLER, N. J; PAGANGA, G. Antioxidant properties of phenolic compounds. **Trends Plant Sci.**, v. 2, p. 152-159, 1997.
- ROBARDS, K.; KPENZLER, P. D.; TUCKER, G.; SWATSITANG, P.; GLOVER, W. Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. **Food Chem.**, v. 66, p. 401-436, 1999.
- RODRIGUEZ-AMAYA D B. 1999. A guide for carotenoid analysis in foods. Washington, DC: International Life Sciences Institute Press, 59.

- ROGINSKY, V.; LISSI, E. A. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. **Food Chem.**, v. 92, n. 2, p. 235-254, 2005.
- SÁNCHEZ-MORENO, C., LARRAURI, J. A., & SAURA-CALIXTO, F. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. **J. Sci. Food Agric.**, v. 76, p. 270-276, 1998.
- SÁNCHEZ-MORENO, C; PLAZA, L; ANCOS, B; CANO, M. P. Quantitative bioactive compounds assessment and their relative contribution to the antioxidant capacity of commercial orange juices. **J. Sci. Food Agric.**, v. 83, p. 430-439, 2003.
- SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolibdic-phosphotungstic acid reagents. *Amer. J. Enol. Viticult.*, v. 16, p. 144-158, 1965.
- SINNECKER, P.; GOMES, M. S. O.; ARÊAS, J. A. G.; LANFER-MARQUEZ, U. M. Relationship between color (instrumental and visual) and chlorophyll contents in soybean seeds during ripening. **J. Agric. Food Chem.**, v. 50, n. 14, p. 3961-966, 2002.
- SIVAM, G. Analysis of flavonoids. *Methods of analysis for functional foods and nutraceuticals*. Ed. W. J. Hurst, cap.9, p.350, 2002.
- SJODIN, B.; WESTING, Y. H.; APLE, F. S. Biochemical mechanisms for oxygen free radical formation during exercise. **Sports Med.** v. 10, p.236-254, 1990.
- SLATERRY, M. L.; BENSON, J.; CURTIN, K.; KHE-NI-MA, SCHAEFFER, D.; POTTER, J. D. Carotenoids and vitamin A. **Am. J. Clin. Nutr.**, v.71, p.575–582, 2000.
- STAVRIC, B. Antimutagens and anticarcinogens in foods. **Food Chem. Toxicol.**, Oxford, v.32, n.1, p.79-90, 1994.
- STRATTON, S. P.; SCHAEFER, W. H.; LIEBLER, D. C. Isolation and identification of singlet oxygen oxidation products of β -carotene. **Chem. Res. Toxicol.**, v.6, p. 542-547, 1993.
- TEMPLE, N. J. Antioxidants and disease: more questions than answers. **Nutr. Res.**, v. 20 n. 3, p. 449–459, 2000.
- TIBBLE, D. L. Further evidence of the cardiovascular benefits of diet enriched in carotenoids. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 68, p. 521–522, 1999.

- VALKO, M.; IZAKOVIC, M.; MAZUR, M.; RHODES, C. J.; TELSER, J. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. **Mol. Cell. Biochem.**, v. 266, n. 1-2, p. 37-56, 2004.
- VISIOLI, F.; KEANEY JR., J. F.; HALLIWELL, B. Antioxidants and cardiovascular disease; panaceas or tonics for tired sheep? **Cardiovasc. Res.**, v. 47, p. 409-415, 2000.
- WATADA, A. E.; ABE, K.; YAMAUCHI, N. Physiological activities of partially processed fruits and vegetables. **Food Technol.**, XX, 116, 118, 120-122, 1990.
- WATERS, M. D.; STACK, H. F.; JACKSON, M. A.; BROCKMAN, H. E.; DE FLORA, S. Activity profiles of antimutagens: *in vitro* and *in vivo* data. **Mutat. Res.**, Amsterdam, v.350, n.1, p.109-129, 1996.
- WILBERG, V. C.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. HPLC quantification of major carotenoids of fresh and processed guava, mango and papaya. **Lebensm. Wiss. U. Technol.**, v.28, n.5, p.474-480, 1995.
- WOODALL, A. A.; LEE, S. W. M.; WEESIE, R. J.; JACKSON, M. J.; BRITTON, G. Oxidation of carotenoids by free radicals: relationship between structure and reactivity **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1336, 33-42, 1997
- YU, B. P. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. **Physiol. Rev.**, v. 74, p.:139-161, 1994.
- YU, D.; DAHEGREN, R. A. Evaluation of methods for measuring polyphenol in conifer foliage. **J. Chem. Ecology**, v.26, p.2119-2140, 2000.
- YU, T-W., ANDERSON, D. Reactive oxygen species-- induced DNA damage and its modification: a chemical investigation. **Mutat. Res.**, Amsterdam, v.379, n.2, p.201-210, 1997.

CAPÍTULO 2

RADICAL SCAVENGING ACTIVITY

OF ORANGE AND TANGERINE

VARIETIES CULTIVATED IN BRAZIL

Aceito para publicação na Revista **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, 2009.

(DOI: 10.1080/09637480902769575)

Abstract

Four citrus fruit varieties cultivated in Brazil (two kinds of sweet orange and two kinds of tangerine) were analyzed for physicochemical characteristics contents of total phenolics, total carotenoids and ascorbic acid, and antioxidant activities. The antioxidant activities of aqueous, methanolic, and acetone extracts of the citrus fruit juices were assessed on the basis of their to scavenge 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH[•]). The *cravo* tangerine has the highest content of citric acid, while the *pera* orange is richest in ascorbic acid. The *lima* orange has the highest total phenolic contents, and the *ponkan* the highest total carotenoids. The antioxidant activities, expressed as the concentration of antioxidant able to scavenge 50% of the initial DPPH[•] (EC₅₀), ranged from 139.1±27.3 to 182.2±28.8 g extract/L for juice of orange varieties and 186.3±29.6g/L to 275.5±3.3g extract/L for juice of tangerine citrus varieties. In methanolic extracts the EC₅₀ ranged from 192.5±43.1 to 267.4±41.4g extract/L for orange varieties and 225.2±69.8 to 336.3±27.2g extract/L for tangerine varieties. For EC₅₀ values of acetone fractions, there were no statistically significant differences between the different varieties. For every citrus fruit in this study, the radical scavenging capacity was higher in the aqueous (AQ) than in the methanolic (MeOH) or acetone fractions (Ac).

Keywords: Citrus fruit, Antioxidant components, Radical-scavenging capacity, DPPH[•]

Introduction

The production of oranges and tangerines has expanded rapidly, enabling higher levels of total as well as per capita consumption of citrus fruits. Even faster growth has occurred in processed citrus products, as improvements in transportation and packaging have lowered costs and improved quality. Citrus fruits are produced all around the world. According to FAO data, in 2004, 140 countries produced citrus fruits. However, most production is concentrated in certain areas. The Northern Hemisphere accounts for around 70% of total citrus production. The main citrus fruit producing countries are Brazil, the Mediterranean countries, the United States and China. These countries represent more than two thirds of global citrus fruit production.

Citrus fruits not only have delicious flavors but also an antioxidant capacity that offers health benefits (Morton et al. 2000; Pellegrine et al. 2003). In addition to vitamin C, citrus juices contain a range of biologically active compounds such as flavonoids, carotenoids and polyphenolic derivatives (Johnston and Bowling 2002; Pupin et al. 1999). Evidence from several *in vitro* and *in vivo* studies has shown that consumption of citrus bioactive compounds protects against many chronic diseases such as cancer and cardiovascular diseases (Poulose et al. 2007; Vanamala et al. 2006). All these compounds possess antioxidant properties, allowing them to act as free radical scavengers.

In recent years, the total antioxidant capacity of foods has received much attention due to the potential synergistic action of bioactive compounds present in food (Serafini et al. 2002). The stable free radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl

(DPPH[•]) has been widely used to test the free radical-scavenging ability of various dietary antioxidant polyphenols (Sánchez-Moreno et al. 1998; Brand-Williams et al. 1995). One parameter that has been introduced for the interpretation of DPPH[•] scavenging results is the “effective concentration” or EC₅₀ value. This is defined as the concentration of substrate that causes 50% loss of the DPPH[•] activity (Molyneux, 2004).

One major characteristic of antioxidant compounds is their antioxidant capacity in the lipophilic or hydrophilic compartments (Arnao et al. 2001). Thus, selection of suitable extraction procedures with solvents of different polarities may allow the assessment of various potential antioxidants (Schwarz et al. 2001).

In the last years, the consumption of citrus juice in Brazil has been increasing rapidly with the growing awareness of its nutritive quality. However, little work has been reported on the study of the antioxidant capacity of citrus juice in Brazil.

Owing to the importance of the bioactive compounds present in citrus juice, the aim of this study was to assess the radical-scavenging capacity of extracts of citrus fruits cultivated in Brazil, in three different solvents and to compare their main antioxidant compounds.

Materials and methods

Chemicals

The solvents used in this study were purchased from Sigma-Aldrich (1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl), Quemis (methanol and acetone), Vetec (2,6-dichlorophenolindophenol and NaNO₂), Synth (sodium carbonate (Na₂CO₃) and oxalic acid), Mallinckrodt (L-ascorbic Acid and Gallic acid) and Dinâmica (NaOH and Folin–Ciocalteu reagent).

Citrus juice samples

Three lots each of four citrus varieties cultivated in Brazil were selected including two varieties of orange and two varieties of tangerine. The fruits were supplied by a citrus company and supermarkets in the neighbouring cities of Araraquara and Sao Carlos (Sao Paulo State, Brazil).

The fruits were randomly chosen, independently of their degree of ripeness. In each lot there were 12 fruits in average. The juice of the fruits was obtained by using a manual juice extractor. The maturity index (soluble solids/titrable acidity) of the citrus juice were: *pera* = 12.17, *lima* = 114.33, *cravo* = 11.15, and *ponkan* = 20.86.

Physicochemical characteristics

The solution of citrus juice was titrated with 0.1 N NaOH and the results were expressed as percentage of citric acid (AOAC International, 1995).

The total soluble solid content was determined as recommended by Association of Official Analytical Chemists (AOAC, 1995).

Analysis of ascorbic acid (AA)

The titration method was based on the reduction of the sodium salt of the blue dye 2,6-dichlorophenolindophenol by ascorbic acid, (AOAC International, 1995), and the results were expressed as mg of ascorbic acid/100mL of juice.

Determination of total phenolics

Total polyphenols were determined by the Folin–Ciocalteu method (Singleton and Rossi, 1965), using gallic acid as the standard. The absorbance was measured

at 760 nm in a Beckman UV/Vis spectrophotometer DU[®] 640. The linear reading of the standard curve was from 5 to 25 µg of gallic acid per mL. Total phenolics was expressed as mg of gallic acid equivalents (GAE) per 100 mL of juice.

Determination of total carotenoids

The carotenoids were extracted as described by Rodriguez-Amaya (1999). A 60 mL sample was placed in a Nalgene vessel, mixed with 14 mL of acetone, and centrifuged. Upon centrifugation, the upper colored layer containing the carotenoid pigments was recovered and washed with water to remove any trace of acetone. To obtain saponified carotenoids, the extracts were treated with ethanolic KOH (10% w/v) for 16 h under dim light and at room temperature, after with they were washed with water to remove any trace of base. The pigmented extract was partitioned to petroleum ether. The total carotenoid content was determined by measuring the absorbance at 450 nm in a UV/Vis spectrophotometer (in petroleum ether) and it was calculated by Rodriguez-Amaya (1999), using the absorption coefficient for β-carotene ($A_{1\text{cm}}^{1\%} = 2592$).

Free radical scavenging activity

Extraction

Duplicates of each juice sample (40 g) were centrifuged at 6,500 xg for 3 min and various volumes of the supernatants were transferred into 5 mL volumetric flasks and water added up to the mark (AQ). Other extracts were prepared from the precipitate. Approximately 5 g of pellet was extracted with 15 mL of methanol (MeOH) or 15mL of acetone (Ac), vortexed for 4 min and then centrifuged to obtain a clear supernatant liquid. Various volumes of the

supernatants were transferred into 5 mL volumetric flasks and methanol (MeOH) or acetone (Ac) was added up to the mark.

Determination of antioxidant activity by the DPPH[•] method

The procedure followed was that of Brand-Williams et al. (1995), with some variations. An aliquot (0.1 mL) of each concentration of each extract, prepared as in Section 2.7.1, was added to 2.46 mL of DPPH[•] (0.025 g/L) and kept in the dark for 30 min. Absorbance was measured at 515 nm (each measurement repeated three times). The absorbance of the DPPH[•] solution was measured daily. The DPPH[•] concentration in the reaction medium was calculated from the calibration curve, determined by linear regression.

The percentage of remaining DPPH[•] was calculated as follows:

$$\% \text{ DPPH}_{\text{REM}}^{\bullet} = [\text{DPPH}^{\bullet}]_{T=t} / [\text{DPPH}^{\bullet}]_{T=0}$$

The percentage of remaining DPPH[•] was then plotted against the extract concentration to obtain the amount of antioxidant necessary to decrease the initial DPPH[•] concentration by 50% (EC₅₀).

Statistical analysis

All samples were prepared and analyzed in triplicate and the experimental results represent treatment groups, expressed as means \pm SD. Significant differences between the results were calculated by analysis of variance (ANOVA). Differences at $p < 0.05$ were considered to be significant.

Results and discussion

Physicochemical characteristics of citrus juice

The quality parameters, TSS and TA of each juice are shown in Table I. In this study, the highest soluble content was found in the *cravo* tangerine and this was significantly different from the other citrus juices. The lowest soluble solid content was found in the *pera* orange. The *lima* orange and *ponkan* tangerine showed no significant difference in TSS values. The *cravo* juice had the most titratable acidity while the *lima* juice had the least.

Ascorbic Acid Content

Ascorbic acid contents of the citrus juice studied ranged from 45.67 ± 4.02 mg/100mL (*ponkan* tangerine) to 83.18 ± 1.22 mg/100mL (*pera* orange). The ascorbic acid contents of the orange juice were similar. For the tangerines, the ascorbic acid contents were also found to be similar. These results show that the ascorbic acid contents of the orange juices were appreciably higher than those of the tangerine juices (Table II). The content of ascorbic acid of the *pera* orange cultivated in Mediterranean area was reported to be 58.8 ± 1.0 mg/100mL (Dhuique-Mayer et al. 2005), while the content of ascorbic acid of the *pera* orange cultivated in Brazil was higher (83.18 ± 1.22 mg/100mL).

Total phenolic content

There is evidence that the spectrophotometric method overestimates the polyphenolic content relative to the chromatographic method. However, it has been shown to be a useful analytical tool for the routine analysis of polyphenols and it is widely used in many laboratories for the determination of differences among fruits and vegetables and their products (Bartolomé et al., 1998).

The total polyphenol contents of the four varieties of citrus juice are shown in Table II. Total polyphenol ranged from 509.5 ± 1.91 to 653.0 ± 21.42 GAE (mg/100 mL). *Cravo* contained the lowest total polyphenol and *lima* the most, followed by *ponkan* and *pera*. *cravo* and *lima* contents were significantly different.

Total carotenoid

Total carotenoids of the citrus juice studied ranged from 1.35 ± 0.12 to 7.67 ± 1.29 β -carotene ($\mu\text{g/mL}$) (Table2). The varieties of tangerine contained more total carotenoids than the varieties of orange. *Ponkan* juice had the highest content and it was significantly different from the other citrus juices.

Free radical scavenging activity

Among the aqueous fractions (AQ) of the citrus juices, EC_{50} ranged from 139.1 ± 27.36 to 275.5 ± 3.33 g extract/L (Figure 1). The lowest antioxidant potential (characterized by highest EC_{50}) was found in *cravo* tangerine juice (275.5 ± 3.33 g extract/L), and the highest in *lima* orange juice (139.1 ± 27.36 g extract/L). The low antioxidant potential of the *cravo* tangerine aqueous fraction may be attributed to its low ascorbic acid content (51.51 ± 4.47 mg/100mL) and low total phenolics content (509.5 ± 1.91 GAE, mg/100 mL). The high ascorbic acid content (80.94 ± 0.92 mg/100mL) and total phenolics content (653.0 ± 21.42 GAE, mg/100 mL) of *lima* juice contributed to its high scavenging activity.

The scavenging activity of citrus juice in methanol (MeOH) ranged from 192.5 ± 43.02 g extract/L (*lima* orange) to 336.3 ± 27.21 g extract/L (*cravo*

tangerine) and there were statistically significant differences between them (Figure 2). The same behavior was observed for activity of the aqueous fraction.

The free radical scavenging activity of citrus juice in the acetone fractions (Ac) was similar in the orange juices (210.7 ± 47.79 g extract/L for *lima* orange and 277.8 ± 59.09 g extract/L for *pera*) and the same for the tangerine juices (246.1 ± 4.21 g extract/L for *ponkan* and 311.8 ± 34.32 g extract/L for *cravo*), and there were no statistically significant differences between them (Figure 3).

The variation in the antioxidant capacity of different extracts may be attributed to differences in their chemical composition. The antioxidant activity shown by citrus fruit extracts may have been ascribed to the presence of flavonoids, carotenoids and ascorbic acid (Gorstein et al. 2004). Type and polarity of solvents may affect single electron transfer, and they are key aspects in the measurement of antioxidant capacity (Jayaprakasha and Patil, 2007).

Our results for radical scavenging activity of four citrus species in three solvent extracts, estimated by DPPH[•] reduction, suggest that the highest antioxidant capacity was observed in the aqueous fraction in all the citrus fruits studied, and the *lima* orange had the highest antioxidant capacity in all the solvents analyzed.

The *pera* orange has the highest ascorbic acid content (83.18 ± 1.22 mg/100 mL) and an intermediate total phenolic content (577.4 ± 4.47 GAE, mg/100 mL). The *ponkan* tangerine has the lowest ascorbic acid content (45.67 ± 4.02 mg/100 mL) and an intermediate total phenolic content (606.6 ± 30.67 GAE, mg/100 mL). The scavenging activities of *pera* and *ponkan*, both in aqueous and methanolic fractions, were all similar, with no statistically significant differences between them. These results suggest that phenolic compounds were the main contributors

to the total antioxidant capacity of citrus. However, some studies (Arena et al. 2001; Caro et al. 2004; Gardner et al. 2000; Yoo et al. 2004) have suggested that ascorbic acid, and not phenolic compounds, is the main contributor to the total antioxidant capacity of citrus juices, while others have suggested that phenolic compounds dominate the total antioxidant capacity of citrus juice (Rapisarda et al. 1999; Sun et al. 2002; Wang et al. 2007). It appears that some factors, such as the citrus variety, maturity, material preparation and analyzing methods may cause these divergences (Guihua et al. 2008).

Conclusion

In this study, physicochemical characteristics properties and bioactive compounds of four citrus fruit varieties cultivated in Brazil have been examined. The *cravo* mandarin has the highest total acidity and the *lima* orange has the lowest. The highest ascorbic acid content was found in the *pera* orange and the highest total phenolics in the *lima*. In all the citrus fruits tested in the present study, the radical scavenging capacity was higher in the AQ fractions than in the methanolic or acetone fractions. Our results suggest that phenolic compounds were the main contributors to the total antioxidant capacity of citrus.

References

- AOAC International 1995. Official methods of analysis of AOAC International (vol. II). Gaithersburg: AOAC International.
- Arena E, Fallico B, & Macarrone E. 2001. Evaluation of antioxidant capacity of blood orange juices as influenced by constituents, concentration process and storage. Food Chemistry 74: 423-427.

- Arnao MB, Cano A. & Acosta M. 2001. The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity. *Food Chemistry* 73: 239-244.
- Bartolomé B, Bengoechea M L, Sancho A I, Estrella I, Hernández T, & Gómez-Cordovés C. 1998. Differentiation of intermediate products (concentrates and purées) from the fruit industry by means of phenolics content. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung A* 206: 355-359.
- Brand-Williams W, Cuvelier M E, & Berset C. 1995. Use a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm Wiss Technol* 28: 25-30.
- Caro A D, Piga A, Vacca, V, & Agabbio M. 2004. Changes of flavonoids, vitamin C and antioxidant capacity in minimally processed citrus segments and juices during storage. *Food Chemistry* 84: (1) 99-105.
- Dhuique-Mayer C, Caris-Veyrat C, Ollitrault P, Curk F, and Amiot M-J. 2005. Varietal and interspecific influence on micronutrient contents in citrus from the Mediterranean area. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53: 2140-2145.
- F.A.O., 2004. Commodity Review and Outlook. Source: UNCTAA from F.A.O. data.
- Gardner P T, White T A C, Mcphail D B, & Duthie G G. 2000. The relative contribution of vitamin C, carotenoids and phenolics to the antioxidant potential of fruit juices. *Food Chemistry* 68: 471-474.
- Goristein S, Cvikrova M, Machackova I, Haruenkit R, Park Y, Jung S, et al. 2004. Characterization of antioxidant compounds in Jaffa sweeties and white grapefruits. *Food Chemistry* 84: 503-510.
- Guihua X, Donghong L, Jianchu C, Xingqian Y, Yaqin M, & John S. 2008. Juice components and antioxidant capacity of citrus varieties cultivated in China. *Food Chemistry* 106: 545-551.
- IBGE. Available from: <http://www.ibge.gov.br>.
- Jayaprakasha G K, Patil B S. 2007. In vitro evaluation of the antioxidant activities in the fruit extracts from citron and blood orange. *Food Chemistry* 101: 410-418.
- Johnston C S, Bowling D L J. 2002. Stability of ascorbic acid in commercially available orange juices. *Journal of the American Dietetic Association* 102: 525-529.

- Molyneux P. 2004. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH[•]) for estimating antioxidant activity. *Journal of Science Technology* 26: (2), 211-219.
- Morton L W, Caccetta R A, Puddey I B, Croft K D. 2000. Chemistry and biological effects of dietary phenolic compounds: Relevance to cardiovascular disease. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 27: 152-159.
- Pellegrine N, Serafini M, Colombi B, Del Rio D, Salvatore S, Bianchi M. et al. 2003. Total antioxidant capacity of plant foods, beverages and oils consumed in Italy assessed by three different in vitro assays. *Journal of Nutrition* 133: 2812-2819.
- Poulose S M, Jayaprakasha G K, Mayer R T, Girenavar B, Patil B S. 2007. Purification of citrus limonoids and their differential inhibitory effects on human cytochrome P450 enzymes. *Journal of the Science Food and Agriculture*: 87, in press.
- Pupin A M, Dennis M J, Toledo M C F. 1999. Analysis of carotenoids in orange juice. *Food Chemistry* 64: 269-275.
- Rapisarda P, Pannuzzo P, Romano G, Russo G. 2003. Juice components of a new pigmented citrus hybrid *Citrus sinensis* (L) Osbeck x *Citrus clementina* Hort. Ex Tan. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47: 4718-4723.
- Rodriguez-Amaya D B. 1999. A guide for carotenoid analysis in foods. Washington, DC: International Life Sciences Institute Press, 59.
- Sánchez-Moreno C, Larrauri J A, Saura-Calixto F. 1998. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 76: 270-276.
- Schwarz K, Bertelsen G, Nissen L R, Gardner P T, Heinonen M I, Hopia A, et al. 2001. Investigation of plant extracts for the protection of processed foods against lipid oxidation. Comparison of antioxidant assays based on radical scavenging, lipid oxidation and analysis of the principal antioxidant compounds. *European Food Research and technology* 212: 319-328.
- Serafini M, Bellocco R, Wolk A, Ekstrom A M. 2002. Total antioxidant potential of fruit and vegetables and risk of gastric cancer. *Gastroenterology* 102: 985-991.

- Singleton V L, Rossi J A. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolibdic-phosphotungstic acid reagents. *Amer. J. Enol. Viticult* 16: 144-158.
- Sun J, Chu Y F, Wu X, Liu R H. 2002. Antioxidant and antiproliferative activities of common fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 7449-7454.
- Vanamala J, Leonardi T, Patil B S, Taddeo S S, Murphy M E, et al. 2006. Suppression of colon carcinogenesis by bioactive compounds in grapefruit. *Carcinogenesis* 27: 1257-1265.
- Wang Y C, Chuang Y C, Ku Y H. 2007. Quantitation of bioactive compounds in citrus fruits cultivated in Taiwan. *Food Chemistry* 102: 1163-1171.
- Yoo K M, Lee K W, Park J B, Lee H J, Hwang I K. 2004. Variation in major antioxidants and total antioxidants activity of yuzu (*Citrus junus Sieb ex Tanaka*) during maturation and between cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52: 5907-5913.

Table I: TSS and TA contents of citrus juice samples^h.

Fruit	Species name	TSS (%) ⁱ	TA (%) ^j
<i>pera</i> orange	<i>Citrus sinensis</i> L. Osbeck	8.58±0.37c	0.75±0.09c
<i>lima</i> orange	<i>Citrus limettioides</i> Tanaka	9.38±0.89bc	0.07±0.01a
<i>ponkan</i> tangerine	<i>C. poonensis</i> Hort.ex Tanaka	10.87±0.75b	0.44±0.04b
<i>cravo</i> tangerine	<i>Citrus reticulata</i> Blanco	12.84±1.17a	0.78±0.10c

ⁱTotal soluble solid.

^jTotal titratable acidity.

^h Values are means ± SD (n=3). Means within a column with different letters are significantly different at $P<0.05$.

Table II: Ascorbic acid contents, total phenolics and total carotenoids of citrus varieties^h.

	AA	Total phenolics	Total carotenoids
Citrus juice	(mg/100mL)	(GAE, mg/100 mL)	(β-carotene, µg/mL)
<i>pera</i> orange	83.18±1.22a	577.4±4.47b	1.35±0.12a
<i>lima</i> orange	80.94±0.92a	653.0±21.42a	1.90±0.34a
<i>ponkan</i> tangerine	45.67±4.02b	606.6±30.67ab	7.67±1.29b
<i>cravo</i> tangerine	51.51±4.47b	509.5±1.91c	5.28±0.61c

^h Values are means ± SD, n=3. Means within a column with different letters are significantly different at $P<0.05$.

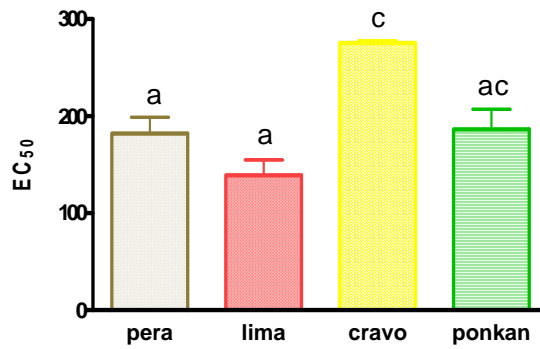


Figure 1. EC₅₀ values for citrus juice varieties in aqueous fraction (AQ). Values are means ± SD, n=3. Results with different letters are significantly different at $P<0.05$.

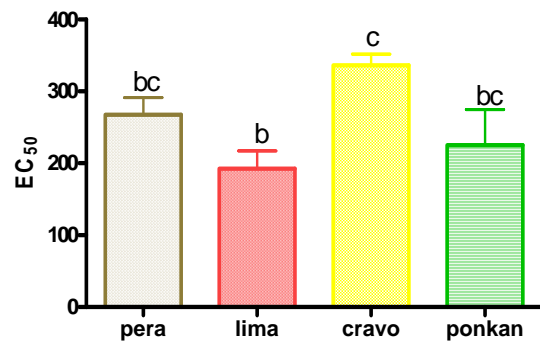


Figure 2. EC₅₀ values for citrus varieties in methanolic fraction (MeOH). Values are means ± SD, n=3. Results with different letters are significantly different at $P<0.05$.

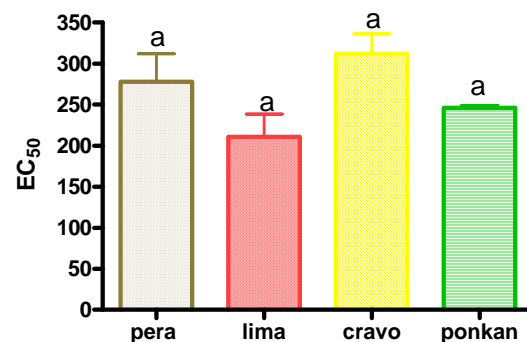


Figure 3. EC₅₀ values for citrus varieties in acetone fraction (Ac). Values are means ± SD, n=3. Results with different letters are significantly different at $P<0.05$.

CAPÍTULO 3

DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE

ANTIOXIDANTE E CONSTITUINTES

BIOATIVOS EM FRUTAS CÍTRICAS

Resumo

As frutas cítricas são conhecidas como fontes de constituintes antioxidantes e por isso nos últimos anos tem aumentado o interesse por essas frutas. Três variedades de frutas cítricas (laranja *valência*, tangor *murcote* e limão *tahiti*) foram analisadas quanto ao teor de fenólicos totais, flavonóides totais, carotenóides totais, ácido ascórbico e atividade antioxidante. A atividade antioxidante no extratos aquoso, metanólico e acetônico das frutas cítricas, foram avaliados pelo método do radical livre DPPH[•] (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl). O limão *tahiti* apresentou o maior teor de ácido ascórbico e flavonóides totais, já na laranja *valência* obteve-se o maior conteúdo de fenólicos totais e a tangor *murcote* o maior teor de carotenóides totais. A atividade antioxidante, expressa como EC₅₀, foi maior no extrato aquoso do que nos demais extratos.

Palavras chaves: frutas cítricas; constituintes antioxidantes; atividade antioxidante; DPPH[•].

Introdução

Nos últimos anos tem se observado um aumento significativo no consumo de frutos tropicais em todo o mundo. Atualmente a maior parte da produção brasileira de laranja destina-se à indústria do suco. O Brasil é o maior exportador mundial de suco de laranja, atendendo cerca de 50% da demanda e 75% das transações internacionais (ABECITRUS, 2008).

As frutas cítricas são conhecidas como fontes de constituintes antioxidantes (SANCHES-MORENO *et al.*, 2003) que apresentam várias ações benéficas ao ser humano, como por exemplo a atividade antioxidante. Dentre esses compostos bioativos, destacam-se o ácido ascórbico, os compostos fenólicos e os carotenóides (JOHNSTON *et al.*, 2002; PUPIN *et al.*, 1999).

A concentração de ácido ascórbico nas frutas cítricas varia de acordo com o tipo de cultivar, estágio de maturação, condições de cultivo entre outras. Os principais fatores que podem afetar a degradação da vitamina C em sucos de fruta incluem o tipo de processamento, condições de estocagem, tipo de embalagem, pH, presença de oxigênio, luz, catalisadores metálicos e enzimas. Alguns autores também relatam a influência da concentração de sais e de açúcar, concentração inicial de ácido ascórbico e carga microbiana (LEE e CHEN, 1998; LEE e COATES, 1999).

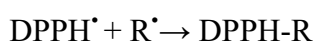
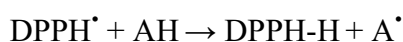
Os compostos fenólicos são efetivos doadores de hidrogênio e seu potencial antioxidante está correlacionado com o número e a posição dos grupos hidroxílicos e conjugações, bem como a presença de elétrons doadores no anel B devido à capacidade que esse anel aromático possui de suportar o desapareamento de elétrons deslocalizados do sistema de elétrons π (RAMIREZ-TORTOZA *et al.*, 2001).

Os carotenóides com mais que sete ligações duplas conjugadas são capazes de aprisionar ou desativar (quencher) oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$), sendo que esta atividade aumenta com o aumento do sistema de ligações duplas conjugadas (DI MASCIO *et al.* 1989). Os carotenóides podem desativar o oxigênio singlete de duas maneiras, reagindo com ele e formando produtos de oxidação (processo químico) ou dissipando a energia adquirida do oxigênio singlete na forma de calor (processo físico) e, desta forma, voltam ao estado fundamental. Esta segunda maneira é a que ocorre preferencialmente (STRATTON *et al.*, 1993).

Vários estudos têm indicado o papel chave dos radicais livres e outros oxidantes como grandes responsáveis pelo envelhecimento e pelas doenças degenerativas associadas ao envelhecimento, como câncer, doenças cardiovasculares, catarata, declínio do sistema imune e disfunções cerebrais (ATOUI *et al.*, 2005).

Os testes para medir a atividade anti-radical livre em alimentos e sistemas biológicos podem ser divididos em dois grupos: 1-métodos diretos, que avaliam a peroxidação lipídica no qual sob condições padronizadas usa-se um substrato (lipídico, lipoproteína) e mede-se o grau de inibição da oxidação, sendo os mais utilizados o TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico) e dienos conjugados (ROGINSKY e LISSI, 2005), 2- e os métodos indiretos, que medem a habilidade de aprisionar (scavenger) radicais livres e podem ser empregados na avaliação da capacidade anti-radical livre de compostos puros e de extratos complexos. E devido à estabilidade, facilidade de manipulação e simplicidade de procedimento, os radicais mais utilizados são derivados do 1,1-difenil-2-picrilidrazil (DPPH) e do ácido 2,2-azino-bis-(3-etilbenzotiazolona)-6-sulfônico (ABTS) (ROGINSKY e LISSI, 2005).

A atividade antioxidante de um composto ou extrato pode ser estimada após sua adição em solução metanólica de DPPH. A redução do DPPH[•] é acompanhada pelo monitoramento do decréscimo da absorvância a um determinado comprimento de onda. O DPPH[•] absorve a 515 nm, mas quando reduzido por um antioxidante (AH) ou espécies radicais (R[•]), a absorvância diminui (BRAND-WILLIANS *et al.*, 1995).



Os resultados são expressos como a quantidade de antioxidante necessária para diminuir em 50% a concentração inicial de DPPH[•] (EC₅₀ ou IC₅₀) em um tempo de reação fixo (CHOI *et al.*, 2002), ou até a formação de um patamar (BRAND-WILLIANS *et al.*, 1995).

Dada a importância das frutas cítricas e a necessidade de se conhecer mais sobre os constituintes presentes, o objetivo deste trabalho foi determinar os principais constituintes bioativos presentes em três diferentes variedades de frutas, assim como determinar a capacidade antioxidante, via radical DPPH[•], do suco da fruta extraído em três diferentes solventes (água, metanol e acetona).

Material e Métodos

Amostras

Foram selecionados três lotes de cada variedade de citros (laranja doce *valência*, tangor *murcote* e limão *tahiti*). As frutas foram adquiridas em indústrias e supermercados da região de São Carlos e Araraquara (São Paulo, Brasil).

As frutas foram escolhidas aleatoriamente, independentemente do seu grau de maturação. Cada lote continha aproximadamente 12 frutos. O suco das frutas foi obtido a partir de um extrator manual de suco.

Determinação de sólidos solúveis totais (SST), de acidez titulável total (ATT) e do ratio

O teor de sólidos solúveis totais (°Brix) e de acidez titulável total (expressa em % de ácido cítrico) das amostras foi realizado de acordo com os métodos da *Association of Official Analytical Chemists* (1995) e o ratio pela relação de sólidos solúveis/acidez total titulável.

Determinação de ácido ascórbico (AA)

O conteúdo de ácido ascórbico foi determinado por titulometria, método que se baseia na redução do 2,6-diclorofenol-indofenol pelo ácido ascórbico, e os resultados expressos em mg de ácido ascórbico/100mL de suco (AOAC, 1995).

Determinação de compostos fenólicos

O teor de fenólicos totais foi determinado pelo método de Folin–Ciocalteu, usando ácido gálico como padrão. A leitura da absorbância foi realizada a 760 nm em um espectrofotômetro Beckman DU[®] 640. A curva analítica foi construída nas concentrações entre 5 a 25 µg de ácido gálico por mL. Os resultados foram expressos em mg de ácido gálico por 100 mL de suco.

Determinação do teor de flavonóides totais

A extração dos flavonóides foi efetuada com acetona de acordo com Yu e Dahegren (2000). O conteúdo de flavonóides totais foi determinado pelo método

colorimétrico segundo Zhishen *et al.*, (1999), com leitura de absorvância a 510 nm. A rotina foi utilizada como padrão para a obtenção da curva de calibração. Os resultados foram expressos em mg equivalente de rutina/mL.

Determinação do teor de carotenóides totais

Os carotenóides foram extraídos com acetona fria, os pigmentos transferidos para éter de petróleo, saponificados com KOH metanólico por 16 horas. O extrato foi diluído com éter de petróleo e a leitura da absorvância da solução foi realizada a 450 nm. O teor de carotenóides totais foi expresso em termos de β -caroteno ($A_{1\text{cm}}^{1\%}$ de 2592, em éter de petróleo), aplicando-se a Lei de Beer (RODRIGUEZ-AMAYA, 1998).

Determinação da atividade antioxidante pelo método de DPPH[•]

A determinação da atividade antioxidante foi determinada via radical livre DPPH[•] segundo Brand-Willians, Cuvelier e Berset (1995) com algumas modificações. Amostra de suco cítrico (40 g) foi centrifugada a 6,500 g para separação do sobrenadante. Uma alíquota (0,1 mL) de diferentes concentrações do sobrenadante (concentrações do suco em água) e do precipitado (concentrações de 5,0 g do precipitado em metanol e 5,0 g do precipitado em acetona) de cada suco foi misturada com 2,46 mL da solução metanólica de DPPH[•] (0,025 g/L) e incubados por 30 minutos no escuro. A leitura da absorvância foi realizada a 515 nm. A partir da curva de calibração do DPPH[•] e dos valores da absorvância de cada concentração, foram determinados os percentuais de DPPH[•] remanescente. A percentagem de DPPH[•] remanescente versus a concentração da amostra foi

plotada para obter a quantidade de antioxidante necessária para decrescer a concentração inicial de DPPH• em 50% (EC₅₀).

Análise estatística

A análise estatística dos resultados foi realizada através de análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida pelo teste de Tukey. As diferenças que apresentaram níveis de probabilidade menores e iguais a 5% ($p \leq 0,05$) foram consideradas estatisticamente significativas.

Resultados e Discussão

Sólidos solúveis totais (SST), acidez titulável total (ATT) e ratio

Os valores para os SST encontrados nas frutas cítricas mostraram que a laranja variedade *valência* conteve significativamente ($p \leq 0,05$) o maior valor enquanto que o limão o menor valor (Tabela 1).

O teor de sólidos solúveis totais (SST), expresso como percentagem do peso da matéria fresca (AULENBACH e WORHINGTON, 1974) pode ser utilizado como indicador da qualidade de vários frutos. Em alguns frutos, o SST é de grande importância tanto para o consumo *in natura* como para o processamento industrial, visto que teores elevados na matéria prima implicam em menor adição de açúcares, menor tempo de evaporação da água, menor gasto de energia e maior rendimento do produto, resultando em maior economia no processamento (PINHEIRO *et al.*, 1984).

O limão *tahiti* apresentou significativamente ($p \leq 0,05$) o maior teor de acidez (Tabela 1) enquanto que as outras frutas não diferiram ($p > 0,05$) em seus valores. Para o ratio, um parâmetro muito utilizado pelas indústrias de sucos, o

limão apresentou o menor valor devido ao seu alto teor de acidez, já as demais frutas apresentaram valores muito próximos.

Ácido ascórbico, fenólicos totais, flavonóides totais e carotenóides totais

O teor de ácido ascórbico encontrado no limão *tahiti* foi estatisticamente superior ($p \leq 0,05$) ao encontrado nas variedades de laranja *valência* e tangor *murcote*, conforme tabela 1, sendo que as demais variedades não diferiram em seus valores. Por outro lado, o conteúdo de fenólicos totais foi significativamente menor ($p \leq 0,05$) para o limão *tahiti*, e estatisticamente superior ($p \leq 0,05$) para a variedade de laranja *valência*.

Em relação ao teor de flavonóides totais, o limão apresentou significativamente ($p \leq 0,05$) o maior teor deste constituinte enquanto que as demais variedades não diferiram em seus valores. Por fim, a variedade *murcote* apresentou maior teor de carotenóides totais ($p \leq 0,05$), comparado à laranja *valência*.

Tabela 1: Valores de sólidos solúveis totais, acidez total titulável, ratio, ácido ascórbico, fenólicos totais, flavonóides totais e carotenóides totais presentes nas três variedades de frutas cítricas*.

	<i>valência</i> (<i>Citrus sinensis</i> O.)	<i>murcote</i> (<i>Citrus reticulata</i> <i>Blanco x Citrus</i> <i>sinensis L. Osbeck</i>)	limão <i>tahiti</i> (<i>Citrus aurantifolia</i> <i>Swing var. Taiti</i>)
Sólidos solúveis totais (%)	12,5±0,01 ^a	9,6±0,02 ^b	7,8±0,03 ^c
Acidez total titulável (%)	0,83±0,01 ^a	0,77±0,01 ^a	1,09±0,06 ^b
Ratio (SST/ATT)	14,97 ^a	12,43 ^b	7,19 ^c
Ácido ascórbico (mg/100mL)	79,38±0,54 ^a	74,92±0,21 ^a	237,0±14,7 ^b
Fenólicos totais (<i>GAE</i> ,mg/100mL)	648,6±2,43 ^a	551,9±1,89 ^b	455,2±23,67 ^c
Flavonóides totais (mg Rutina, /mL)	68,0±0,10 ^a	65,5±0,01 ^a	96,27±0,13 ^b
Carotenóides totais (mg β-caroteno/mL)	2,23±0,09 ^a	5,86±0,56 ^b	**

*Os valores representam médias de três lotes±SD. Linhas com diferentes letras são significativamente diferentes no teste de Tukey ($p \leq 0.05$).

** não detectado

Analisando os dados obtidos dos principais constituintes bioativos presentes nas três variedades de frutas cítricas, pode-se concluir que não existe uma única fruta que contenha um alto teor de todos os compostos de interesse. Por exemplo, o limão *tahiti* apresentou um alto teor de ácido ascórbico e flavonóides totais e um baixo teor de fenólicos totais, enquanto que a *valência* conteve um teor expressivo de fenólicos totais e um baixo teor de carotenóides totais.

Atividade antioxidante (EC₅₀)

As frutas, de um modo geral, apresentam em sua constituição vários compostos com ação antioxidante, como o ácido ascórbico, os carotenóides e os polifenóis. A quantidade e o perfil destes fitoquímicos variam em função do tipo, variedade e grau de maturação da fruta bem como das condições climáticas e edáficas do cultivo (LEONG E SHUI, 2002). Para avaliar a atividade antioxidante de um vegetal é necessário extrair o máximo de compostos bioativos os quais apresentam polaridade diferenciada. Desta forma, a solubilidade em um determinado solvente é característica peculiar de cada fitoquímico, o que explica a inexistência de um procedimento de extração universal (MELO *et al.*, 2008).

Os valores da atividade antioxidante (EC₅₀) realizadas em três tipos de solventes (água, metanol e acetona) para as variedades de frutas cítricas em estudo, estão representados nas Figuras 1, 2 e 3 respectivamente.

Sobrenadante

A Figura 1 representa a capacidade antioxidante (EC₅₀) para o sobrenadante do suco, depois de centrifugado, diluído em água. O EC₅₀ é inversamente proporcional a capacidade antioxidante do suco ou fruta em questão.

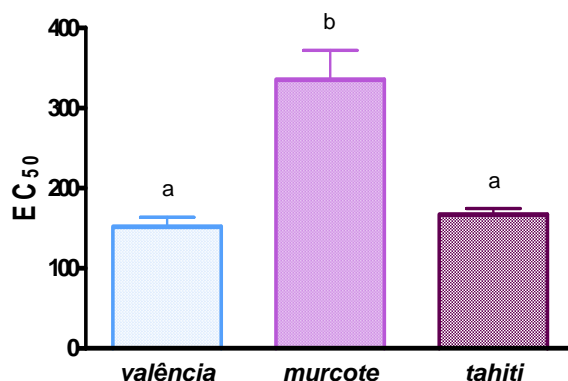


Figura 1 Valores de EC₅₀ para o sobrenadante do suco das frutas em meio aquoso. Os valores representam médias de três lotes±SD. Colunas com diferentes letras são significativamente diferentes no teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Os resultados obtidos demonstraram que a variedade *murcote* apresentou significativamente ($p \leq 0,05$) a menor capacidade antioxidante (maior EC₅₀) que as demais variedades sendo que a laranja *valência* e o limão *tahiti* não diferiram ($p > 0,05$) em seus valores. Esperava-se que nesse meio, aquoso, a capacidade antioxidante fosse maior para o limão que para as demais variedades, pois em meio aquoso o ácido ascórbico é totalmente solúvel e o limão conteve significativamente ($p \leq 0,05$) o maior teor de ácido ascórbico (Tabela 1), mesmo assim, a laranja *valência* apresentou estatisticamente o mesmo valor ($p > 0,05$) de EC₅₀, mesmo contendo um teor de ácido ascórbico ($p \leq 0,05$) inferior à do limão. No entanto, algumas estruturas de compostos fenólicos também são hidrossolúveis (MELO *et al.*, 2008) e, a laranja *valência* conteve um valor superior ($p \leq 0,05$) deste constituinte.

Alguns autores (MELO *et al.*, 2008) confirmaram em seus estudos, que a contribuição do ácido ascórbico no seqüestro do radical DPPH[•] variou extensivamente entre as frutas por eles analisadas, enquanto outros (WANG *et al.*,

1996) tenham relatado que o percentual de contribuição do ácido ascórbico na ação antioxidante das frutas foi inferior a 15%. Em suco de 5 variedades de laranjas foi evidenciado uma baixa e uma alta correlação entre o teor de fenólicos e a capacidade antioxidante e entre o teor de ácido ascórbico e a capacidade antioxidante, respectivamente (RAPISARDA *et al.*, 1999). Logo, há muitas controvérsias em resultados existentes na literatura e isso indica a necessidade de mais estudos nesta área.

Precipitado em metanol

A Figura 2 representa a capacidade antioxidante (EC_{50}) para o precipitado do suco, depois de centrifugado, extraído com metanol. Nesse meio, metanólico, estão presentes compostos como os fenólicos e os flavonóides e em menor proporção, o ácido ascórbico.

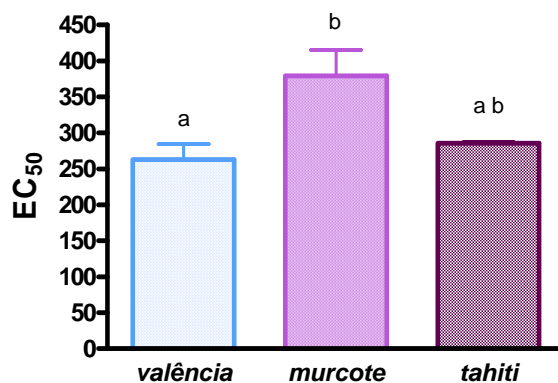


Figura 2. Valores de EC_{50} para o precipitado do suco das frutas extraído com metanol. Os valores representam médias de três lotes \pm SD. Colunas com diferentes letras são significativamente diferentes no teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Os resultados obtidos demonstraram que as variedades *murcote* e a *valência* apresentaram diferença significativa ($p \leq 0,05$) em seus valores, sendo que a *valência* demonstrou ter maior capacidade antioxidante que a *murcote*.

Precipitado em acetona

A Figura 3 representa a capacidade antioxidante (EC_{50}) para o precipitado do suco, depois de centrifugado, extraído com acetona.

Neste estudo realizou-se a extração dos compostos fenólicos, flavonóides totais e carotenóides com a acetona, considerando que boa parte destes pigmentos seja solúvel neste meio. A variedade *valência* apresentou o maior valor de compostos fenólicos, já a variedade limão *tahiti* conteve o maior teor de flavonóides totais e a variedade tangor *murcote* o maior teor de carotenóides totais (Tabela 1).

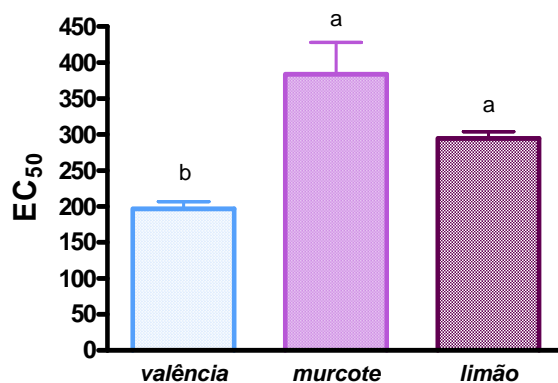


Figura 3. Valores de EC_{50} para o precipitado do suco das frutas extraído com acetona. Os valores representam médias de três lotes \pm SD. Colunas com diferentes letras são significativamente diferentes no teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Pelos resultados obtidos, pode-se observar que nenhuma diferença significativa foi encontrada entre as variedades *murcote* e limão *tahiti*, entretanto

a variedade *valência* apresentou significativamente ($p \leq 0,05$) a maior capacidade antioxidante neste meio. Sendo assim, estes resultados concordam com os obtidos por outros autores (RAPISARDA *et al.*, 1999; RAPISARDA *et al.*, 2003; DUZZIONI *et al.*, 2009; SUN *et al.*, 2002; WANG *et al.*, 2007) que afirmam que os compostos fenólicos são os maiores contribuidores para a atividade antioxidante das frutas.

Além da presença dos compostos analisados neste estudo, podem existir outros componentes fitoquímicos em cada extrato avaliado. A estrutura química do componente ativo tem influência sobre a eficácia do antioxidante natural, uma vez que a posição e o número de hidroxilas presentes na molécula dos polifenóis é um fator relevante para esta atividade (MELO *et al.*, 2008), o mesmo ocorre para os carotenóides totais. Assim, não basta apenas determinar o teor de compostos totais, o ideal seria identificá-los individualmente, pois cada constituinte isolado apresenta uma estrutura diferenciada, logo uma capacidade antioxidante diferente.

A laranja *valência*, que se destina principalmente à indústria de suco, apresentou boa atividade antioxidante nos diferentes meios de extração.

Ao compararmos os resultados obtidos com os diferentes meios de extração (Figura 1, 2 e 3), podemos observar que a atividade antioxidante foi maior em meio aquoso do que nos precipitados em metanol e acetona. Desta forma, os constituintes bioativos presentes neste meio apresentam maior capacidade de seqüestrar radicais livres. Entretanto, não devemos esquecer que a capacidade antioxidante nestas frutas foi avaliada somente via radical DPPH^{*} e, assim, não podemos afirmar que uma fruta apresenta maior ou menor atividade antioxidante sem realizarmos mais estudos, inclusive com outros métodos disponíveis.

Conclusão

Deste presente estudo, pôde-se concluir que cada fruta cítrica possui seus constituintes específicos e, sendo assim, não existe uma fruta que apresente todos ou a maior quantidade de compostos bioativos.

Para conhecer melhor a capacidade antioxidante de uma fruta, se faz necessário isolar e quantificar o maior número de compostos bioativos presentes em diferentes solventes, assim como também utilizar o maior número de métodos possíveis que possam avaliar a sua atividade antioxidante.

Referências

- ABECITRUS – Associação Brasileira dos Exportadores de Cítricos. Disponível em: http://www.abecitrus.com.br/industria_br.html. Acessada em: outubro 2008.
- AOAC- Official methods of analysis of AOAC International (vol. II). Gaithersburg: AOAC International, 1995.
- ATOUI, A. K.; MANSOURI, A.; BOSKOU, G.; KEFALAS, P. Tea and herbal infusions: Their antioxidant activity and phenolic profile. **Food Chem.** v. 89, n. 1, p. 27-36, 2005.
- AULENBACH, B. B.; WORHINGTON, J. T. Sensory evaluation of muskmelon: is soluble solids content a good quality index? **Hort Sci.**, Alexandria, v. 9, p. 136-137, 1974.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensm. Wiss. Technol.**, v. 22, p. 25-30, 1995.
- CHOI, C.; KIM, S. K.; HWANG, S. S.; CHOI, B. K.; AHN, H. J.; LEE, M. Y.; PARK, S. H.; KIM, S. K. Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparison. **Plant Sci.**, v. 163, p.1161-1168, 2002.

- DI MASCIO, P.; KAISER, S.; SIES, H. Lycopene as the most efficient biological carotenoid singlet oxygen quencher. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 274, p. 532-538, 1989.
- DUZZIONI, A. G.; FRANCO, A. G.; SYLOS, C. M. Radical scavenging activity of orange and tangerine varieties cultivated in Brazil. **Int. J. Food Sci. Nutr.**, no prelo.
- JOHNSTON, C. S.; BOWLING, D. L. J. Stability of ascorbic acid in commercially available orange juices. **J. Am. Diet. Assoc.** v. 102, p. 525-529, 2002.
- LEE, H. S.; CHEN, C. S. Rates of vitamin C loss and discoloration in clear orange juice concentrate during storage at temperature of 4-24°C. **J. Agric. Food Chem.**, v. 46, p. 4723-4727, 1998.
- LEE, H. S.; COATES, G. A. Vitamin C in frozen, fresh squeezed, unpasteurized, polyethylene-bottled, orange juice: a storage study. **Food Chem.**, v. 65, p. 165-168, 1999.
- LEONG, L. P.; SHUI, G. An investigation of antioxidant capacity of fruits in Singapore markets. **Food Chem.**, v. 76, p.69-75, 2002.
- MELO, E. A.; MACIEL, M. I. S., LIMA, V. L. A. G.; Nascimento, R. J. Capacidade antioxidante de frutas. **Braz. J. Pharm. Sci.**, v.44, p. 193-2001, 2008.
- NEVES, M. F.; JANK, M. S. Perspectivas da cadeia produtiva de laranja no Brasil: A Agenda 2015. São Paulo, 23 Nov. 2006. Disponível em: http://www.fundacaofia.com.br/pensa/downloads/Agenda_Citrus_2015_PENS_AICONE. Acesso em: 21 Abr. 2008.
- PINHEIRO, R. V. R.; MARTELETO, L. O.; SOUZA, A. C. G. de; CASALI, W. W. D.; CONDÉ, A. R. Produtividade e qualidade dos frutos de dez variedades de goiaba, em Visconde do Rio Branco, Minas Gerais, visando ao consumo ao natural e à indústria-lização. **Revista Ceres**, Viçosa, v.31, p. 360-387, 1984.
- PUPIN, A. M., DENNIS, M. J.; TOLEDO, M. C. F. Analysis of carotenoids in orange juice. **Food Chem.**, v. 64, p. 269-275, 1999.
- RAMIREZ-TORTOZA, C.; ANDERESSEN, O.M.; GARDNER, P. T.; MORRICE, P. C.; WOOD, S. G.; DUTHIE, S. J.; COLLINS, A. R.. Anthocyanin-rich extract decreases indices of lipid peroxidation and DNA

- damage in vitamin E depleted rats. **Free Radical Biol. Med.**, v. 46, p. 1033-1037, 2001.
- RAPISARDA, P.; PANNUZZO, P.; ROMANO, G.; RUSSO, G. Juice components of a new pigmented citrus hybrid *citrus sinensis* (L.) osbeck ´ *citrus clementina* hort. ex tan. **J. Agric. Food Chem.**, v.51, p.1611-1616, 2003.
- RAPISARDA, P.; TOMAINO, A.; LO CASCIO, R.; BONINA, F.; PASQUALE, A.; SAIJA, A. Antioxidant effectiveness as influenced by phenolic content of fresh orange juices. **J. Agric. Food Chem.**, v. 47, p.4718-4723, 1999.
- RODRIGUEZ-AMAYA D B. 1998. A guide for carotenoid analysis in foods. Washington, DC: International Life Sciences Institute Press, 59.
- ROGINSKY, V.; LISSI, E. A. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food, **Food Chem.**, v. 92, n. 2, p. 235-254, 2005.
- SÁNCHEZ-MORENO, C; PLAZA, L; ANCOS, B; CANO, M. P. Quantitative bioactive compounds assessment and their relative contribution to the antioxidant capacity of commercial orange juices. **J. Sci. Food Agric.**, v. 83, p. 430-439, 2003.
- SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolibdic-phosphotungstic acid reagents. **Amer. J. Enol. Viticult.**, v. 16, p. 144-158, 1965.
- STRATTON, S. P.; SCHAEFER, W. H.; LIEBLER, D. C. Isolation and identification of singlet oxygen oxidation products of β -carotene. **Chem. Res.Toxicol.**, v.6, p. 542-547, 1993.
- SUN, J.; CHU, Y. F.; WU, X.; LIU, R. H. Antioxidant and antiproliferative activities of common fruits. **J. Agric. Food Chem.**, v. 50, p. 7449-7454, 2002.
- WANG, H.; CAO, G.; PRIOR, R. L. Total antioxidant capacity of fruits. **J. Agric. Food Chem.**, v.44, p.701-705, 1996.
- WANG, Y. C.; CHUANG, Y. C.; KU, Y. H. Quantitation of bioactive compounds in citrus fruits cultivated in Taiwan. **Food Chem.**, v.102, p.1163-1171, 2007.
- YU, D.; DAHEGREN, R. A. Evaluation of methods for measuring polyphenol in coniter foliage. **J. Chem. Ecol.**, v.26, p.2119-2140, 2000.
- ZHISHEN, J.; MENGCHENG, T.; JIANMING, W. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. **Food Chem.**, v. 64, p. 555-559, 1999.

CAPÍTULO 4

ATIVIDADE ANTIOXIDANTE, VIA RADICAL LIVRE DPPH[•], DOS EXTRATOS DE CAROTENÓIDES TOTAIS E FLAVANONAS DE ALGUMAS VARIEDADES DE LARANJAS CULTIVADAS NO BRASIL

Resumo

A laranja é uma fruta cítrica muito consumida por todo o mundo e conhecida por seus constituintes fitoquímicos presentes tanto no suco como na casca. Três variedades de laranjas foram avaliadas quanto a coloração, ao teor de carotenóides totais (β -caroteno $\mu\text{g/mL}$) e flavanonas. Também foi avaliado o potencial de redução via radical DPPH \cdot dos extratos de carotenóides e flavanonas. Os parâmetros de cor b^* e C^* nas variedades de citros aqui estudadas apresentaram valores diretamente proporcionais. As variedades de laranjas *lima* e *valência* apresentaram valores de carotenóides totais significativamente ($p \leq 0.05$) superiores ao valor encontrado para a variedade de laranja *pêra*. Dos cinco diferentes tipos de flavanonas avaliadas neste estudo (eriocitrina, naringina, hesperidina, neohesperidina e poncirina), apenas a hesperidina esteve presente em todas as variedades estudadas. A contribuição dos dois diferentes extratos na atividade antioxidante das três variedades de frutas cítricas variou de variedade para variedade.

Palavras chaves: Frutas cítricas; Cor; Flavanonas; Carotenóides totais e DPPH \cdot

Introdução

As frutas cítricas são importantes fontes de compostos com atividade antioxidante como ácido ascórbico, carotenóides e compostos fenólicos, e que podem trazer vários benefícios à saúde, estando estes associados à prevenção de desenvolver doenças degenerativas, como câncer, diabetes, cardiovasculares e doenças neurológicas (WATADA, ABE e YAMAUCHI, 1990).

Estudos têm demonstrado que não só o valor nutricional é de fundamental importância para a determinação da qualidade dos alimentos, mas também a cor é muito importante por causa dos estímulos visuais. O sentido da visão é a primeira a ser utilizado na escolha de itens alimentares, por isso é um fator decisivo para escolher um produto (LIMA *et al.*, 2005). Cor mental é uma resposta ao estímulo que produz uma radiação visível sobre a retina, que é transmitida ao cérebro através do nervo óptico (MELÉNDEZ-MARTINEZ *et al.*, 2005).

O sistema CIELab (Commission Internationale de l'Éclairage - Lightness, redness-greenness, and yellowness-blueness) tem sido empregado por vários autores para caracterizar a cor dos alimentos. As coordenadas retangulares do sistema CIELab são luminosidade (L^*), vermelho-verde (a^*), amarelo-azul (b^*), e as coordenadas cilíndricas são chroma (C^*) e o ângulo Hue (OLIVEIRA *et al.*, 2003).

A cor dos sucos cítricos é devido principalmente à presença dos pigmentos carotenóides. Citros, em geral, são excelentes fontes de carotenóides, com uma larga variedade destes pigmentos (GROSS, 1987). Eles fornecem a cor amarela, laranja e vermelho de muitos alimentos (MELÉNDEZ-MARTÍNEZ *et al.*, 2005).

Os flavonóides constituem o mais importante grupo de compostos fenólicos, onde três tipos de flavonóides ocorrem com freqüência em frutas cítricas: flavanonas, flavonas e flavonóis (BENAVENTE-GARCIA *et al.*, 1997; CALABRÒ *et al.*, 2004).

A importância dos flavonóides na saúde humana se deve às inúmeras funções biológicas, verificadas tanto *in vitro* como também *in vivo* (EDWARDS e BERNIER, 1996; HOLLMAN *et al.*, 1996; KAWAII *et al.*, 1999; SIVAM, 2002). Dentre os efeitos potencialmente benéficos atribuídos aos flavonóides estão: antialergênico, antiinflamatório, antiviral, antiulcerogênico, antiproliferativo, anticarcinogênico, atividade antihepatotóxica, preventivo na formação de plaquetas (aterosclerose), ação antitrombótica, antiespasmolítico e, também, efeitos antihipertensivo e antiarrítmicos (SÁNCHEZ-MORENO *et al.*, 2003; MIDDLETON Jr. e KANDASWAMI, 1994; DEL RÍO *et al.*, 2004; FORMICA e REGELSON, 1995; LARRAURI *et al.*, 1996; CAMARDA, *et al.*, 2007; DI CARLO *et al.*, 1999).

Estudos epidemiológicos têm reportado uma significativa associação positiva entre o consumo de frutas cítricas e a redução do risco de doenças coronárias (CALABRÒ *et al.*, 2004; HERTOOG *et al.*, 1993; STAVRIC, 1993). A hesperidina, principal flavanona em algumas frutas cítricas, possui grande capacidade antiinflamatória e analgésica e também efeito antioxidante nos radicais livres envolvidos em câncer (DEL RÍO *et al.*, 2004).

O suco de laranja é a mais importante fonte alimentar de vitamina A (β -caroteno, α -caroteno e β -criptoxantina) e antioxidantes carotenóides (β -caroteno, β -criptoxantina, luteína e zeaxantina), devido ao seu conteúdo e ao seu elevado consumo (GIOVANNUCCI, 1999; KRITCHEVSKY, 1999; TIBBLE, 1999;

SLATERRY *et al.*, 2000; TEMPLE, 2000). Esses carotenóides têm sido indicados na redução de doenças degenerativas, como câncer e doenças cardio e cerebrovascular (TIBLE, 1998) devido a sua propriedade antioxidante (LANDRUM e BONE, 2001; De ANCOS *et al.*, 2002)

Os carotenóides agem *in vivo* como desativadores do oxigênio singlete ou como seqüestradores dos radicais peroxila, reduzindo a oxidação do DNA e lipídeos, que está associada a doenças degenerativas, como câncer e doenças cardíacas. A principal atividade antioxidante dos carotenóides é a desativação do oxigênio singlete (BURRY, 1997; PALACE *et al.*, 1999).

Existem vários métodos utilizados para determinar a capacidade antioxidante de um extrato, dentre eles destaca-se o DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazila). O DPPH[•] apresenta coloração violeta e na presença de doadores de hidrogênio (antioxidantes seqüestrantes de radicais livres) se reduz tornando-se amarelo o que é monitorado pelo decréscimo na absorbância durante a reação ou até atingir-se um platô. Esta reação é amplamente utilizada para testar a habilidade de compostos em seqüestrarem radicais livres ou doadores de hidrogênio, e assim, avaliar a atividade antioxidante de alimentos e extratos vegetais (YAMAGUCHI *et al.*, 1998).

No Brasil, a maior parte da produção brasileira de laranja destina-se à indústria do suco. O Brasil transformou-se no maior exportador mundial de suco de laranja, atendendo hoje cerca de 50% da demanda e 75% das transações internacionais (ABECITRUS, 2008).

São escassos os estudos sobre frutas cítricas brasileiras, mesmo sendo o país o maior exportador mundial do suco de laranjas. É necessário e importante que se conheça cada vez mais o potencial benéfico que essas frutas nos propiciam.

Com isso, o objetivo deste trabalho é verificar e comparar a capacidade antioxidante dos extratos de carotenóides e flavanonas extraídos de três variedades de laranjas.

Material e métodos

Amostras

Foram selecionados três lotes de três variedades de laranjas: pêra (*Citrus sinensis* L. Osbeck), lima (*Citrus limettioides* Tanaka) e valência (*Citrus sinensis* O). As frutas foram adquiridas em indústrias e supermercados da região de São Carlos e Araraquara (São Paulo, Brasil), sendo escolhidas aleatoriamente, independentemente do seu grau de maturação, onde cada lote continha aproximadamente 12 frutos. O suco das frutas foi obtido a partir de um extrator manual de suco. O índice de maturidade (sólidos solúveis/acidez total titulável) do suco das frutas foi: *pêra* = 12.17, *lima* = 114.33 e *valência* = 14.97.

Determinação da cor

A medida da cor foi realizada segundo os parâmetros de CIELab, sendo os valores de L^* (luminosidade), a^* (índice de saturação vermelho) e b^* (índice de saturação amarelo) obtidos após leitura das amostras em colorímetro espectrofotômetro Hunter (Color Quest II Sphere, CQII/UNI 1200) em reflectância, em um ângulo de 10° e iluminante D65. Os valores de L^* , a^* e b^* matematicamente combinados permitem calcular as razões a^*/b^* e $(a^*/b^*)^2$. O ângulo hue e Chroma foram calculados segundo as equações (ARIAS *et al.*, 2000):

$$\text{hue} = \tan^{-1} (b^*/a^*), \text{ quando } a^* > 0 \text{ e } b^* \geq 0$$

$$\text{hue} = 180 + \tan^{-1} (b^*/a^*), \text{ quando } a^* < 0$$

Determinação do teor de carotenóides totais

Os carotenóides foram extraídos com acetona fria, os pigmentos transferidos para éter de petróleo e saponificados com KOH metanólico por 16 horas. O extrato foi diluído com éter de petróleo e a leitura da absorbância da solução foi realizada a 450 nm. O teor de carotenóides totais foi expresso em termos de β -caroteno ($A_{1\text{cm}}^{1\%}$ de 2592, em éter de petróleo), aplicando-se a Lei de Beer (RODRIGUEZ-AMAYA, 1998).

Determinação do teor das flavanonas glicosídicas (FGs)

A extração das flavanonas foi de acordo com BOCCO *et al.*, (1998). Foram misturados 3,0 mL de suco com 5,0 mL de metanol e agitado em um vórtex por 2 minutos, seguido de aquecimento à 55°C por 15 minutos e centrifugação a 3150 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi recolhido e todo procedimento foi repetido mais duas vezes. Os extratos metanólicos foram misturados e evaporados em banho de água à 50°C sob fluxo de nitrogênio, sendo levados a um volume final de 10 mL com metanol.

A coluna empregada na separação das flavanonas foi C₁₈ Shimadzu Shim-pack CLC-ODS (M) (4,6 x 250 mm, 5 μ m) e como fase móvel, a mistura acetonitrila: água: ácido acético (21:75:4) (v/v/v) com vazão de 1,0 mL/min com detector por arranjo de fotodiodos (DAD) Waters 996. O tempo de corrida foi de 30 minutos e a detecção realizada a 280 nm. A fase móvel e o perfil do gradiente estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1: Perfil do gradiente usado no CLAE para a identificação das flavanonas contidas nas variedades de laranjas.

Time (min)	Características de eluição			
	0	10	20	25 ^a
% of A ^b	8	34	70	0
% of B ^c	92	66	30	100

^atempo de equilíbrio, 5min

^bsolvente A, acetonitrila

^cSolvente B, água-ácido acético (96:4 v/v)

Todos os solventes utilizados foram previamente filtrados em sistema Millipore de filtração à vácuo com membrana filtrante Nylon 66 para solvente orgânico de 0,45 µm (Schleicher & Schuell RC-L 55).

A identificação das flavanonas foi feita pela comparação dos tempos de retenção e dos espectros obtidos pelo detector por arranjo de fotodiodos (DAD) das amostras com os dos respectivos padrões (eriocitrina, naringina, neohesperidina, hesperidina e poncirina) entre 200 e 450nm.

*Determinação da atividade antioxidante dos extratos de carotenóides totais e flavanonas pelo método de DPPH**

O procedimento aplicado foi de acordo com BRAND-WILLIAMS *et al.*, (1995), com algumas variações. Uma alíquota (0,1 mL) do extrato de cada fruta (carotenóides totais e flavanonas) foi adicionada a 2,46 mL da solução metanólica de DPPH* (0,025 g/L) e a mistura permaneceu no escuro por 30 min. A absorbância foi medida a 515 nm (cada medida foi repetida três vezes), sendo que a da solução metanólica de DPPH* foi medida inicialmente. Os resultados foram

expressos como porcentagem de redução da absorvância da mistura em relação à absorvância da solução metanólica de DPPH.

Análise estatística

A análise estatística dos resultados foi realizada através de análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida pelo teste de Tukey. As diferenças que apresentaram níveis de probabilidade menores e iguais a 5% ($p \leq 0,05$) foram consideradas estatisticamente significativas.

Resultados e discussão

Medida da cor

Os valores de L^* (luminosidade), a^* (vermelho-verde), b^* (amarelo-azul), C^* (chroma) e o h (Hue), parâmetros de cor CIELAB referente ao suco das frutas são apresentados na Figura 1. O parâmetro a^* forneceu um valor negativo para a variedade de laranja *pêra*, indicando que este suco aproximou-se mais do eixo da cromaticidade do verde, possuindo uma cor levemente esverdeada. Já as outras duas variedades de laranjas, os valores foram positivos de a^* indicando uma cor mais avermelhada. Os valores referentes ao parâmetro b^* são todos positivos, o que indica a presença da cor amarelada dos sucos. Todas as três variedades de frutas cítricas em questão apresentaram valores do parâmetro L^* (Luminosidade) muito próximos, valores estes que não se encontram nem próximo de 100 (branco) e nem próximo de zero (preto). O parâmetro h mostra a localização da cor em um diagrama, aonde o ângulo 0° representa vermelho puro; o 90° , o amarelo puro; o 180° , o verde puro e o 270° , o azul puro. Neste caso, o ângulo predominante foi próximo a 90° representando a cor amarela. O cromatismo é definido pela distância de h

ao centro do diagrama tridimensional, sendo o 0 no centro e aumentando de acordo com a distância (CLYDESDALE, 1984; OLIVEIRA, 2002). Das variedades de frutas cítricas estudadas, os valores que se encontram mais próximos de zero são as variedades *pêra* e *lima*.

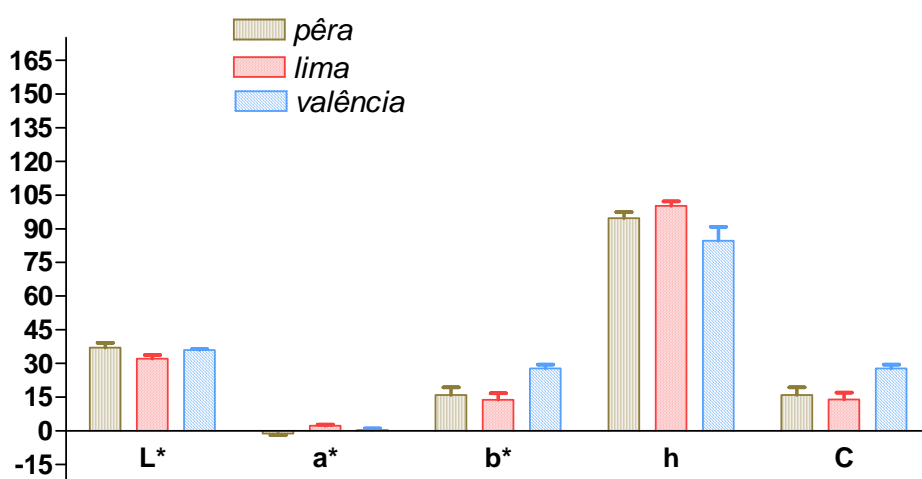


Figura 1: Valores de cor do sistema CIELAB para as três diferentes variedades de laranjas. Os valores representam médias de três lotes.

Com os resultados obtidos neste estudo, pode-se observar que os parâmetros b^* e C^* estão fortemente correlacionados, pois as variedades que contiveram um valor menor do parâmetro b^* também apresentaram um valor menor do parâmetro C^* .

Conteúdo de carotenóides totais

As variedades *lima* e *valência* apresentaram valores de carotenóides totais significativamente ($p \leq 0.05$) superiores quando comparado ao valor encontrado para a variedade *pêra* (Tabela 2). Em várias variedades de frutas cítricas cultivadas na China, o teor de carotenóides totais variou entre 0.06 a 10.02 mg β -

caroteno/L (XU *et al.*, 2008), sendo que os valores encontrados nas variedades do presente estudo se encontram dentro desta faixa. Já Sánchez-Moreno *et al.*, (2003) encontraram um teor de carotenóides totais igual a 4.93 mg/L para a variedade *valência*, superior ao encontrado por nós para essa mesma variedade. Este comportamento se deve ao fato de que o teor de carotenóides em um alimento ou fruto depende da variedade do mesmo, de fatores climáticos e geográficos, condições de estocagem entre outros (RODRIGUES-AMAYA, 2001).

Ao tentar correlacionar o teor de carotenóides totais com os valores dos parâmetros a^* e b^* , percebe-se que não é possível, visto que a variedade *lima* apresentou um teor menor de carotenóides totais e, no entanto um valor maior do parâmetro a^* quando comparado a variedade *valência*. O mesmo aconteceu para a variedade *pêra* que conteve o menor teor de carotenóides totais e mesmo assim apresentou um valor maior de b^* . Essa comparação só se torna possível com a identificação majoritária dos carotenóides presentes nos citros.

Sánchez- Moreno *et al.*, (2003) em seus estudos com sucos comerciais de laranjas, também não encontraram uma correlação significativa entre a concentração total de carotenóides e os parâmetros a^* e b^* . No entanto, segundo os autores, há uma possível relação entre o parâmetro h^* e a estrutura química do carotenóide.

Com exceção do suco laranja *lima*, que apresentou um ratio muito elevado (114,33) devido ao seu baixo teor de acidez (sessão amostras), o ratio das outras duas variedades de suco de laranjas esteve fortemente correlacionado com o teor de carotenóides totais, pois quanto maior o ratio maior o teor de carotenóides totais na mesma.

Conteúdo de flavanonas glicosídicas (FGs)

Cinco diferentes tipos de flavanonas (eriocitrina, naringina, hesperidina, neohesperidina e poncirina) foram analisadas nas três variedades de laranjas (Tabela 2). Naringina, neohesperidina, poncirina e eriocitrina não foram detectadas em nenhuma das frutas cítricas em questão, sendo que a hesperidina esteve presente em todas as variedades estudadas.

O teor de hesperidina encontrado nos citros variou de 127.7 ± 3.7 a 203.9 ± 3.5 mg/L. A variedade *valência* apresentou o maior teor deste constituinte ($p \leq 0.05$) diferindo das demais variedades, enquanto que a variedade *lima* apresentou o menor teor ($p \leq 0.05$).

Tabela 2: Conteúdo de flavanonas glicosídicas (mg/L) e carotenóides totais ($\mu\text{g } \beta\text{-caroteno/mL}$) nas variedades de laranjas*.

	<i>pêra</i> (<i>Citrus sinensis</i> L. <i>Osbeck</i>)	<i>lima</i> (<i>Citrus limettioides</i> <i>Tanaka</i>)	<i>valência</i> (<i>Citrus sinensis</i> <i>O.</i>)
Eriocitrina	nd**	nd	nd
Naringina	nd	nd	nd
Hesperidina	$216,0 \pm 5,3a$	$172,7 \pm 3,7b$	$203,9 \pm 3,5c$
Neohesperidina	nd	nd	nd
Poncirina	nd	nd	nd
Carotenóides totais ($\mu\text{g } \beta\text{caroteno/mL}$)	$1,35 \pm 0,12a$	$1,90 \pm 0,34b$	$2,23 \pm 0,09b$

* Os valores representam médias de três lotes \pm SD. Linhas com diferentes letras são significativamente diferentes no teste de Tukey ($p \leq 0.05$).

** não detectado

Segundo Xu *et al.*, (2008) as principais flavanonas glicosídicas presentes no suco de laranjas e tangerinas cultivadas na China foram a hesperidina e a

naringina, sendo que a naringina e a neohesperidina não foram detectadas. Em seus estudos, o teor de hesperina nas frutas variou entre 304.46 a 533.64 mg/L, valores estes bem acima do encontrado no presente trabalho. No entanto, Sánchez-Moreno *et al.*, (2003) encontraram na variedade *valência* um teor de hesperidina igual a 76.61 mg/L, sendo que a mesma variedade neste estudo conteve um valor superior deste constituinte (203.9 mg/L)

Atividade antioxidante dos extratos de carotenóides totais e flavanonas

Para os extratos de carotenóides, as variedades *lima* e *valência* obtiveram uma atividade antioxidante inferior ($p \leq 0.05$) que a variedade *pêra* (Figura 2), mesmo apresentando um teor de carotenóides superior. Isso porque o teor de carotenóides totais foi calculado em relação ao β -caroteno apenas, e no extrato isolado de cada variedade há diferentes estruturas de carotenóides, e essas estruturas influenciam a atividade antioxidante da fruta.

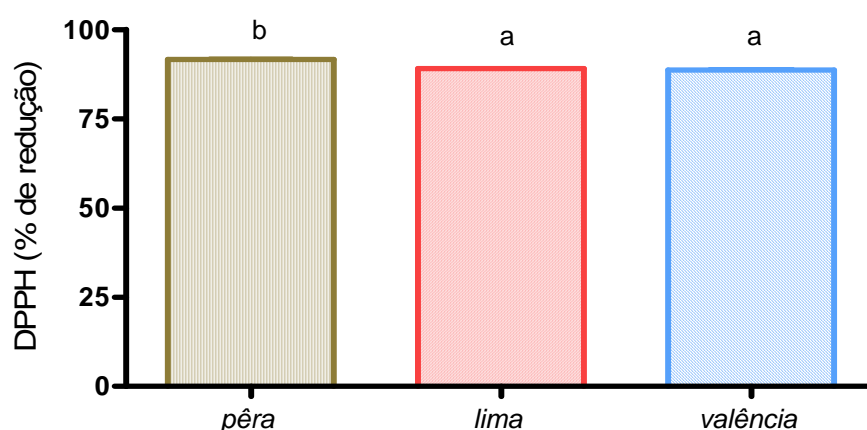


Figura 2: Capacidade antioxidante (% de redução) via radical livre DPPH* dos extratos de carotenóides totais das variedades de laranjas. Os valores representam médias de três lotes \pm SD. Colunas com diferentes letras são significativamente diferentes no teste de Tukey ($p \leq 0.05$).

Já para os extratos das flavanonas isoladas das frutas pode-se observar na figura 3 que as variedades *lima* e *valência* apresentaram uma atividade antioxidante maior ($p \leq 0.05$) que a *pêra* e no entanto, a *pêra* conteve o maior teor de hesperidina.

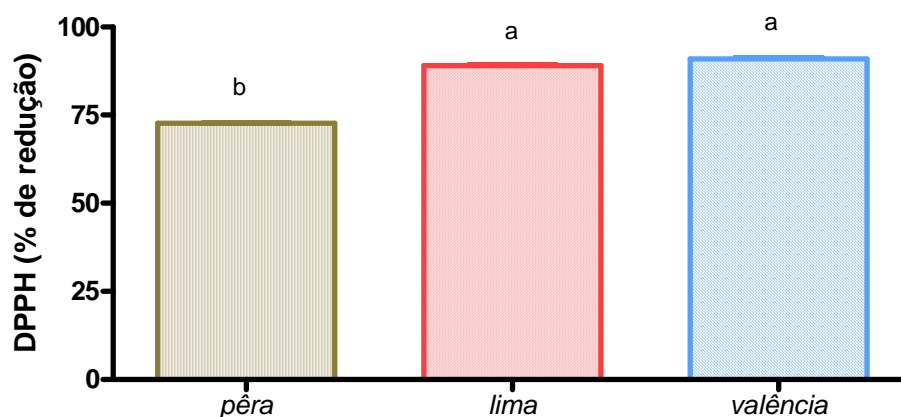


Figura 3: Capacidade antioxidante (% de redução) via radical livre DPPH* dos extratos de flavanonas das variedades de laranjas. Os valores representam médias de três lotes \pm SD. Colunas com diferentes letras são significativamente diferentes no teste de Tukey ($p \leq 0.05$).

Se observarmos as Figuras 4, 5 e 6, onde estão apresentados os cromatogramas das variedades *pêra*, *lima* e *valência*, respectivamente, podemos notar que aparece em cada um deles a presença de mais de um pico, além do pico da hesperidina, com característica de flavanona, confirmada pelos espectros da Figura 8. Essa flavanona é, provavelmente, a narirutina, pois também foi uma flavanona encontrada por Mouly *et al.*, (1998) em laranja *valência* e por Xu *et al.*, (2008) em diversas variedades de frutas cítricas cultivadas na China. Sendo assim, pode ser que esta flavanona não identificada em nossos estudos esteja influenciando na atividade antioxidante das frutas.

Logo, a eficácia da ação antioxidante de uma fruta depende da estrutura química e da concentração dos componentes bioativos presentes na fruta, uma vez que a posição e o número de hidroxilas presentes na estrutura é um fator relevante para a atividade antioxidante. Este comportamento nos indica que não é possível afirmar a atividade antioxidante de uma fruta ou extrato sem conhecer e quantificar seus componentes isoladamente.

Quando se compara a contribuição dos dois diferentes extratos na atividade antioxidante das frutas em questão, percebe-se que esta depende da característica de cada fruta e que não se pode generalizar. Os dois diferentes extratos da variedade *lima* apresentaram a mesma atividade antioxidante, enquanto que o extrato de carotenóides para a variedade *pêra* apresentou uma atividade antioxidante superior que o extrato de flavanonas. Já para a variedade *valência*, a atividade antioxidante foi maior para o extrato de flavanonas.

Com esses resultados não podemos afirmar que os carotenóides totais contribuem para uma atividade antioxidante maior ou menor do que as flavanonas presentes nas variedades de laranjas. Podemos dizer de um modo geral, que é relativamente alta a contribuição dos dois extratos nas variedades de *lima* e *valência*, enquanto que para a variedade *pêra* a contribuição do extrato de carotenóides totais é menor.

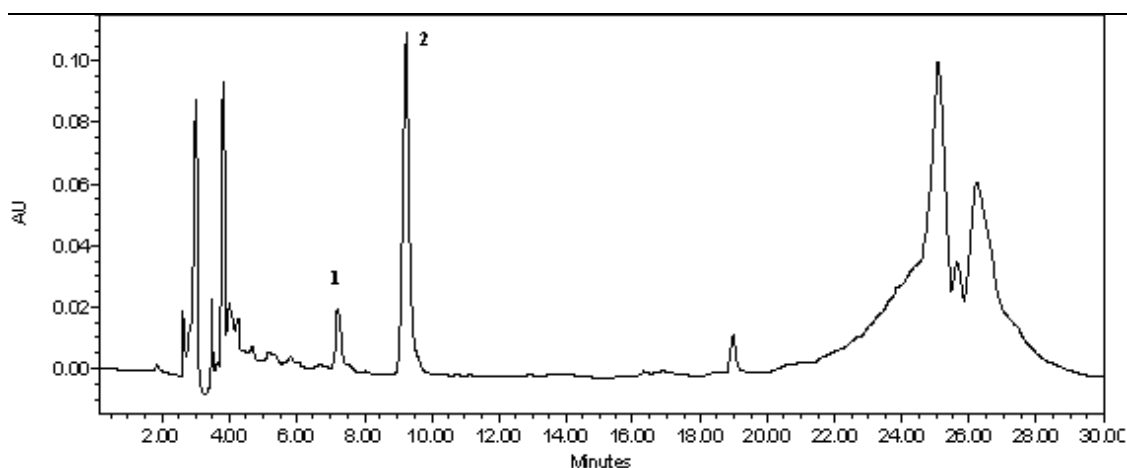


Figura 4: Cromatograma característico obtido por CLAE das flavanonas da variedade laranja *pêra*, nas condições cromatográficas descritas no texto.

Identificação dos picos: 1-não identificado e 2-hesperidina.

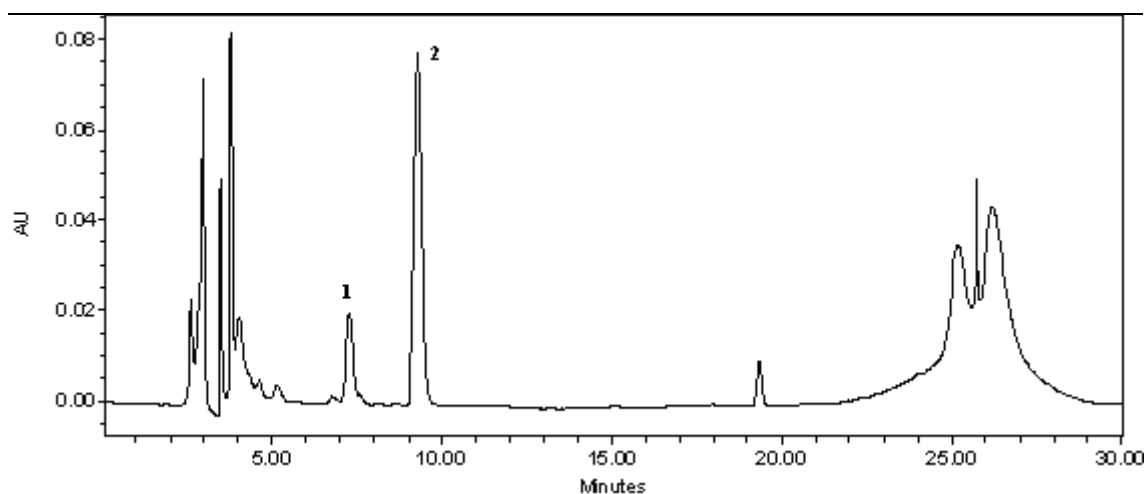


Figura 5: Cromatograma característico obtido por CLAE das flavanonas da variedade laranja *lima*, nas condições cromatográficas descritas no texto.

Identificação dos picos: 1-não identificado e 2-hesperidina.

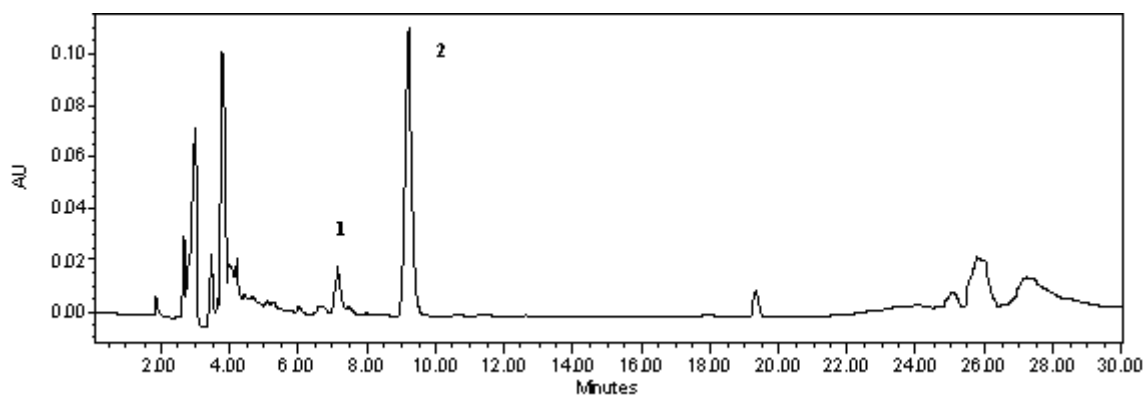


Figura 6: Cromatograma característico obtido por CLAE das flavanonas da variedade laranja *valência*, nas condições cromatográficas descritas no texto.

Identificação dos picos: 1-não identificado e 2-hesperidina.

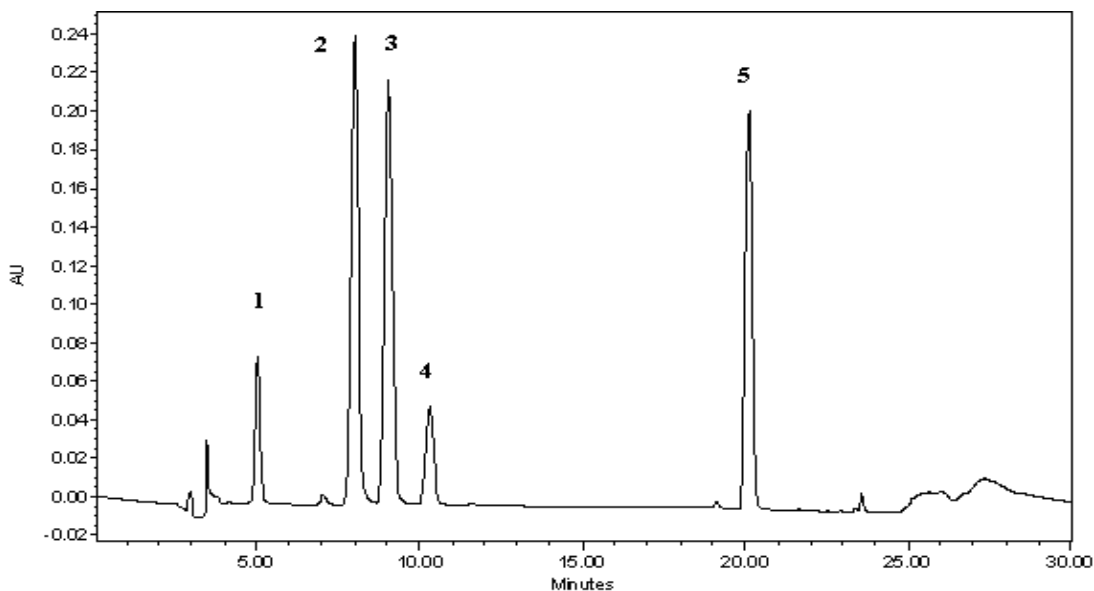


Figura 7: Cromatograma característico obtido por CLAE dos padrões das flavanonas, nas condições cromatográficas descritas no texto. Identificação dos picos: 1-eriocitrina; 2-naringina; 3-hesperidina; 4-neohesperidina e 5-poncirina.

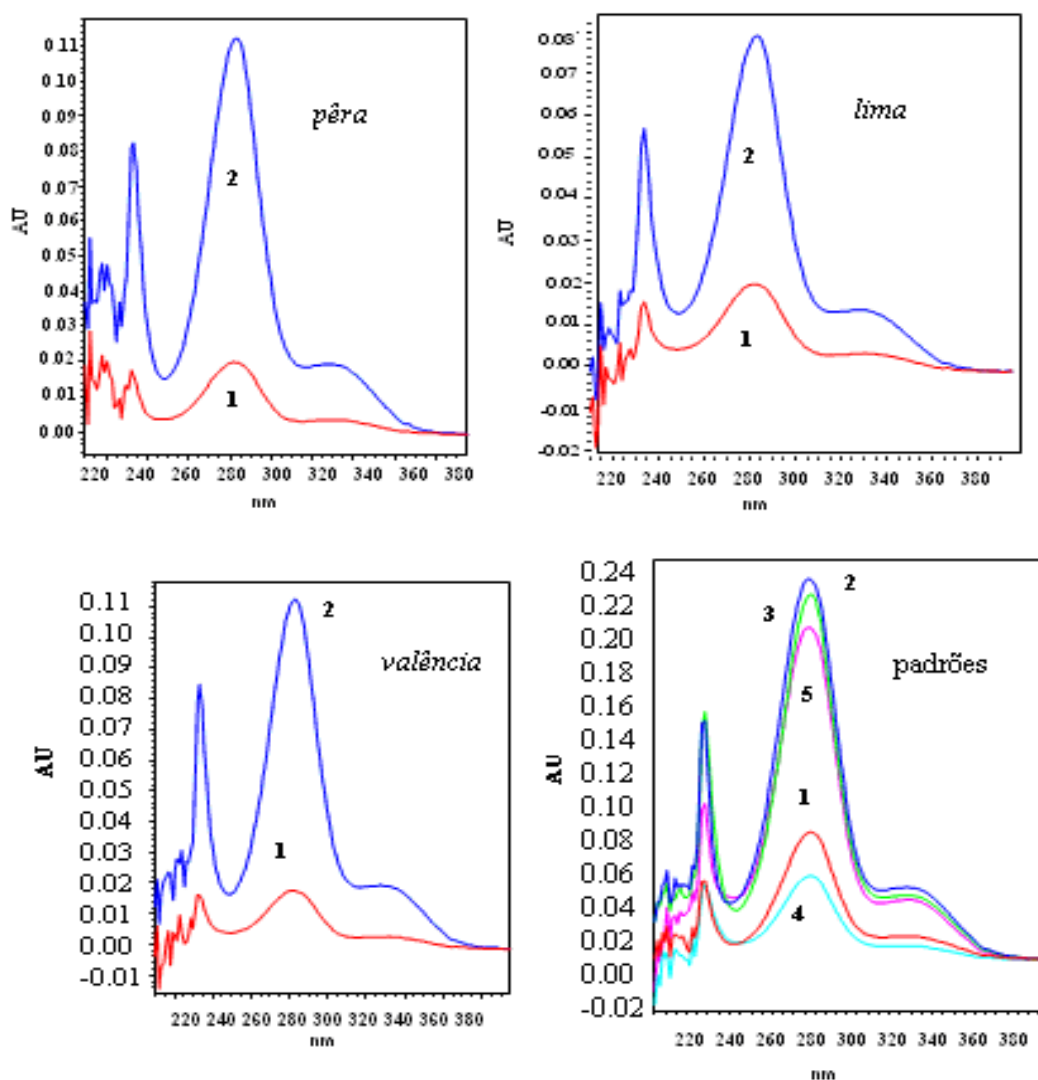


Figura 8: Espectros de absorvância fornecidos pelo detector por arranjo de fotodiodos das flavanonas para as variedades de laranja *pêra*, *lima*, *valência* e padrões, respectivamente, nas condições cromatográficas descritas no texto.

Conclusão

Com os resultados obtidos das análises das três variedades de laranjas, pode-se concluir que variedade *valência* obteve um conteúdo de carotenóides totais superior ($p \leq 0.05$) que às demais e a variedade *pêra* apresentou o maior teor de hesperidina. A contribuição do extrato de carotenóides e flavanonas na atividade antioxidante da fruta pode variar de uma variedade de fruta para outra.

Referências

- ABECITRUS – Associação Brasileira dos Exportadores de Cítricos. Disponível em http://www.abecitrus.com.br/industria_br.html, acessado em outubro de 2008.
- ARIAS, R.; LEE, T.C.; LOGENDRA, L.; JANES, H. Correlation of lycopene measured by HPLC with the L*, a*, b* color readings of a hydroponic tomato and the relationship of maturity with color and lycopene content. **J. Agric. Food Chem.**, v.48, p.1697-1702, 2000
- BENAVENTI-GARCIA, O.; CASTILLO, J.; MARIN, F. R.; ORTUÑO, A.; DEL RÍO, J. A. Uses and properties of *Citrus* Flavonoids. **J. Agric. Food Chem.**, v.45, n. 12, p. 4505-4515, 1997.
- BOCCO, A.; CUVELIER, M. E.; RICHARD, H.; BERSET, C. Antioxidant activity and phenolic composition of citrus peel and seed extracts. **J. Agric. Food Chem.**, v. 46, p. 2123-2129, 1998.
- BURRI, B. J. Beta-carotene and human health: a review of current research. **Nutr. Res.**, v.17, p.547-580, 1997.
- PALACE, V. P.; KHAPER, N.; QIN, Q.; SINGAL, P. K. Antioxidant potentials of vitamin a and carotenoids and their relevance to heart disease. **Free Radical Biol. Med.**, v.26, p.746-761, 1999.
- CALABRÒ, M. L.;GALTIERI, V.; CUTRONEO, P.; TOMMASINI,S.; FICARRA, P., FICARRA, R. Study of the extraction procedure by experimental design and validation of a LC method for determination of flavonoids in Citrus bergamia juice. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v.35, p.349-363, 2004.
- CLYDESDALE, F. M. Color measurement. In: GRUENWEDEL, D. W; WHITAKER, J. P. **Food Analysis: Principles and Techniques**. v. 1, New York: Marcel Dekker Inc., p. 95-150, 1984.
- DE ANCOS, B.; SGROPPO, S.; PLAZA, L.; CANO, M. P. Possible nutritional and health-related value promotion in orange juice preserved by high-pressure treatment. **J. Sci. Food Agric.**, v. 82, p.790–796, 2002.
- BRAND-WILLIAMS W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensm Wiss Technol.**, v. 28, p. 25-30, 1995.

- CAMARDA, L.; DI STEFANO, V.; DEL BOSCO, S. F.; SCHILLACI, D. Antiproliferative activity of *Citrus* juices and HPLC evaluation of their flavonóide composition. **Fitoterapia.**, v. 78, p. 426-429, 2007.
- COTELLE, N.; BERNIER, J. L.; CATTEAU, J. P.; POMMERY, J.; WALLET, J. C.; GAYDOU, E. M. Antioxidant properties of hydroxyl-flavones. **Free Radical Biol. Med.**, v.20, p.35–43, 1996.
- DEL RÍO, J. A.; FUSTER, M. D.; GÓMEZ, P.; PORRAS, I.; GARCÍA-LIDÓN, A.; ORTUÑO, A. *Citrus limon*: a source of flavonoids of pharmaceutical interest. **Food Chem.**, v. 84, p. 457-461, 2004.
- DI CARLO, G.; MASCOLO, N.; IZZO, A. A.; CAPASSO, F. Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. **Life Sci.**, v.65, p. 337-353, 1999
- EDWARDS, D. J.; BERNIER, S. M. Naringina and naringenin are not the primary CYP3A inhibitors in *grapefruit* juice. **Life Sci.**, v. 59, n. 13, p. 1025-1030, 1996.
- FORMICA, J. V.; REGELSON, W. Review of the biology of quercetina and related bioflavonoids. **Food Chem. Toxic.**, v.33, p.1061-1080, 1995.
- GIOVANNUCCI, E. Tomatoes, tomato-based products, lycopene and cancer: a review of the epidemiological literature. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 91, p. 317–331, 1999.
- GROSS, J. Pigments in fruits. London: Academic Press, 1987.
- HERTOG, M. G. L.; FESKEENS, E. J. M.; HOLLMAN, C. H.; KATAN, M. B.; KROMHOUT, D. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: de Zutphen elderly study. **Lancet**, v.342, p.1007-1011, 1993.
- HOLLMAN, P. C. H.; HERTOG, M. G. L.; KATAN, M. B. Analysis and health effects of flavonoids. **Food Chem.**, v.57, p. 43-46, 1996.
- KAWAII, S.; TOMONO, Y.; KATASE, E.; OGAWA, K.; YANO, M. HL-60 differentiating activity and flavonoid content of the readily extractable fraction prepared from *Citrus* juices. **J. Agric. Food Chem.**, v. 47, p. 128-135, 1999.
- KRITCHEVSKY, S. B. b-Carotene, carotenoids and the prevention of coronary heart disease. **J. Nutr.**, v. 129, p. 5–8, 1999.
- LANDRUM, J. T.; BONE, R. A. (2001). Lutein, Zeaxantin and the Macular Pigment. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 385, p. 28–40, 2001.

- LARRAURI, J. A.; RUPÉREZ, P.; BRAVO, L.; SAURA-CALIXTO, F. High dietary fibre powders from orange and lime peels: associated polyphenols and antioxidant capacity. **Food Res. Int.**, v. 29, p. 757-762, 1996.
- LIMA, V. L. A. G.; MÉLO, E. A.; MACIEL, M. I. S.; PRAZERES, F. G.; MUSSER, R. S.; LIMA, D. E. S. Total phenolic and carotenoid contents in acerola genotypes harvested at three ripening stages. **Food Chem.**, v.90, p.565-568, 2005.
- MELÉNDEZ-MARTÍNEZ, A. J., VICARIO, I. M., HEREDIA, F. J. Instrumental measurement of Orange juice colour: a review. **J. Sci. Food Agric.**, v. 85, p. 894-901, 2005.
- MIDDLETON, E.; KANDASWAMI, C. The impact of plant flavonoids on mammalian biology: implications for immunity, inflammation and cancer. *The Flavonoids: Advances in Research Since 1986*. London: Chapman & Hall, 1994. p. 619-652.
- OLIVEIRA, A. P. V. Caracterização sensorial de sobremesas lácteas de chocolate empregando Perfil Livre e Mapa de Preferência Interno e medidas de cor e textura. 2002. Dissertação (Mestre em Ciência de Alimentos) – Departamento de Tecnologia de Alimentos e Medicamentos, Universidade Estadual de Londrina, Londrina.
- OLIVEIRA, A. P. V.; FRASSON, K.; YAMASHITA, F. & BENASSI, M. T. Medida Instrumental de cor em sobremesas lácteas de chocolate: uma técnica de baixo custo e versátil utilizando câmara digital. **Braz. J. Food Technol.**, v.6, n. 2, p. 191-196, 2003
- RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. 1999. A guide for carotenoid analysis in foods. Washington, DC: International Life Sciences Institute Press, 59.
- RODRIGUEZ-AMAYA, D. **A guide to carotenoids analysis in foods**. Washington: International life sciences institute press, p.64, 2001.
- SÁNCHEZ-MORENO, C; PLAZA, L; ANCOS, B; CANO, M. P. Quantitative bioactive compounds assessment and their relative contribution to the antioxidant capacity of commercial orange juices. **J. Sci. Food Agric.**, v. 83, p. 430-439, 2003.
- SIVAM, G. Analysis of flavonoids. *Methods of analysis for functional foods and nutraceuticals*. Ed. W. J. Hurst. Cap.9, 2002, p.350.

- SLATERRY, M. L.; BENSON, J.; CURTIN, K.; KHE-NI-MA, SCHAEFFER, D.; POTTER, J. D. Carotenoids and vitamin A. **Am. J. Clin. Nutr.**, v.71, p.575–582, 2000.
- STAVRIC, B. Antimutagens and anticarcinogens in foods. **Food Chem. Toxicol.**, v. 32, p. 79–90, 1993.
- TEMPLE, N. J. Antioxidants and disease: more questions than answers. **Nutr. Res.**, v. 20 n. 3, p. 449–459, 2000.
- TIBBLE, D. L. Further evidence of the cardiovascular benefits of diet enriched in carotenoids. **Am. J. Clin. Nutr.**, v.68, p. 521–522, 1999.
- XU, G.; LIU, D.; CHEN, J.; YE, X.; MA, Y.; SHI, J. Juice components and antioxidant capacity of citrus varieties cultivated in China. **Food Chem.**, v.106, p.545-551, 2008.
- YAMAGUCHI, T.; TAKAMURA, H.; MATOBA, T.; TERAQ, J. HPLC method for evaluation of the free radical-scavenging activity of foods by using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, v.62, p.1201-1204, 1998.
- WATADA, A. E.; ABE, K.; YAMAUCHI, N. Physiological activities of partially processed fruits and vegetables. **Food Technol.**, v.116, p.120-122, 1990.
- WANG, Y.; Chuang, Y.; Ku, Y. Quantitation of bioactive compounds in citrus fruit cultivated in Taiwan. **Food Chem.**, v. 102, p. 1163-1171, 2007.

CAPÍTULO 5

QUANTIFICAÇÃO DE FLAVANONAS E DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE, VIA RADICAL LIVRE DPPH[•], DOS EXTRATOS DE CAROTENÓIDES TOTAIS E FLAVANONAS EM ALGUMAS VARIETADES DE FRUTAS CÍTRICAS CULTIVADAS NO BRASIL

Resumo

Foram avaliados os parâmetros de CIELab, o teor de carotenóides totais (β -caroteno $\mu\text{g/mL}$) e cinco diferentes flavanonas em quatro variedades de frutas cítricas, incluindo duas variedades de tangerinas, uma de tangor e uma variedade de limão. Os extratos de carotenóides e flavanonas também foram avaliados quanto aos seus potenciais de seqüestro de radicais livres (DPPH $^{\bullet}$). As duas variedades de tangerinas apresentaram a coloração mais amarela e também mais vermelha que as demais variedades. O teor de carotenóides totais foi maior para a variedade de tangerina *poncã*. A hesperidina foi a única flavanona avaliada encontrada em todas as variedades analisadas e a eriocitrina foi encontrada apenas na variedade limão. O extrato de carotenóides das variedades tangor *murcote* e tangerina *poncã* apresentaram maior atividade antioxidante, enquanto que o extratos de flavanonas das variedades de tangerinas não apresentaram diferença significativa em seus valores.

Palavras chaves: Frutas cítricas; Cor; Flavanonas; Carotenóides e DPPH $^{\bullet}$

Introdução

As tangerinas representam cerca de 23% da produção mundial de citros e a tendência é continuar em expansão visto que sua produção aumentou 24% se comparadas as safras 2007/08 (16 milhões de t) e 2003/04 (13 milhões toneladas) (FAS, 2008). Os maiores produtores são China, Espanha e Japão sendo a Espanha responsável por mais da metade (58% em 2007/08) de toda a exportação mundial de tangerinas (FAS, 2008).

Segundo dados do IBGE, o Brasil vem apresentando acréscimo em volumes produzidos desta fruta. Em 2006, o país detinha cerca de 60 mil hectares de área plantada com tangerina onde 1,2 milhão de toneladas foram produzidas, correspondendo a 13% de acréscimo em relação a 2001, ficando em sétimo lugar no ranking da produção brasileira de frutas (IBGE, 2006). A produção de tangerina brasileira é concentrada nos estados de São Paulo, Paraná, Rio Grande do Sul e Minas Gerais que somam 84% da área total plantada no País perfazendo a 90% da produção brasileira sendo São Paulo o principal produtor, que segundo o IBGE (2008), responde por 35% da produção nacional.

Nos últimos anos, o limão *tahiti* se tornou uma das mais importantes frutas com um padrão de qualidade para exportação. As estatísticas de seu desenvolvimento demonstram a importância econômica que vem adquirindo entre as frutas de mesa. A quantidade de limão exportada pelo Brasil, no período 1998 a 2007, cresceu 2.431%, atingindo a marca de 58.250 toneladas. No ranking de exportações brasileiras de frutas em 2007, quanto ao valor de exportação, o limão ficou em sexto lugar atrás de uva, melão, manga, maçã e banana. Quanto ao destino, a Holanda é o principal mercado da fruta brasileira, respondendo por

aproximadamente 63,5% da totalidade exportada em 2007 (http://www.todafruta.com.br/todafruta/mostra_conteudo.asp?conteudo=18875).

As frutas cítricas contêm uma série de constituintes bioativos que contribuem para a saúde, dentre eles destacam-se os flavonóides que apresentam uma vasta gama de efeitos biológicos, tais como a proteção contra doença cardíaca coronária, anti-inflamatórias, antioxidante, vascular, estrogênicas, citotóxica antitumoral, e atividade antimicrobiana. As flavanonas constituem o subgrupo mais abundante nos sucos cítricos e cada espécie de fruta cítrica se caracteriza por um modelo particular de flavanonas glicosídicas, que variam nos diferentes estádios de maturação da fruta (BENAVENTE *et al.*, 1993; ORTUÑO *et al.*, 1997).

Cerca de 115 diferentes carotenóides foram relatados nas frutas cítricas (STEWART e WHEATON, 1973). Estudos têm demonstrado que uma elevada ingestão de carotenóides pode diminuir o risco de câncer, a degeneração macular relacionadas com a idade, a catarata, queimaduras solares, bem como as doenças cardiovasculares (AUST *et al.*, 2001). A principal atividade antioxidante dos carotenóides é a desativação do oxigênio singlete, que pode se dar de duas formas: pela transferência física da energia de excitação do oxigênio singlete para o carotenóide e pela reação química do carotenóide com o oxigênio singlete (BURRI, 1997; PALACE *et al.*, 1999).

Vários métodos são utilizados para determinar a atividade antioxidante em extratos e substâncias isoladas; um dos mais usados consiste em avaliar a atividade seqüestradora do radical livre 1,1-difenil-2-picril-hidrazila (DPPH[•]), de coloração púrpura que absorve a 515 nm (ROGINSKY and LISSI, 2005). Por ação de um antioxidante (AH) ou uma espécie radicalar (R[•]), o DPPH[•] é reduzido

formando difenil-picril-hidrazina, de coloração amarela, com conseqüente desaparecimento da absorção, podendo a mesma ser monitorada pelo decréscimo da absorbância. A partir dos resultados obtidos determina-se a porcentagem de atividade antioxidante ou seqüestradora de radicais livres e/ou a porcentagem de DPPH^{*} remanescente no meio reacional (BRAND-WILLIAMS *et al.*, 1995; SÁNCHEZ-MORENO *et al.*, 1998).

Estudos recentes têm demonstrado que não só o valor nutricional é de fundamental importância para a determinação da qualidade dos alimentos, mas também a cor é muito importante por causa dos estímulos visuais (LIMA *et al.*, 2005). O USDA (*United States Department of Agriculture*) considera a cor equivalente ao sabor no seu sistema de avaliação da qualidade, indicando a importância da qualidade comercial de produtos cítricos (KIMBALL, 1991).

No sistema CIELAB, a cor é descrita por um diagrama tridimensional, onde o espaço é definido pelas coordenadas retangulares (L*, a*, b*) e a comparação entre duas cores (ΔE) pode ser calculada matematicamente. L*, é a luminosidade, varia de 0 a 100, em que o valor 0 indica o preto e o 100, o branco. O valor a* define o componente vermelho-verde, variando do vermelho (+a*), localizado de 0° ou 360°, ao verde (-a*), que está a 180° (na ausência dos componentes amarelo ou azul). O valor b* define o componente amarelo-azul, na ausência dos componentes verde ou vermelho, variando do amarelo (+b*) ao azul (-b*), localizados a 90° e 270°. Os parâmetros croma ($C^* = (a^{*2} + b^{*2})^{1/2}$) e tonalidade cromática ($H^* = \text{arc tang}(b^*/a^*)$) são coordenadas cilíndricas do mesmo espaço. O H* mostra a localização da cor em um diagrama, aonde o ângulo 0° representa vermelho puro, o 90° o amarelo puro, o 180° o verde puro e o 270° o azul puro. O croma é definido pela distância de H* ao centro do diagrama

tridimensional, sendo o 0 no centro e aumentando de acordo com a distância (CLYDESDALE, 1984; LAWLESS e HEYMANN, 1999; OLIVEIRA, 2002).

Visto a importância das frutas cítricas para a saúde, o objetivo deste trabalho foi quantificar os teores de carotenóides totais e as principais flavanonas em algumas variedades de frutas cítricas, bem como avaliar a atividade antioxidante destes extratos via radical livre DPPH[•].

Material e métodos

Reagentes

Os solventes utilizados neste estudo foram obtidos da Sigma-Aldrich (1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl), Quemis (methanol e acetone), BioChemika-Fluka (eriocitrina, poncirina, neohesperidina) e Mallinckrodt, J. T. Baker (naringina e hesperidina).

Amostras

Três lotes de quatro variedades de frutas cítricas (tangor murcote (*Citrus reticulata* Blanc x *Citrus sinensis* L.Osbeck), tangerina poncã (*C. poonensis* Hort.ex Tanaka), tangerina cravo (*Citrus reticulata* Blanco) e limão tahiti (*Citrus aurantifolia* Swing var. *Taiti*)) cultivadas no Brasil foram estudadas. As frutas foram adquiridas em supermercados e indústria da região Araraquara e São Carlos (São Paulo, Brasil). Cada lote continha em média 12 frutas, sendo estas escolhidas aleatoriamente, independentes do grau de maturação.

O suco das frutas foi obtido usando um extrator manual e em seguida avaliado o índice de maturidade (sólidos solúveis/acidez total titulável) das frutas,

onde para a tangerina *murcote* o valor encontrado foi de 12.44, para a tangerina *poncã* 20.86, para a tangerina *cravo* 11.15 e para o limão *tahiti* 7.19.

Medida da cor

Foi realizada segundo os parâmetros de CIELab, sendo os valores de L^* (luminosidade), a^* (índice de saturação vermelho) e b^* (índice de saturação amarelo) obtidos após leitura das amostras em colorímetroespectrofotômetro Hunter (Color Quest II Sphere, CQII/UNI 1200) em reflectância, em um ângulo de 10° e iluminante D65. Os valores de L^* , a^* e b^* matematicamente combinados permitem calcular as razões a^*/b^* e $(a^*/b^*)^2$. O ângulo hue e Chroma foram calculados segundo as equações (ARIAS *et al.*, 2000):

$$\text{hue} = \tan^{-1} (b^*/a^*), \text{ quando } a^* > 0 \text{ e } b^* \geq 0$$

$$\text{hue} = 180 + \tan^{-1} (b^*/a^*), \text{ quando } a^* < 0$$

$$\text{Chroma} = (a^{*2} + b^{*2})^{1/2}$$

Determinação de carotenóides totais

Os carotenóides foram extraídos com acetona fria, os pigmentos transferidos para éter de petróleo, saponificados com KOH metanólico por 16 horas. O extrato foi diluído com éter de petróleo e a leitura da absorbância da solução foi realizada a 450 nm. O teor de carotenóides totais foi expresso em termos de β -caroteno, ($A_{1\text{cm}}^{1\%}$ de 2592, em éter de petróleo), aplicando-se a Lei de Beer (RODRIGUEZ-AMAYA, 1998).

Determinação das flavanonas glicosídicas (FGs)

Realizou-se a extração das flavanonas de acordo com BOCCO *et al.*, (1998). Partiu-se de 3,0 mL de suco, sendo este misturado com 5,0 mL de metanol e agitado em um vórtex por 2 minutos, seguido de aquecimento à 55°C por 15 minutos e centrifugação a 3150 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi recolhido e todo procedimento foi repetido mais duas vezes. Os extratos metanólicos foram misturados e evaporados em banho-maria à 50°C sob fluxo de nitrogênio, sendo levados a um volume final de 10 mL com metanol.

A coluna empregada na separação das cinco flavanonas foi de C₁₈ Shimadzu Shim-pack CLC-ODS (M) (4,6 x 250 mm, 5µm) e como fase móvel, a mistura acetonitrila: água: ácido acético (21:75:4) (v/v/v) com vazão de 1,0 mL/min com detector por arranjo de fotodiodos (DAD) Waters 996. O tempo de corrida foi de 30 minutos e a detecção realizada a 280 nm. O gradiente da fase móvel está apresentado na Tabela 1.

Todos os solventes utilizados foram previamente filtrados em sistema Millipore de filtração à vácuo com membrana filtrante Nylon 66 para solvente orgânico de 0,45 µm (Schleicher & Schuell RC-L 55).

A identificação das flavanonas foi feita pela comparação dos tempos de retenção e dos espectros obtidos pelo detector por arranjo de fotodiodos (DAD) das amostras com os dos respectivos padrões entre 200 e 450nm.

Table I: Perfil do gradiente usado no CLAE para a identificação das flavanonas contidas nas variedades de laranjas.

Time (min)	Característica de eluição			
	0	10	20	25 ^a
% of A ^b	8	34	70	0
% of B ^c	92	66	30	100

^atempo de equilíbrio, 5min

^bsolvente A, acetonitrila

^cSolvente B, água-ácido acético (96:4 v/v)

*Determinação da atividade antioxidante dos extratos de carotenóides totais e flavanonas pelo método de DPPH**

O procedimento aplicado foi de acordo com BRAND-WILLIAMS *et al.*, (1995), com algumas variações. Uma alíquota (0,1 mL) do extratos de cada fruta (carotenóides totais e flavanonas) foi adicionada a 2,46 mL da solução metanólica de DPPH* (0,025 g/L) e a mistura permaneceu no escuro por 30 min. A absorbância foi medida a 515 nm (cada medida foi repetida três vezes), sendo que a da solução metanólica de DPPH* foi medida inicialmente. Os resultados foram expressos como porcentagem de redução da absorbância da mistura em relação à absorbância da solução metanólica de DPPH*.

Análise estatística

A análise estatística dos resultados foi realizada através de análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida pelo teste de Tukey. As diferenças que

apresentaram níveis de probabilidade menores e iguais a 5% ($p \leq 0,05$) foram consideradas estatisticamente significativas.

Resultados e discussão

Medida da cor

Na Figura 1 estão representados os valores de L^* (luminosidade), a^* (vermelho-verde), b^* (amarelo-azul), C^* (chroma) e o h (Hue), valores estes que representam os parâmetros de cor CIELab. Todas as quatro variedades de frutas cítricas avaliadas apresentaram valores do parâmetro L^* (Luminosidade) muito próximos, valores estes que se encontram entre o 30 e o 45. O parâmetro a^* forneceu um valor negativo apenas para a variedade limão *tahiti*, indicando que o suco desta fruta apresentou uma coloração mais esverdeada, enquanto que as demais variedades apresentaram valores positivos de a^* com ênfase para as variedades *poncã* e *cravo*, indicando uma coloração avermelhada. Os valores referentes ao parâmetro b^* foram positivos para todas as variedades, no entanto os valores das variedades *poncã* e *cravo* se destacaram o que indica a presença da coloração mais amarelada destes sucos. O parâmetro h mostra a localização da cor em um diagrama, aonde o ângulo 0° representa vermelho puro; o 90° , o amarelo puro; o 180° , o verde puro e o 270° , o azul puro. As frutas cítricas *poncã* e *cravo* apresentaram ângulo próximo a 75° (tonalidade levemente amarelada), a variedade tangor *murcote* próximo a 108° (tonalidade amarelada) e o limão *tahiti* próximo a 146° (tonalidade amarelo-esverdeado). O chroma é definido pela distância de h ao centro do diagrama tridimensional, sendo o 0 no centro e aumentando de acordo com a distância (CLYDESDALE, 1984; OLIVEIRA, 2002). Das quatro

variedades de frutas cítricas estudadas, os valores mais próximos de zero são os das variedades *murcote* e *tahiti*.

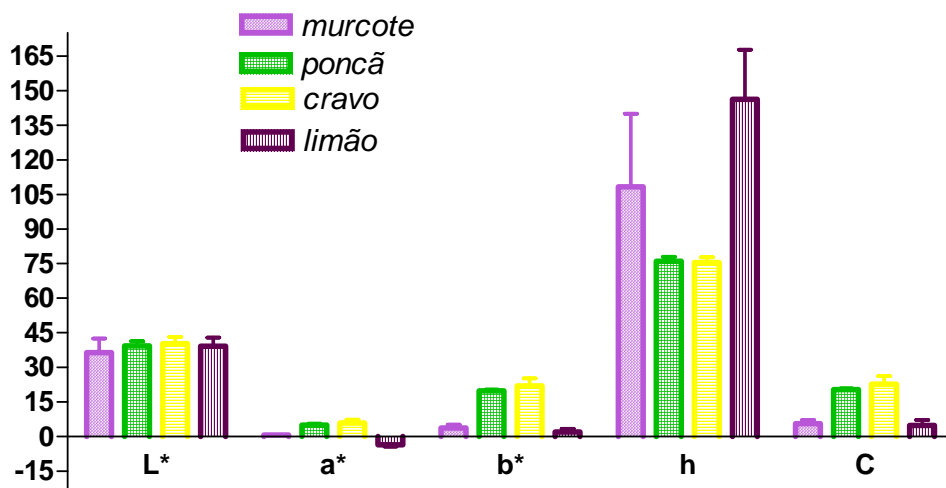


Figura 1: Valores de cor do sistema CIELAB para as quatro diferentes variedades de frutas cítricas. Os valores representam médias de três lotes \pm SD.

Com os resultados da cor do suco das frutas obtidos neste estudo, pode-se observar que os valores dos parâmetros b^* e C^* estão proporcionalmente ligados, pois as variedades que contiveram um valor menor do parâmetro b^* também apresentaram um valor menor do parâmetro C^* , enquanto que os parâmetros b^* e h ou/e C e h foram inversamente proporcionais.

Conteúdo de carotenóides totais

Os valores de carotenóides totais determinados nas três variedades de frutas cítricas diferiram em seus valores (Tabela 2), sendo que a variedade *poncã* obteve o maior teor de carotenóides totais ($7.67 \pm 1.29 \mu\text{g } \beta\text{-caroteno/mL}$) enquanto que a variedade *cravo* conteve o menor teor do constituinte ($5.28 \pm 0.16 \mu\text{g } \beta\text{-caroteno/mL}$). Xu *et al.*, (2008) encontraram em sete variedades de tangerinas

teores de carotenóides totais variando entre 2.92 ± 0.20 a 10.02 ± 0.02 mg β -caroteno/L, sendo que dentre essas variedades se encontra a poncã, variedade também analisada em nossos estudos, cujo teor do constituinte foi de 20.92 ± 0.20 mg β -caroteno/L, valor este inferior ao encontrado no suco desta no presente estudo.

São escassos os estudos e relatos sobre os teores e identificação de carotenóides totais e em variedades de tangerinas, e o que se sabe é que em alguns desses estudos, as tangerinas apresentaram um teor de carotenóides totais superior ao das laranjas (WANG *et al.*, 2007; XU *et al.*, 2008; DUZZIONI *et al.*, 2009), que são amplamente estudadas por todo o mundo. Isso se deve ao fato da pouca divulgação e demanda na comercialização nos mercados e indústrias produtoras e exportadoras de sucos.

Na sessão amostras, encontram-se os valores de ratio (sólidos solúveis/acidez total titulável) e podemos perceber uma relação entre esses valores e o teor de carotenóides totais, pois quanto maior o valor de ratio, maior também o teor de carotenóides totais presentes na fruta.

Conteúdo de flavanona glicosídicas (FGs)

Das cinco flavanonas (eriocitrina, naringina, hesperidina, neohesperidina e poncirina) avaliadas nas variedades de frutas cítricas (Tabela 2), naringina, neohesperidina e poncirina não foram detectadas em nenhuma das frutas cítricas em questão, sendo que a hesperidina esteve presente em todas as variedades estudadas e a eriocitrina apenas no limão *tahiti*.

Tabela 2: Conteúdo de flavanonas glicosídicas (mg/L) e carotenóides totais (μg β caroteno/mL) nas variedades de frutas cítricas^h.

	<i>murcote</i> (<i>Citrus reticulata</i> <i>Blanc x Citrus</i> <i>sinensis</i> <i>L.Osbeck</i>)	<i>poncã</i> (<i>C. poonensis</i> <i>Hort.ex Tanaka</i>)	<i>cravo</i> (<i>Citrus reticulata</i> <i>Blanco</i>)	<i>tahiti</i> (<i>Citrus</i> <i>aurantifolia</i> <i>Swing var.</i> <i>Taiti</i>)
Eriocitrina	nd ⁱ	nd	nd	111,1 \pm 0,1
Naringina	nd	nd	nd	
Hesperidina	85,7 \pm 1,2a	213,8 \pm 5,8b	435,4 \pm 16,8c	163,6 \pm 9,3d
Neohesperidina	nd	nd	nd	nd
Poncirina	nd	nd	nd	nd
Carotenóides totais (μg β caroteno/mL)	5,86 \pm 0,56a	7,67 \pm 1,29b	5,28 \pm 0,16c	nd

^hOs valores representam médias de três lotes \pm SD. Linhas com diferentes letras são significativamente diferentes no teste de Tukey ($p\leq 0,05$).

ⁱnão detectado

O teor de hesperidina encontrado nos citros variou de 85.7 \pm 1.2 a 435.4 \pm 16.8 mg/L. A variedade tangerina *cravo* apresentou o maior teor deste constituinte ($p\leq 0.05$) diferindo das demais variedades, enquanto que a variedade tangor *murcote* apresentou o menor teor ($p\leq 0.05$). Em sete variedades de tangerinas cultivadas na China (XU *et al.*, 2008), foi encontrado apenas a hesperidina e a narirutina, sendo que a naringina e a neohesperidina não foram detectadas. Os valores encontrados de hesperidina nas variedades variaram entre 304.46 \pm 5.89 e 501.44 \pm 6.73 mg/L, com exceção da tangerina *cravo*, estes valores estão acima dos valores encontrados em nossas variedades. Já para o limão *tahiti*, os mesmos autores encontraram um teor de hesperidina de 237.96 \pm 0.12mg/L, também acima do teor encontrado no nosso limão. Marín *et al.*, (2002) estudaram duas variedades de limão cultivadas na Espanha e encontraram duas flavanonas, a

eriocitrina e a hesperidina com teores variando de 81.5 ± 5 a 111 ± 12 mg/L e 104 ± 15 a 224 ± 20 mg/L respectivamente, estando de acordo com nossos resultados. No entanto alguns fatores tais como variedades de citros e grau de maturidade da fruta entre outros, podem causar estas divergências nos valores encontrados.

Atividade antioxidante dos extratos de carotenóides e flavanonas

Para os extratos de carotenóides, as variedades tanger *murcote* e *poncã* obtiveram uma atividade antioxidante superior ($p \leq 0.05$) ao da variedade *cravo* (Figura 2), lembrando que a variedade *cravo* apresentou um teor de carotenóides totais inferior as demais frutas (Tabela 2) e com isso obteve uma atividade antioxidante também inferior. Já para as duas demais variedades, não houve diferença significativa na atividade antioxidante, mesmo a variedade *poncã* apresentando um teor de carotenóides totais superior ao da variedade tanger *murcote*.

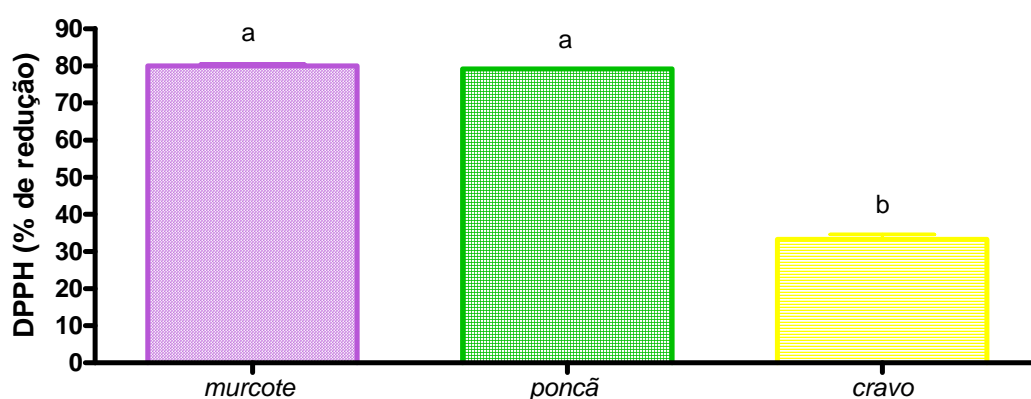


Figura 2: Capacidade antioxidante (% de redução) via radical livre DPPH* dos extratos de carotenóides totais das variedades de frutas cítricas. Os valores representam médias de três lotes \pm SD. Colunas com diferentes letras são significativamente diferentes no teste de Tukey ($p \leq 0.05$).

A atividade antioxidante dos extratos das flavanonas isoladas das frutas (Figura 3) foi maior para as variedades *poncã*, *cravo* e tangor *murcote*, enquanto que para o limão *tahiti* a atividade antioxidante foi significativamente inferior que as demais ($p \leq 0.05$).

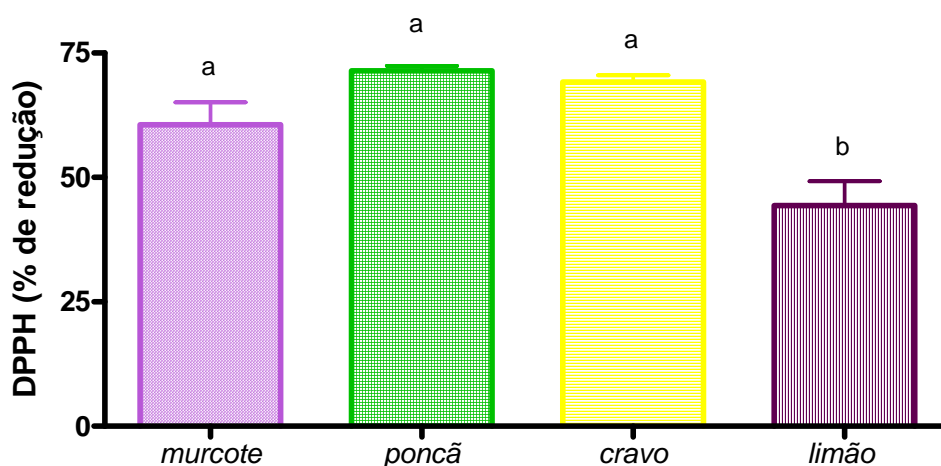


Figura 3: Capacidade antioxidante (% de redução) via radical livre DPPH* dos extratos de flavanonas das variedades de frutas cítricas. Os valores representam médias de três lotes \pm SD. Colunas com diferentes letras são significativamente diferentes no teste de Tukey ($p \leq 0.05$).

Todas as quatro variedades de frutas cítricas apresentaram a hesperidina, sendo que a *cravo* e a *poncã* contiveram teores superiores deste constituinte que as demais frutas (Tabela 2) e o limão *tahiti* que além de conter um teor de hesperidina superior ao da variedade tangor *murcote* também conteve a *eriocitrina*, apresentou a menor atividade antioxidante de todas as frutas estudadas. Se observarmos a Figura 4, podemos notar que das cinco diferentes flavanonas analisadas, a *eriocitrina* apresentou significativamente a maior atividade antioxidante que as demais e mesmo assim o limão *tahiti* não apresentou uma atividade antioxidante superior às demais variedades estudadas.

Esse comportamento se deve ao fato de que todas as variedades apresentaram, com exceção do *tahiti*, em seus cromatogramas um pico, não identificado, com característica de flavanona (Figura 5, 6, 7 e 8), sendo essa característica confirmada pelos espectros de cada variedade (Figura 11). No entanto, alguns autores em seus estudos confirmaram a presença da narirutina em diferentes variedades de tangerinas (XU *et al.*, 2008; PETERSON *et al.*, 2006; DHUIQUE-MAYER *et al.*, 2005), logo pode ser que esta flavanona não identificada em nossos estudos seja a narirutina e ainda que ela esteja influenciando na atividade antioxidante das frutas e por isso o limão *tahiti* que não conteve essa flavanona em nossos estudos, apresentou uma atividade antioxidante inferior que as demais variedades que apresentam a mesma. Outro fator importante também é o alto teor de acidez do suco do limão *tahiti*. Essa acidez pode ter afetado e contribuído para a degradação dos extratos das flavanonas no suco quando estes foram estocadas para posterior análise.

Para as variedades de frutas cítricas *poncã* e tangor *murcote*, o extratos de carotenóides totais apresentou uma atividade antioxidante superior ao extratos de flavanonas das mesmas, já para a variedade *cravo*, a porcentagem de redução do radical DPPH^{*} pelo extrato de flavanonas foi o dobro quando comparado a redução do radical pelo extrato de carotenóides totais. Com esses resultados obtidos, fica difícil afirmar que um ou outro constituinte bioativo colabore mais ou menos para a atividade antioxidante da frutas em geral, o que podemos confirmar simplesmente é a contribuição de cada extrato para cada fruta isoladamente.

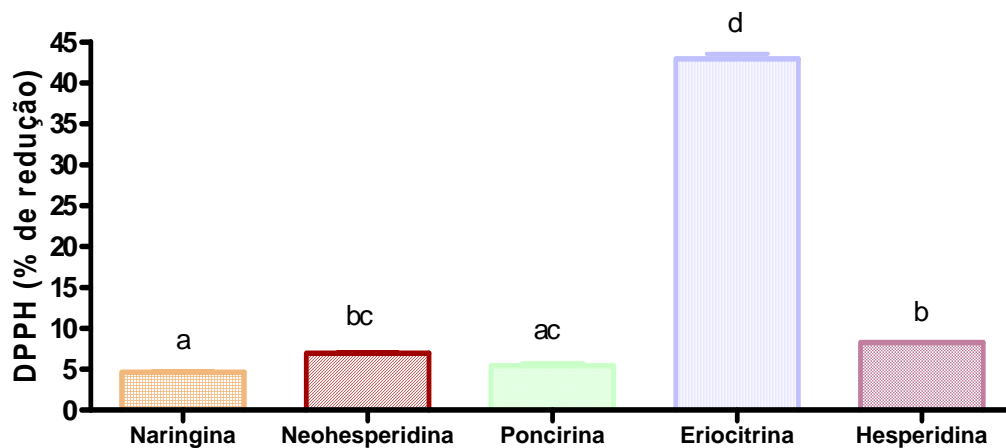


Figura 4: Capacidade antioxidante (% de redução) via radical livre DPPH^{*} de cinco diferentes padrões de flavanonas. Os valores representam médias de três lotes \pm SD. Colunas com diferentes letras são significativamente diferentes no teste de Tukey ($p \leq 0.05$).

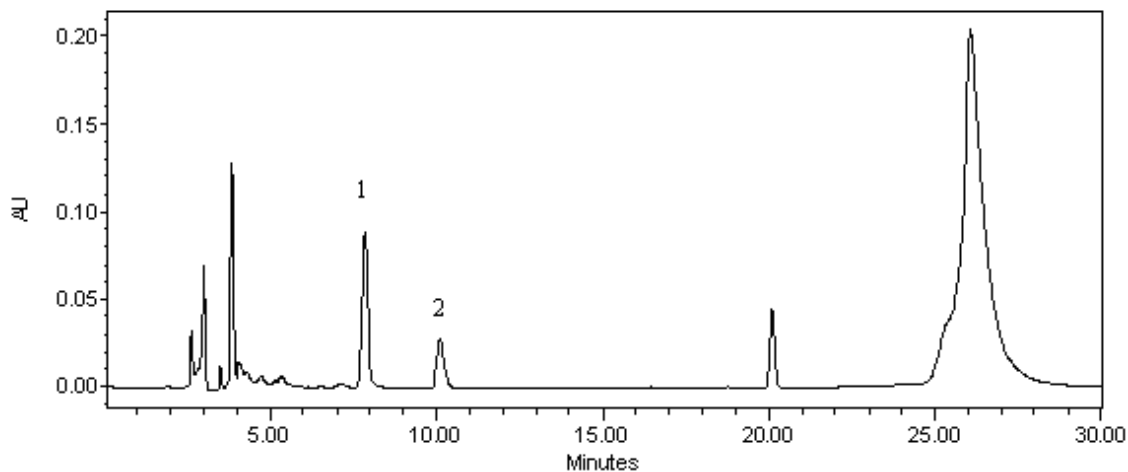


Figura 5: Cromatograma característico obtido por CLAE das flavanonas da variedade tangor *murcote*, nas condições cromatográficas descritas no texto.

Identificação dos picos: 1-não identificado e 2-hesperidina.

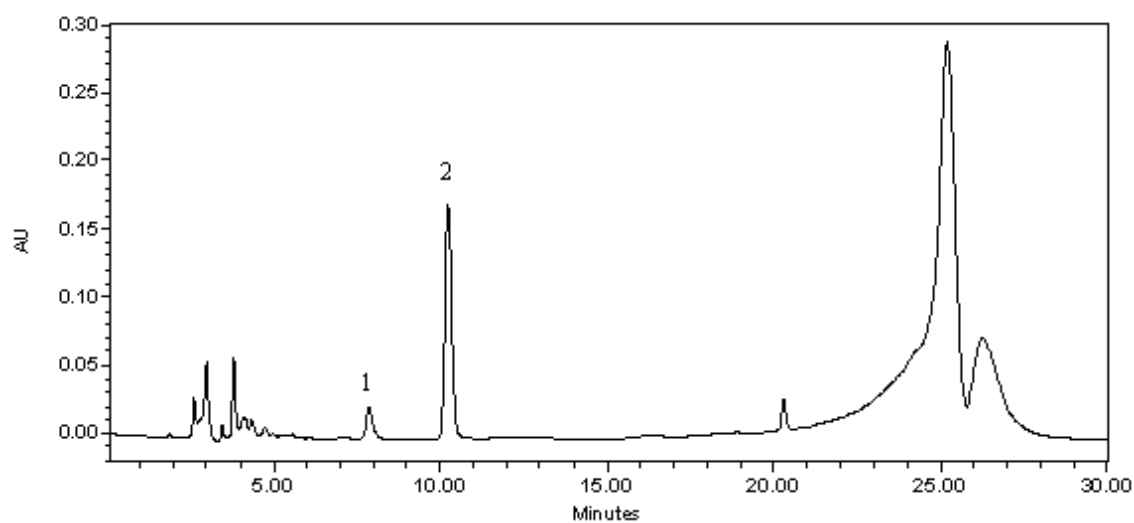


Figura 6: Cromatograma característico obtido por CLAE das flavanonas da variedade tangerina *poncã*, nas condições cromatográficas descritas no texto.

Identificação dos picos: 1-não identificado e 2-hesperidina.

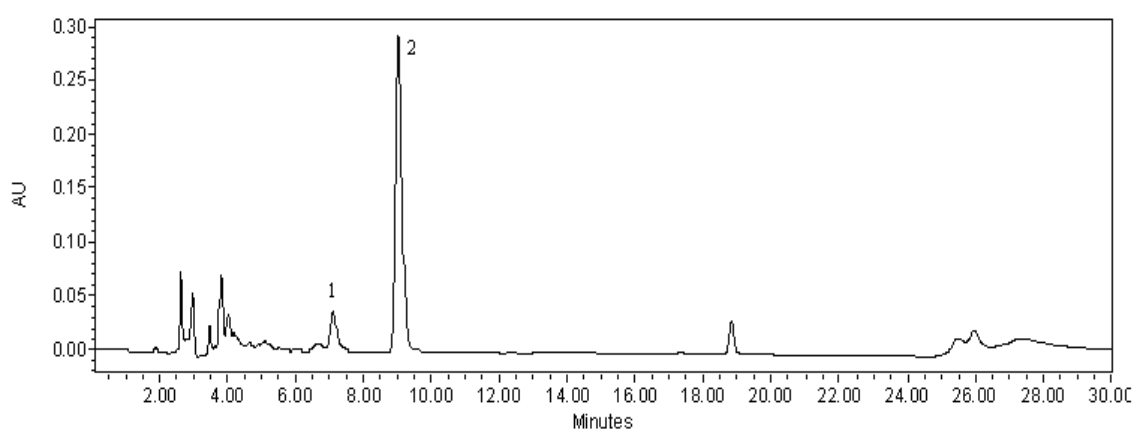


Figura 7: Cromatograma característico obtido por CLAE das flavanonas da variedade tangerina *cravo*, nas condições cromatográficas descritas no texto.

Identificação dos picos: 1-não identificado e 2-hesperidina.

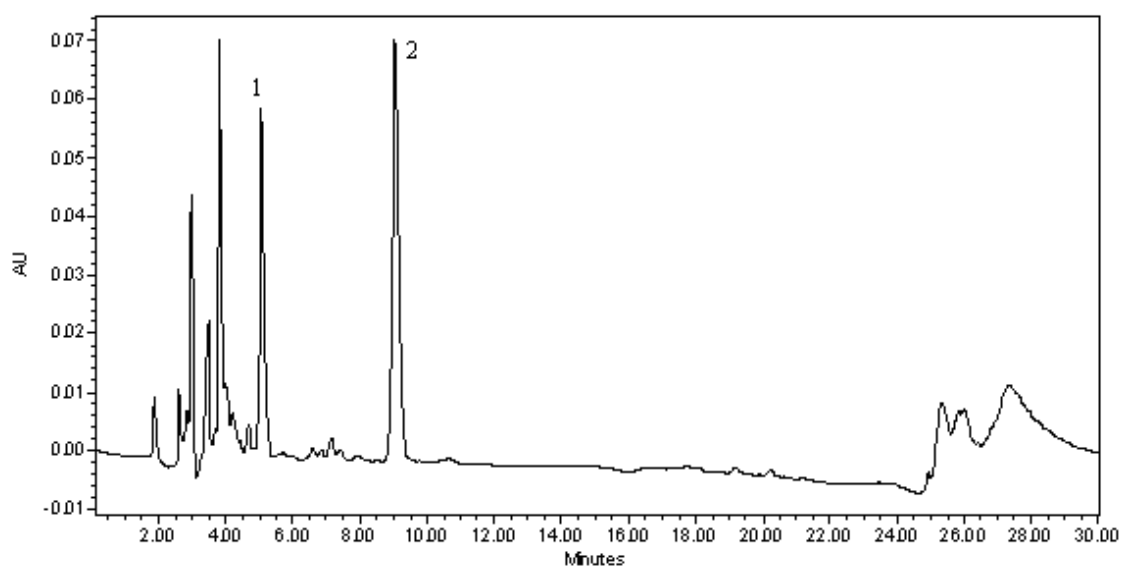


Figura 8: Cromatograma característico obtido por CLAE das flavanonas da variedade limão *tahiti*, nas condições cromatográficas descritas no texto.

Identificação dos picos: 1-eriocitrina e 2-hesperidina.

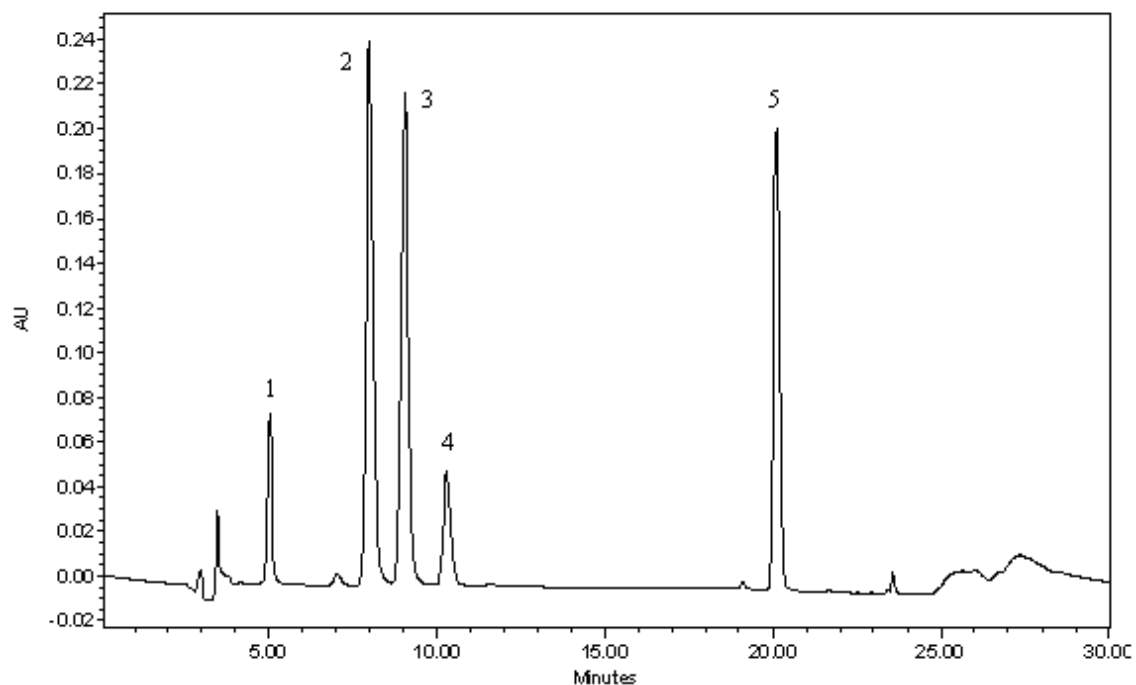


Figura 9: Cromatograma característico obtido por CLAE dos padrões das flavanonas para as variedades *cravo* e limão *tahiti*, nas condições cromatográficas descritas no texto. Identificação dos picos: 1-eriocitrina; 2-naringina; 3-hesperidina; 4-neohesperidina e 5-poncirina.

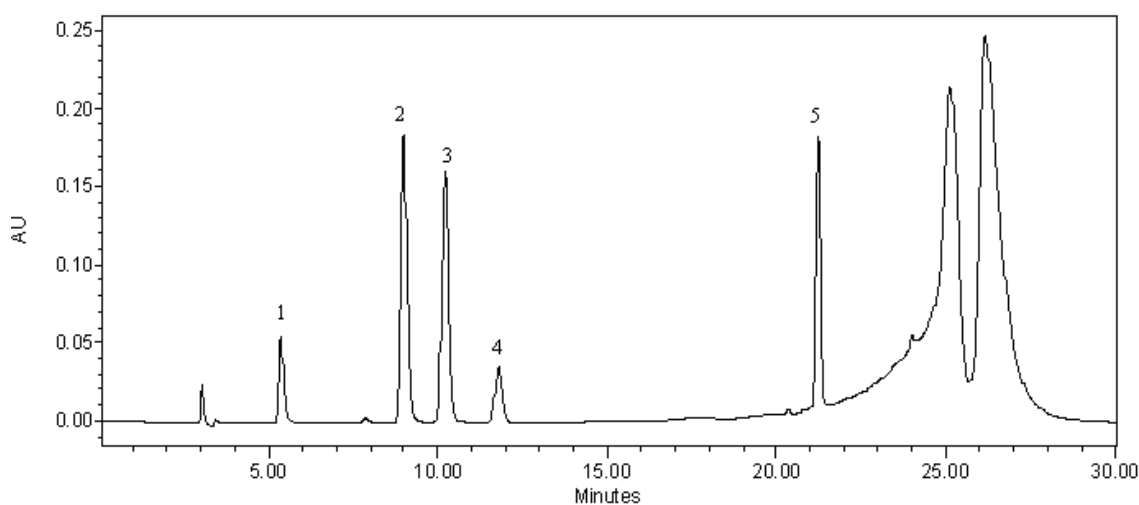


Figura 10: Cromatograma característico obtido por CLAE dos padrões das flavanonas para as variedades *poncã* e tangor *murcote*, nas condições cromatográficas descritas no texto. Identificação dos picos: 1-eriocitrina; 2-naringina; 3-hesperidina; 4-neohesperidina e 5-poncirina.

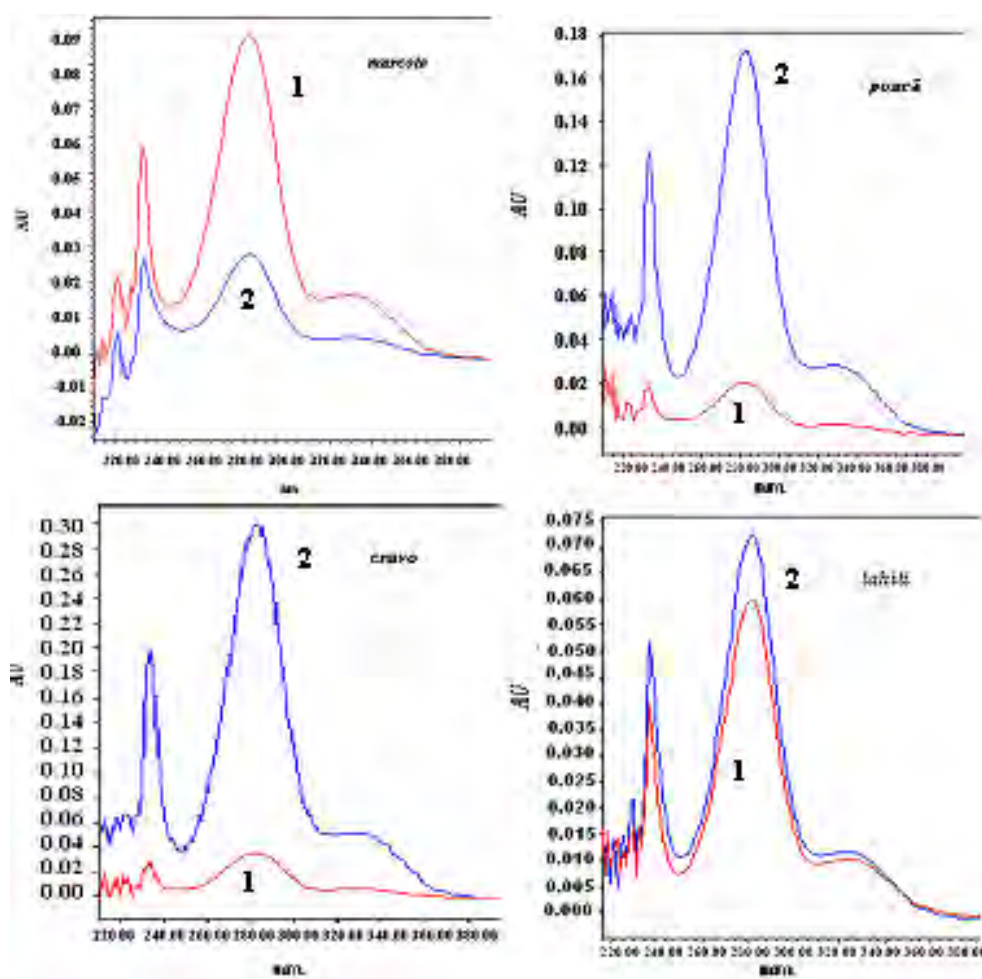


Figura 11: Espectros de absorvância fornecidos pelo detector por arranjo de fotodiodos das flavanonas para as variedades tangor *murcote*, *poncã*, *cravo* e limão *tahiti*, e padrões respectivamente, nas condições cromatográficas descritas no texto.

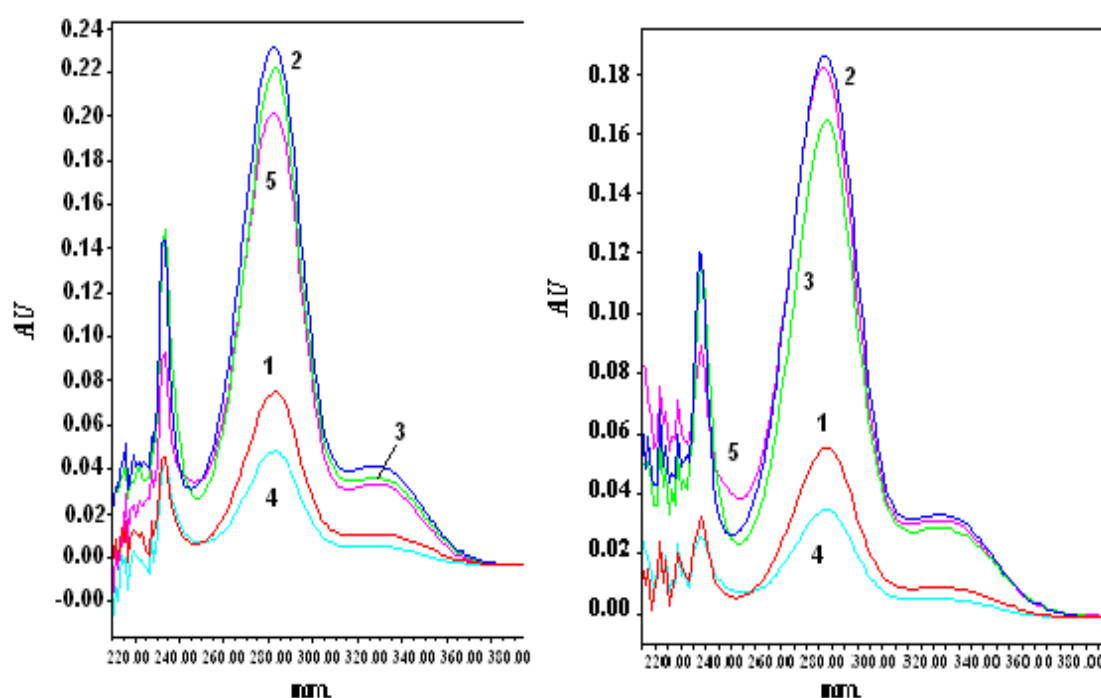


Figura 12: Espectros de absorvância fornecidos pelo detector por arranjo de fotodiodos dos padrões de flavanonas referente às variedades *cravo* e limão *tahiti* (à esquerda) tangor *murcote* e *poncã* (à direita), nas condições cromatográficas descritas no texto.

Conclusão

Pôde-se concluir com os resultados obtidos, que o extrato de carotenóides totais da variedade tangerina *cravo* apresentou a menor atividade antioxidante, e para o extrato de flavanonas a variedade limão *tahiti* demonstrou menor capacidade de seqüestro do radical livre DPPH[•]. Quando comparado a atividade

antioxidante dos dois extratos, o extrato de carotenóides foi mais eficiente nas variedades tangor *murcote* e tangerina *poncã*, enquanto que o extrato de flavanonas se mostrou mais eficiente para a variedade tangerina *cravo*.

Referências

- ARIAS, R.; LEE, T. C.; LOGENDRA, L.; JANES, H. Correlation of lycopene measured by HPLC with the L*, a*, b* color readings of a hydroponic tomato and the relationship of maturity with color and lycopene content. **J. Agric. Food Chem.**, v. 48, p.1697-1702, 2000.
- AUST, O.; SIES, H.; STAHL, W.; POLIDORI, M. C. Analysis of lipophilic antioxidants in human serum and tissues: tocopherols and carotenoids. **J. Chromatogr. A**, v. 936, p.83-93, 2001
- BENAVENTI-GARCIA, O.; CASTILLO, J.; MARIN, F. R.; ORTUÑO, A.; DEL RÍO, J. A. Uses and properties of *Citrus* Flavonoids. **J. Agric. Food Chem.**, v.45, n. 12, p. 4505-4515, 1993.
- BOCCO, A.; CUVELIER, M. E.; RICHARD, H.; BERSET, C. Antioxidant activity and phenolic composition of citrus peel and seed extracts. **J. Agric. Food Chem.**, v. 46, p. 2123-2129, 1998.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensm Wiss Technol.**, v. 28, p. 25-30, 1995.
- BURRI, B. J. Beta-carotene and human health: a review of current research. **Nutr. Res.**, v.17, p. 547-580, 1997.
- CLYDESDALE, F. M. Color measurement. In: GRUENWEDEL, D. W.; WHITAKER, J. P. **Food Analysis: Principles and Techniques**. v. 1, New York: Marcel Dekker Inc., p. 95-150, 1984.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE) PRODUÇÃO AGRÍCOLA MUNICIPAL. RJ: IBGE, 2006. Disponível em: <[http:// www.ibge.gov.br](http://www.ibge.gov.br)>. Acesso em: 10. junho, 2008.
- KIMBALL, D. A. Citrus Processing: **Quality Control and Technology**. New York: Van Nostrand Reinhold, p. 7-55; 73-101; 126-135; 162-179, 1991.

- LAWLESS, H.T.; HEYMANN, H. Sensory evaluation of food: principles and practices. New York: Chapman & Hall, 1999, 848 p.
- LIMA, V. L. A. G.; MÉLO, E. A.; MACIEL, M. I. S.; PRAZERES, F. G.; MUSSER, R. S.; LIMA, D. E. S. Total phenolic and carotenoid contents in acerola genotypes harvested at three ripening stages. **Food Chem.**, v.90, p.565-568, 2005.
- NATIONAL AGRICULTURAL SERVICE - NASS. Agricultural Statistics Board/ U.S. Department of Agriculture. **Crop Production:** Released June 10, 2008. Disponível em: <<http://www.fas.usda.gov/psdonline/psdHome.aspx>>. Acesso em: 10 junho. 2008.
- OLIVEIRA, A. P. V. Caracterização sensorial de sobremesas lácteas de chocolate empregando Perfil Livre e Mapa de Preferência Interno e medidas de cor e textura. 2002. Dissertação (Mestre em Ciência de Alimentos) – Departamento de Tecnologia de Alimentos e Medicamentos, Universidade Estadual de Londrina, Londrina.
- PALACE, V. P.; KHAPER, N.; QIN, Q.; SINGAL, P. K. Antioxidant potentials of vitamin a and carotenoids and their relevance to heart disease. **Free Radical Biol. Med.**, v. 26, p.746-761, 1999.
- RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. A guide for carotenoid analysis in foods. Washington, DC: International Life Sciences Institute Press, 1999, 59p.
- ROGINSKY, V.; LISSI, E. A. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. **Food Chem.**, v. 92, p.235-254, 2005.
- SÁNCHEZ-MORENO, C.; LARRAURI, J. A.; SAURA-CALIXTO, F. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. **J. Sci. Food. Agric.**, v.76, p.270-276, 1998.
- WANG, Y.; CHUANG, Y.; KU, Y. Quantitation of bioactive compounds in citrus fruit cultivated in Taiwan. **Food Chem.**, v. 102, p. 1163-1171, 2007.
- XU, G.; LIU, D.; CHEN, J.; YE, X.; MA, Y.; SHI, J. Juice components and antioxidant capacity of citrus varieties cultivated in China. **Food Chem.**, v.106, p.545-551, 2008.

Conclusões Gerais

Das sete variedades de frutas cítricas analisadas neste estudo, podemos concluir que:

- o limão *tahiti* apresentou o maior teor de acidez, enquanto que a laranja Lima, o menor teor;
- o limão *tahiti* conteve o maior teor de ácido ascórbico e o menor teor de fenólicos totais;
- a *poncã* apresentou o maior teor de flavonóides totais e carotenóides totais;
- em geral, a atividade antioxidante foi maior no sobrenadante do que nos precipitados do suco da fruta extraídos com metanol e acetona;
- a variedade tangerina *cravo* foi a que apresentou o maior teor de flavanonas;
- o limão *thaiti* foi a única fruta a apresentar além da hesperidina a eriocitrina;
- os extratos de carotenóides das variedades de laranjas apresentaram maior atividade antioxidante que as demais variedades e,
- os extratos de flavanonas das variedades lima e valência apresentaram maior atividade antioxidante.

A atividade antioxidante de uma fruta não está relacionada apenas aos teores dos principais constituintes bioativos presentes e sim com a estrutura química desses constituintes. Para tanto é necessário que se extraia e quantifique o maior número possível de constituintes presentes.