

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 30/07/2020.

**Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho"**

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

**Perfil de compostos fenólicos do suco de
laranja integral pasteurizado comercial**

Maria Rita Olivati Estevam Alves

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-graduação em
Alimentos e Nutrição para obtenção
o título de Mestre em Alimentos e
Nutrição.

Área de concentração: Ciência dos
Alimentos

Orientadora: Profa. Dra. Magali
Monteiro da Silva

**Araraquara
2018**

Perfil de compostos fenólicos do suco de laranja integral pasteurizado comercial

Maria Rita Olivati Estevam Alves

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-graduação em Alimentos e
Nutrição para obtenção o título de
Mestre em Alimentos e Nutrição.

Área de concentração: Ciência dos
Alimentos

Orientadora: Profa. Dra. Magali
Monteiro da Silva

**Araraquara
2018**

Ficha Catalográfica

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

A474p

Alves, Maria Rita Olivati Estevam

Perfil de compostos fenólicos do suco de laranja integral pasteurizado comercial / Maria Rita Olivati Estevam Alves. – Araraquara, 2018.
98 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Alimentos e Nutrição. Área de concentração em Ciências dos Alimentos.

Orientadora: Magali Monteiro da Silva.

1. Compostos fenólicos. 2. Suco de laranja. 3. HPLC-DAD. 4. UPLC-UV/MS. 5. Flavonóides. 6. Ácidos fenólicos. I. Silva, Magali Monteiro da, orient. II. Título.

CAPES: 50700006

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa concedida.

À Profa. Dra. Magali Monteiro da Silva pela orientação e dedicação a este trabalho, além de todos os ensinamentos e toda a contribuição à minha formação.

Ao Dr. Fábio Nascimento, da Waters Technologies e à Dra. Angela De Pietro, pela disponibilização do LC-MS e por todo o suporte oferecido, sem os quais não teria sido possível concluir este trabalho; ao Dr. Alexandre Gomes pelas análises e pela atenção e à Dra. Marina Ansolin pelo auxílio oferecido.

À Dra. Bianca Ferreira da Silva, do Instituto de Química de Araraquara, pela disponibilização do HPLC-DAD e por todo o suporte oferecido, sem os quais também não teria sido possível concluir este trabalho.

Ao Prof. Dr. Rubens Monti e à Dra. Juliana Bassan pela disponibilização e colaboração na utilização do liofilizador para o preparo das amostras empregadas neste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001; pelo apoio com que foi realizado este presente trabalho.

À banca examinadora, composta pelo Dr. Alexandre Gomes, Dra. Marina Ansolin e minha orientadora Dra. Magali Monteiro da Silva, pela disponibilidade, acessibilidade e atenção.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara - UNESP.

AGRADECIMENTOS PESSOAIS

Agradeço primeiramente a Deus por estar sempre comigo amparando, auxiliando e dando forças para concluir esta etapa da minha vida.

À toda a minha família, em especial aos meus pais Benedito e Maria Teresa, ao meu padrinho Luiz Antonio, ao meu avô José, às minhas avós Julieta e Eudóxia pelo apoio incondicional, pela confiança e por sempre acreditarem na minha capacidade valorizando meu estudo e me incentivando a realizar um dos meus maiores sonhos, não medindo esforços para que isso acontecesse.

Ao meu marido Marcelo por sempre estar ao meu lado, inclusive nos momentos mais difíceis, pela paciência, pelo suporte e amor durante todo o mestrado.

À equipe do Laboratório de Análise de Alimentos, em especial a Estela e a Natália pelo apoio, pelo companheirismo, pela ajuda, e pela oportunidade de aprender ainda mais com vocês.

À Lica, técnica de laboratório, professora e amiga por todos os conhecimentos transmitidos, pelo acolhimento e pelos conselhos.

Muito obrigada!

*“Cada sonho que você deixa pra trás, é um pedaço do seu futuro que deixa
de existir”.*

- Steve Jobs

RESUMO

Objetivo: O objetivo desse trabalho foi avaliar o perfil de compostos fenólicos do suco de laranja integral pasteurizado de marcas comerciais. **Métodos:** Foram reunidas informações sobre os compostos fenólicos considerando suas características químicas, bioatividade, técnica analítica utilizada para a sua determinação, e os principais compostos presentes em citros. Sucos de laranja integral pasteurizado de nove marcas comerciais foram adquiridos em Araraquara e região, SP. Foram adquiridas três embalagens de cada marca, com diferentes prazos de validade, referentes a diferentes lotes. Sucos de cada marca e lote foram liofilizados e submetidos à extração com solução de metanol:água (90:10, v/v), e os extratos foram submetidos à limpeza em cartucho SPE C18. A separação dos compostos foi realizada no sistema HPLC-DAD, empregando coluna C18 com fase móvel de água:ácido fórmico (99,9:0,1, v/v) e acetonitrila, em modo gradiente, vazão de 1 mL.min⁻¹, temperatura de 50 °C e volume de injeção de 20 µL. Foi também empregado o sistema UPLC-UV/MS, com escalonamento das condições para escala sub-2 µm. Os extratos foram injetados no sistema HPLC-DAD e UPLC-UV/MS para a identificação e quantificação dos compostos fenólicos. **Resultados:** Os principais compostos fenólicos das frutas cítricas descritos na literatura são os flavonoides, particularmente as flavanonas narirutina e hesperidina. Nesse trabalho foram identificados 60 compostos do suco de laranja, dos quais 54 são compostos fenólicos. Os flavonoides rutina, eriocitrina, narirutina, naringina, hesperidina, naringenina, nobiletina e tangeritina, e os ácidos caféico, *p*-cumárico e ferúlico foram identificados nos sucos de todas as marcas e lotes. Os níveis dos compostos fenólicos e dos compostos fenólicos expressos como composto majoritário de cada classe química presente na matriz variaram entre marcas e lotes. Os resultados da análise de PCA permitiram diferenciar o suco das marcas JA, MA, NC e PO, das marcas LI, NO, PR, TR e XA, de acordo com o perfil de compostos fenólicos. **Conclusão:** Foram identificados 54 compostos fenólicos no suco de laranja. Os flavonoides rutina, eriocitrina, narirutina, naringina, hesperidina, naringenina, nobiletina e tangeritina, e os ácidos caféico, *p*-cumárico e ferúlico foram identificados no suco de todas as marcas. Os níveis de compostos fenólicos oscilaram entre marcas e lotes, em relação aos compostos majoritários hesperidina e narirutina, aos intermediários eriocitrina e naringina, aos minoritários naringenina, rutina, nobiletina e tangeritina, e aos expressos como composto representante da classe. APCA permitiu diferenciar os sucos de diferentes marcas e lotes de acordo com os compostos fenólicos. O suco das marcas XA, MA, PO e TR apresentou comportamento similar, com aumento dos níveis de compostos fenólicos do 1º para o 3º lote, e o suco das marcas LI, NO e JA, também com comportamento similar, com redução dos níveis de compostos fenólicos do 1º para o 3º lote. O suco das marcas PR e NC foi diferenciado das demais marcas, com níveis de compostos fenólicos bastante aumentados na marca PR, e reduzidos na marca NC.

Palavras-chave: Compostos fenólicos; suco de laranja; HPLC-DAD; UPLC-UV/MS; flavonóides; ácidos fenólicos.

ABSTRACT

Objective: The aim of this work was to evaluate the profile of phenolic compounds of pasteurized orange juice from commercial brands. **Methods:** The phenolic compounds were characterized considering chemical structure, bioactivity, and techniques for analytical determination, as well as the main compounds present in citrus. Pasteurized orange juices from nine commercial brands were purchased in Araraquara and region, SP. Three packages from each brand were acquired, with different shelf life corresponding to different lots. Juices were lyophilized and extracted with methanol:water solution (90:10, v/v), and the extracts were cleaned in C18 SPE cartridges. Separation of the compounds was performed in an HPLC-DAD system, using a C18 column with mobile phase of water:formic acid (99.9:0.1, v/v) and acetonitrile in gradient mode, with a flow rate of 1 mL.min⁻¹, temperature of 50 °C and injection volume of 20 µL. An UPLC-UV/MS system was also used, with scaling conditions for sub-2 µm scale. The extracts were injected into the HPLC-DAD and UPLC-UV/MS system for identification and quantification of the phenolic compounds. **Results:** The main phenolic compounds of citrus fruits described in the literature are flavonoids, particularly the flavanones narirutin and hesperidin. In this work 60 compounds were identified in orange juice, of which 54 are phenolic compounds. The flavonoids rutin, eriocitrin, narirutin, naringin, hesperidin, naringenin, nobiletin and tangeritin, and the caffeic, *p*-coumaric and ferulic acids were identified in all juices. The levels of phenolic compounds varied amongst brands and lots. The results of the PCA analysis allowed to differentiate the juice of the brands JA, MA, NC and PO, from brands LI, NO, PR, TR and XA, according to the phenolic compounds profile. **Conclusion:** A total of 54 phenolic compounds were identified in orange juice. The flavonoids rutin, eriocitrin, narirutin, naringin, hesperidin, naringenin, nobiletin and tangeritin, and the caffeic, *p*-coumaric and ferulic acids were identified in the juice of all brands. The levels of phenolic compounds oscillated amongst brands and lots, in relation to all of the compounds evaluated. The PCA allowed the differentiation of the juices from different brands and lots according to the phenolic compounds. The juice from the brands XA, MA, PO and TR presented similar behavior, with an increase in the levels of phenolic compounds from the 1st to 3rd lot, and the juice from the brands LI, NO and JA, also with similar behavior, showed a decrease in the levels of phenolic compounds from the 1st to the 3rd lot. The juice from the PR and NC brands was differentiated from the other brands, with phenolic compound levels greatly increased in the PR brand, and reduced in the NC brand.

Keywords: Phenolic compounds; Orange juice; HPLC-DAD; UPLC-UV / MS; flavonoids; phenolic acids.

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Introdução

Quadro 1. Principais classes e tipos de flavonoides de acordo com a 11 posição do grupo hidroxila de acordo com as Figuras 1 e 2.

Quadro 2. Métodos de análise para a determinação de compostos fenólicos 16 em frutas cítricas.

Capítulo 1. Perfil de compostos fenólicos do suco de laranja integral pasteurizado comercial

Tabela 1. Compostos identificados no suco de laranja integral pasteurizado 42 de marcas comerciais

Tabela 2. Compostos fenólicos¹ (mg.100g⁻¹ suco liofilizado) do suco de 49 laranja integral pasteurizado de marcas comerciais, identificados por comparação com padrões analíticos e por UPLC-UV/MS.

Tabela 3. Compostos fenólicos¹ (mg.100g⁻¹ suco liofilizado) do suco de 53 laranja integral pasteurizado de marcas comerciais, identificados com base na similaridade dos espectros UV/Vis da classe química e por UPLC-UV/MS.

LISTA DE FIGURAS

Introdução

Figura 1. Via do ácido chiquímico para biossíntese de compostos fenólicos e alcaloides (19).

Figura 2. Principais compostos fenólicos derivados da enzima fenilalanina amônio liase PAL (19).

Figura 3. Estrutura química típica dos flavonoides e suas posições substituintes (23).

Figura 4. Classificação de flavonoides segundo a estrutura química (30). 10

Figura 5. Principais agliconas e glicosídeos de citros (32). 12

Figura 6. Estrutura química dos ácidos hidróxibenzóicos (37). 14

Figura 7. Estrutura química dos ácidos hidroxicinâmicos (37). 14

Figura 8. Espectros de absorção do UV/Vis típicos da classe das flavanonas ((a) narirutina e (b) naringina). 19

Figura 9. Espectros de absorção do UV/Vis típicos da classe das flavonas ((c) nobiletina e (d) tangeritina). 19

Figura 10. Espectros de absorção do UV/Vis típicos da classe dos flavonóis ((e) rutina e (f) quercetina). 19

Figura 11. Espectros de absorção do UV/Vis típicos da classe dos ácidos hidroxibenzóicos ((g) ácido gálico, (h) ácido protocatecuico e (i) ácido siríngico). 20

Figura 12. Espectros de absorção do UV/Vis típicos da classe dos ácidos hidroxicinâmicos ((j) ácido *p*-cumárico e (h) ácido ferúlico). 21

Capítulo 1. Perfil de compostos fenólicos do suco de laranja integral pasteurizado comercial

Figura 1. Cromatograma típico de suco de laranja integral pasteurizado comercial 40

Figura 2. Análise de componentes principais de compostos fenólicos de suco de laranja comercial. Os picos e os sucos são nomeados e/ou numerados de acordo com as Tabelas 2 e 3. 57

LISTA DE ANEXOS

Anexos	76
Anexo 1. Cromatogramas típicos do extrato de suco de laranja integral pasteurizado da marca JA, referentes ao 1º lote (a), 2º lote (b) e 3º lote (c).	77
Anexo 2. Cromatogramas típicos do extrato de suco de laranja integral pasteurizado da marca LI, referentes ao 1º lote (a), 2º lote (b) e 3º lote (c).	78
Anexo 3. Cromatogramas típicos do extrato de suco de laranja integral pasteurizado da marca MA, referentes ao 1º lote (a), 2º lote (b) e 3º lote (c).	79
Anexo 4. Cromatogramas típicos do extrato de suco de laranja integral pasteurizado da marca NC, referentes ao 1º lote (a), 2º lote (b) e 3º lote (c).	80
Anexo 5. Cromatogramas típicos do extrato de suco de laranja integral pasteurizado da marca NO, referentes ao 1º lote (a), 2º lote (b) e 3º lote (c).	81
Anexo 6. Cromatogramas típicos do extrato de suco de laranja integral pasteurizado da marca PO, referentes ao 1º lote (a), 2º lote (b) e 3º lote (c).	82
Anexo 7. Cromatogramas típicos do extrato de suco de laranja integral pasteurizado da marca PR, referentes ao 1º lote (a), 2º lote (b) e 3º lote (c).	83
Anexo 8. Cromatogramas típicos do extrato de suco de laranja integral pasteurizado da marca XA, referentes ao 1º lote (a), 2º lote (b) e 3º lote (c).	84
Anexo 9. Curvas de calibração dos compostos fenólicos.	85

Introdução

1 Importância econômica da laranja

A laranja é a fruta mais produzida no Brasil, fazendo da citricultura um segmento de grande importância econômica no país. Em todo o Brasil são mais de 3000 municípios onde a citricultura está presente (1). A produção brasileira de laranja na safra de 2016/2017 foi de 352 milhões de caixas de 40,8 kg, e na safra de 2017/2018 foi de 471 milhões de caixas de laranja, um aumento de 34% em relação à produção da safra anterior (2).

O estado de São Paulo juntamente com o Triângulo Mineiro integra o cinturão citrícola brasileiro, que é responsável por cerca de 80% da produção nacional de laranja. O estado de São Paulo responde sozinho por cerca de 70% da produção nacional (3). A produção de laranja do estado de São Paulo foi de 245,3 milhões de caixas na safra de 2016/2017 e de 364,5 milhões de caixas na safra de 2017/2018, um aumento de 49% relação à produção da safra anterior (2).

De acordo com o Fundo de Defesa da Citricultura - Fundecitrus, a produção de laranja no Brasil é direcionada para a laranja doce, da espécie *Citrus sinensis* (L.) Osbeck. A variedade de laranja predominante é a Pêra-Rio, cultivada exclusivamente no Brasil, seguida pelas variedades Valência, Natal e Hamlim, de expressão comercial para a produção de suco, além da Hammel, Westin, Rubi, Valência Americana, Valência Argentina, Seleta, Pineapple, e Charmute (2, 3).

Da produção total de laranja do país 85% são destinados às indústrias gerando cerca de 45% de suco (4).

Considerações finais

Os flavonoides e os ácidos fenólicos são os principais compostos fenólicos presentes nas frutas cítricas, com destaque para as flavanonas, flavonas e flavonóis, particularmente as flavanonas naringina, naringenina, narirutina, hesperidina, neohesperidina, eriocitrina, neoeriocitrina, erodictiol, poncirina, didimina; as flavonas tangeretina, nobiletina, sinensetina, heptametoxiflavona, escutelareina, crisoeriol, diosmetina, diosmina, apigenina, kaempferol e luteolina; e os flavonóis rutina, natsudaidaina, sinensetina, quercetina e miricetina, presentes em quantidades variadas no suco, na fruta e na casca de diferentes citros. A determinação de compostos fenólicos geralmente emprega a cromatografia líquida de alta eficiência, com separação em colunas de fase reversa e modo gradiente, com a utilização de detectores de arranjo de diodos e espectrometria de massas, para e identificar e/ou quantificar. Os flavonoides e os ácidos fenólicos possuem bandas de absorção características na faixa do UV/Vis, o que permite identificá-los em função da classe química. Existe uma escassez de dados na literatura sobre o perfil de compostos fenólicos de frutas e suco de frutas cítricas, particularmente do suco de laranja, e os estudos disponíveis na literatura descrevem predominantemente a presença de flavanonas de citros, principalmente narirutina e hesperidina, sem considerar outras classes e/ou outros compostos fenólicos importantes, o que torna necessária a realização de estudos que avaliem o perfil destes compostos no suco de laranja. Nesse trabalho foram identificados 60 compostos, dos quais 54 são compostos fenólicos, com destaque para os flavonoides rutina, eriocitrina, narirutina, naringina, hesperidina, naringenina, nobiletina e tangeritina, e os ácidos caféico, *p*-

cumárico e ferúlico, que foram identificados no suco de todas as marcas e lotes. Os níveis de compostos fenólicos oscilaram entre os lotes da maioria das marcas, e entre as marcas. A hesperidina e narirutina foram os compostos majoritários, com níveis elevados em todas as marcas e lotes. Os sucos apresentaram níveis intermediários de eriocitrina e naringina em todas as marcas e lotes. A naringenina, rutina, nobiletina e a tangeritina foram consideradas compostos minoritários, presentes no suco de laranja de todas as marcas e lotes. Os compostos fenólicos expressos como composto majoritário de cada classe química presente na matriz variaram entre marcas e lotes. Os resultados da análise de componentes principais (ACP) permitiram diferenciar os sucos de diferentes marcas e lotes de acordo com os compostos fenólicos. O suco das marcas XA, MA, PO e TR apresentou comportamento similar, com aumento dos níveis de compostos fenólicos do 1º para o 3º lote, e o suco das marcas LI, NO e JA, também com comportamento similar, com redução dos níveis de compostos fenólicos do 1º para o 3º lote. O suco das marcas PR e NC foi diferenciado das demais marcas, com níveis de compostos fenólicos bastante aumentados do 1º para o 3º lote na marca PR, e reduzidos na marca NC, confirmando os dados da quantificação. Nossos resultados contribuíram para caracterizar o perfil de compostos fenólicos do suco de laranja integral pasteurizado comercial brasileiro.