

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

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

**Perfil de compostos fenólicos do suco de
laranja Pêra Rio orgânica**

Estela Mesquita Diegues de Oliveira

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
2017**

Perfil de compostos fenólicos do suco de laranja Pêra Rio orgânica

Estela Mesquita Diegues de Oliveira

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
2017**

Ficha Catalográfica

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

O148p

Oliveira, Estela Mesquita Diegues de
Perfil de compostos fenólicos do suco de laranja Pêra Rio orgânica / Estela
Mesquita Diegues de Oliveira. – Araraquara, 2017.
34 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: Ciências dos Alimentos.

Orientadora: Magali Monteiro da Silva.

1. Compostos fenólicos. 2. CLAE-DAD. 3. Validação. 4. Suco de laranja orgânica.
5. Flavonoides. 6. Ácidos fenólicos. I. Silva, Magali Monteiro da, orient. II. Título.

Ficha catalográfica elaborada por Maria Irani Coito CRB-8/4.440

CAPES: 50700006



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Araraquara



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: PERFIL DE COMPOSTOS FENÓLICOS DO SUCO DE LARANJA
PÊRA RIO ORGÂNICA

AUTORA: ESTELA MESQUITA DIEGUES DE OLIVEIRA

ORIENTADORA: MAGALI CONCEICAO MONTEIRO DA SILVA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em ALIMENTOS E
NUTRIÇÃO, área: CIÊNCIA DOS ALIMENTOS pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. MAGALI CONCEICAO MONTEIRO DA SILVA

Departamento de Alimentos e Nutrição / Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara da
UNESP

Profa. Dra. ADRIANA ZERLOTTI MERCADANTE

Departamento de Ciências de Alimentos / Faculdade de Engenharia de Alimentos / UNICAMP / Campinas

Prof. Dr. ÁLVARO JOSÉ DOS SANTOS NETO

Departamento de Química e Física Molecular, Instituto de Química do Câmpus de São Carlos da USP

Araraquara, 24 de novembro de 2017

AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida.

À Profa. Dra. Magali Monteiro 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, pela disponibilização do LC-MS e por todo o suporte oferecido, sem os quais não teria sido possível concluir este trabalho; à Dra. Marina Ansolin e ao Dr. Alexandre Gomes pelas análises.

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 pesquisadora Daniela Kharfan, da JBT Food Tech, pela ponte para o contato com os produtores de laranja orgânica.

Aos srs. Juca e Gabriel Bueno, da Fazenda da Toca, e ao sr. Luiz Fernando, da Delta Citrus, pelo fornecimento do suco de laranja Pêra-Rio orgânica.

À Profa. Dra. Thaís Borges Cesar pelo fornecimento de alguns dos padrões analíticos empregados no desenvolvimento deste trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio concedido (Processos nº 2013/10138-0 e 2014/23303-1).

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara - UNESP.

AGRADECIMENTOS PESSOAIS

À equipe do Laboratório de Análise de Alimentos, em especial à Rafaela, Luiz e Maria Rita pelo apoio, pelo companheirismo, pela ajuda, e pela oportunidade de aprender ainda mais ensinando vocês.

À Lica, técnica de laboratório, professora e amiga, por todos os conhecimentos transmitidos, pela paciência, pelos conselhos e por ter me acolhido como um membro da família.

Aos amigos e colegas de profissão Fernanda, Jhohann, Flávia e José Fernando por todo o apoio, pelas discussões e contribuições, e pela força em todos os momentos.

Aos meus pais e irmãos por todo o apoio incondicional, pela confiança e por sempre acreditarem em mim.

Muito obrigada!

RESUMO

Objetivo: O objetivo deste trabalho foi reunir informações sobre compostos fenólicos em citros, visando compreender suas características e propriedades, a fim de dar suporte ao desenvolvimento de método analítico para avaliar o perfil de compostos fenólicos do suco de laranja Pêra-Rio orgânica e convencional durante a safra de 2016. **Métodos:** As informações sobre os compostos fenólicos foram reunidas considerando sua biossíntese, características químicas e bioatividade, a técnica analítica mais utilizada para a sua determinação em alimentos, e os níveis dos principais compostos presentes em citros. O método analítico foi desenvolvido empregando a cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD). Para a validação foram avaliados os parâmetros curva de calibração, linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção, limite de quantificação e robustez. O método validado foi utilizado para avaliar o perfil de compostos fenólicos do suco de laranja Pêra-Rio orgânica e convencional do início, meio e fim da safra de 2016. **Resultados:** Os compostos fenólicos mais importantes em citros são os flavonoides, com destaque para as flavanonas. As principais flavanonas de citros são a hesperidina, narirutina, naringina e neohesperidina, presentes em quantidades variadas no suco, na fruta e na casca. A determinação de compostos fenólicos é realizada empregando CLAE em fase reversa e modo gradiente, com o uso de detectores de arranjo de diodos (DAD) e espectrometria de massas (EM). Os estudos disponíveis na literatura avaliam apenas as flavanonas mais expressivas, sem considerar outros compostos fenólicos, o que torna necessária a realização de estudos que avaliem o perfil e os níveis destes compostos. A melhor condição de separação foi obtida utilizando coluna de fase reversa, fase móvel composta de água:ácido fórmico (99,9:0,1, v/v) e acetonitrila em modo gradiente. Os cromatogramas foram adquiridos em 255, 270 e 280 nm. O método apresentou linearidade, ampla faixa linear, boa precisão e exatidão, baixos limites de detecção e quantificação, e robustez, considerando 10 flavonoides e 6 ácidos fenólicos. As flavonas rutina, nobiletina e tangeretina, e as flavanonas hesperidina, narirutina e eriocitrina foram identificadas em todos os sucos orgânicos e convencionais, com sua identidade confirmada por espectrometria de massas, e quantificadas. Derivados de ácido cinâmico (7), flavanonas (6) e flavonas (6) foram tentativamente identificadas e quantificadas com base nos espectros DAD característicos da classe química. **Conclusão:** O perfil dos compostos fenólicos dos sucos de laranja Pêra-Rio mudou durante a safra; os níveis aumentaram nos sucos de laranja orgânica e diminuíram ou foram mantidos aproximadamente os mesmos em sucos de laranja convencional. Os níveis de compostos fenólicos foram mais elevados nos sucos orgânicos do que nos sucos convencionais. A análise de componentes principais mostrou que os sucos orgânicos foram caracterizados principalmente por níveis mais elevados de flavanonas e flavonas na safra de 2016.

Palavras-chave: Compostos fenólicos; CLAE-DAD; validação; suco de laranja orgânica; flavonoides; ácidos fenólicos.

ABSTRACT

Objective: The aim of this work was to gather information about phenolic compounds in citrus, in order to understand their characteristics and properties, and to support the development of an analytical method to evaluate the phenolic compounds profile of organic and conventional Pêra-Rio orange juice from the 2016 harvest. **Methods:** Information on phenolic compounds was gathered considering their biosynthesis, chemical characteristics and bioactivity, the most used analytical technique for their determination in foods, and the levels of the main compounds present in citrus. The analytical method was developed using high performance liquid chromatography with a diode array detector (HPLC-DAD). For the validation, calibration curves, linearity, precision, accuracy, detection limit, quantification limit and ruggedness were evaluated. The validated method was used to evaluate the phenolic compounds profile of organic and conventional Pêra-Rio orange juice at the beginning, middle and end of the 2016 harvest. **Results:** The most important phenolic compounds in citrus are flavonoids from the flavanone class. The major citrus flavanones are hesperidin, narirutin, naringin and neohesperidin, present in varying amounts in juice, pulp and peel. The determination of phenolic compounds is performed employing HPLC in reversed phase and gradient mode, using diode array detectors (DAD) and mass spectrometry (MS). The studies available in the literature only evaluate the most expressive flavanones without considering other phenolic compounds, which makes it necessary to carry out studies that evaluate the profile and levels of these compounds. The best separation condition was obtained using a reversed phase column, mobile phase composed of water:formic acid (99.9:0.1, v/v) and acetonitrile in gradient mode. Chromatograms were acquired at 255, 270 and 280 nm. The method showed linearity, a wide linear range, good precision and accuracy, low limits of detection and quantification, and ruggedness for 10 flavonoids and 6 phenolic acids. Flavones rutin, nobiletin and tangeretin, and flavanones hesperidin, narirutin and eriocitrin were identified in all organic and conventional juices, with their identity confirmed by mass spectrometry, and quantified. Cinnamic acid derivatives (7), flavanones (6) and flavones (6) were tentatively identified and quantified based on the characteristic DAD spectra of the chemical class. **Conclusion:** The phenolic compounds profile of Pêra-Rio orange juice changed during the harvest; the levels increased in organic juices and decreased or were maintained approximately the same in conventional juices. The levels of phenolic compounds were higher in organic juices than in conventional juices. Principal component analysis showed that organic juices were characterized mainly by higher levels of flavanones and flavones in the 2016 harvest.

Keywords: Phenolic compounds; HPLC-DAD; validation; organic orange juice; flavonoids; phenolic acids.

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1. Compostos fenólicos em citros

Figura 1. Unidades básicas formadoras dos metabólitos secundários (18).	16
Figura 2. Estrutura básica dos ácidos fenólicos.	17
Figura 3. Estrutura básica dos flavonoides.	18
Figura 4. Classes dos flavonoides (22).	19
Figura 5. Principais agliconas e glicosídeos de citros (23).	20

SUMÁRIO

RESUMO	v
ABSTRACT	vi
LISTA DE FIGURAS	vii
INTRODUÇÃO	9
Capítulo 1. Compostos fenólicos em citros	11
Resumo	12
1. Introdução	13
2. Suco de laranja	13
3. Sistema de cultivo orgânico	14
4. Compostos fenólicos	15
5. Flavonoides em citros	19
6. Propriedades dos compostos fenólicos	21
7. Análise de compostos fenólicos	21
8. Conclusões	23
9. Referências	24
Capítulo 2. Simultaneous HPLC determination of flavonoids and phenolic acids profile in Pêra-Rio orange juice	30
CONSIDERAÇÕES FINAIS	32
REFERÊNCIAS	33

INTRODUÇÃO

A laranja é a fruta mais produzida no Brasil, com cerca de 450 milhões de caixas (40,8 kg) em 2017. A maior parte da produção de laranja é direcionada ao processamento para a produção de suco NFC (*Not From Concentrate*, ou pasteurizado) e FCOJ (*Frozen Concentrated Orange Juice*, ou suco concentrado congelado), que são destinados à exportação. A produção total de suco de laranja foi de 1,01 milhões de toneladas em 2016; 921 mil toneladas só do estado de São Paulo. Em 2017 foram produzidas cerca de 848 mil toneladas de suco, 771 mil do estado de São Paulo (1,2,3).

A produção orgânica de citros representa 0,9% da produção total mundial; entre os citros, a laranja é a fruta mais cultivada e o suco de laranja é o principal produto (4,5). O Brasil é líder no mercado de produtos orgânicos na América Latina, que detém a maior área de cultivo orgânico do mundo (cerca de 15 mil ha). A agricultura orgânica está baseada nos princípios de sustentabilidade, viabilidade econômica e justiça social, integrando o homem ao meio ambiente (4,6).

Existe uma crescente preocupação do consumidor quanto à contaminação química dos alimentos, o que tem levado ao aumento da demanda de alimentos com apelo pelo saudável e pelo natural, de maior segurança e qualidade, que confirmem benefícios à saúde (6).

O consumo de suco de laranja vem sendo associado a benefícios relacionados à modulação do metabolismo humano e atividade antioxidante e antiinflamatória, que previnem o desenvolvimento de doenças crônico-degenerativas como o diabetes e o câncer, entre outras. O suco de laranja é

fonte de ácido ascórbico na dieta e também contém flavonoides e ácidos fenólicos, que previnem o estresse oxidativo ao nível celular (7,8).

Os compostos fenólicos do suco de laranja são influenciados pela variedade e estágio de maturação da fruta, pelas condições edafoclimáticas, pelo sistema de cultivo, pelo período pós-colheita e pelas condições de processamento (9,10,11). Os principais compostos fenólicos presentes em citros são flavonoides das classes das flavanonas e flavonas. Dentre as flavanonas, podem ser destacadas a hesperidina e a narirutina (12,13,14).

Apesar dos estudos sobre os compostos fenólicos de laranjas de diversas variedades (12,13,14), pouco se conhece sobre o perfil destes compostos. Ainda, não existem estudos disponíveis sobre a variedade Pêra-Rio, que tem grande importância por ser a principal variedade cultivada no Brasil e responsável por grande parte da exportação brasileira de suco de laranja. Laranjas da variedade Pêra-Rio são exclusivamente cultivadas no país e conferem características únicas ao suco de laranja brasileiro.

O objetivo deste trabalho foi reunir informações sobre compostos fenólicos em citros, visando compreender suas características e propriedades, a fim de dar suporte ao desenvolvimento de método analítico para avaliar o perfil de compostos fenólicos do suco de laranja Pêra-Rio orgânica e convencional, durante a safra de 2016.

Capítulo 1.

Compostos fenólicos em citros

Compostos fenólicos em citros

Estela Mesquita Diegues de Oliveira
Magali Monteiro

Departamento de Alimentos e Nutrição, Faculdade de Ciências Farmacêuticas
– UNESP, 14800-903, Araraquara, SP, Brasil

Resumo

O Brasil é o maior produtor mundial de laranja e de suco de laranja. A qualidade do suco de laranja está estreitamente relacionada à variedade e maturação da fruta, às condições de cultivo e condições edafoclimáticas, e às condições do processamento. O cultivo orgânico vem ganhando espaço no Brasil e no mundo, acompanhando a tendência de consumo de alimentos saudáveis que conferem benefícios à saúde. Dentre os citros, a laranja é a fruta mais produzida, e o suco de laranja orgânica é o principal suco de fruta orgânica produzido no mundo. O consumo de frutas cítricas e sucos vem sendo associado à redução do risco de doenças crônico-degenerativas, devido à presença de compostos fenólicos, que apresentam atividade antioxidante e antiinflamatória. Os ácidos fenólicos e flavonoides, sobretudo as flavanonas naringina, hesperidina, neohesperidina e naringina, são os principais compostos fenólicos de citros, presentes em quantidades variadas no suco, na fruta e na casca. A cromatografia líquida de alta eficiência é a técnica analítica mais largamente utilizada para a determinação de compostos fenólicos, com emprego de colunas de fase reversa e modo gradiente, detectores de arranjo de diodos e de espectrometria de massas. O espectro de absorção UV/Vis dos compostos é característico de cada classe e usualmente apresenta duas bandas de absorção.

Palavras-chave: compostos fenólicos; suco de laranja; agricultura orgânica; CLAE

1. Introdução

O Brasil é o maior produtor mundial de laranja, fazendo da citricultura um dos mais importantes setores do agronegócio brasileiro. O estado de São Paulo e o Triângulo Mineiro constituem o cinturão citrícola brasileiro, responsável por 113 mil ha de cultivo e mais da metade da produção nacional de laranja. A laranja doce, da espécie *Citrus sinensis* (L.) Osbeck, da variedade Pêra-Rio é a principal cultivada no país, seguida das variedades Valência, Natal, Hamlin, Westin e Rubi (1,2).

A produção de laranja da safra de 2015/2016 foi de 410 milhões de caixas, 351 milhões do estado de São Paulo, e em 2016/2017, foi de 446 milhões de caixas de laranja, 245 milhões do estado de São Paulo. Cerca de 85% da produção de laranja do país são destinados ao processamento, para a produção de suco (1,3).

2. Suco de laranja

O Brasil também é líder mundial na produção de suco de laranja e responsável por cerca de 80% do suco que circula no mundo. O estado de São Paulo responde por cerca de 50% da produção mundial de suco de laranja, destinando 98% à exportação, principalmente para a Europa e os Estados Unidos (2,3).

Os principais sucos produzidos no país são o FCOJ (*Frozen Concentrated Orange Juice*) e o NFC (*Not From Concentrate*). Na safra de 2015/2016, foram produzidas 699 mil ton de FCOJ e 222 mil ton de NFC (FCOJ equivalente). Na safra de 2016/2017, foram produzidos 531 mil ton de FCOJ e 240 mil ton de NFC (FCOJ equivalente) (3).

A qualidade do suco de laranja está estreitamente relacionada às condições do processamento, que exercem influência sobre as características sensoriais e nutricionais do suco. O suco de laranja NFC vem sendo muito valorizado pelo consumidor frente ao FCOJ, por apresentar sabor e aroma característicos de laranja, próximos ao do suco espremido na hora do consumo. Embora o processo de concentração do FCOJ confira maior estabilidade microbiológica e menor custo de transporte, o emprego de alta temperatura por período de tempo maior que o NFC é capaz de alterar o aroma e o sabor do suco (4-6). Além do processamento, a qualidade do suco de laranja também é influenciada pela variedade e maturação da fruta, condições de cultivo e condições edafoclimáticas (7,8). Nesse sentido, o cultivo orgânico vem ganhando espaço no Brasil e no mundo, acompanhando a tendência de consumo de alimentos saudáveis que agreguem benefícios à saúde (9,10).

3. Sistema de cultivo orgânico

Existe uma crescente preocupação do consumidor quanto à contaminação química dos alimentos. O sistema orgânico de produção de alimentos não faz uso de insumos químicos, além de se preocupar, durante toda a cadeia produtiva, com a saúde do produtor e do consumidor, com o meio ambiente, e utilizar recursos naturais renováveis, promovendo o equilíbrio. A agricultura orgânica é fundamentada nos princípios de sustentabilidade, viabilidade econômica e justiça social, integrando o homem ao meio ambiente (11-13). Entretanto, ainda existe uma grande lacuna de conhecimento quanto à influência do sistema de cultivo sobre a qualidade dos alimentos (5,7,9,11,13).

A área mundial destinada à agricultura orgânica é de cerca de 50,9 milhões de hectares, 1,1% da área total da agricultura. O Brasil lidera o maior mercado de produtos orgânicos da América Latina, tendo movimentado R\$ 3 bilhões em 2016, com destaque para a exportação de frutas, açúcar e castanhas (9,14).

A produção de citros orgânicos do mundo compreende 8,7 milhões de ha. A laranja é a fruta mais produzida, e o suco de laranja orgânica é o principal suco de fruta cítrica orgânica produzido no mundo (15,16). Apesar do mercado potencial, ainda não existem dados de produção e consumo de citros orgânicos no Brasil.

4. Compostos fenólicos

O metabolismo vegetal primário é constituído de vias semelhantes entre todas as espécies e tem como objetivo a síntese, a degradação e a conversão de produtos essenciais para o desenvolvimento e manutenção do organismo, como ATP, carboidratos, ácidos graxos, proteínas e ácidos nucleicos. Os processos envolvidos no metabolismo primário das plantas se dão por meio da fotossíntese, da glicólise, do ciclo do ácido cítrico, da β -oxidação de ácidos graxos, entre outros. O metabolismo secundário envolve vias distintas e produtos com distribuição mais restrita e expressão individual entre grupos e/ou espécies na natureza. De maneira geral, os metabólitos secundários tem funções relacionadas à sobrevivência e reprodução dos vegetais no ambiente, e são consequentemente afetados por essas condições (17,18).

O metabolismo secundário parte de produtos das vias do metabolismo primário que dão origem à acetil coenzima A, ao ácido chiquímico, ao ácido

mevalônico e à 1-desoxixilulose 5-fosfato. Estes produtos dão origem às vias do metabolismo secundário: acetato, chiquimato, mevalonato e desoxixilulose fosfato, que resultam na formação de oito unidades básicas, que ao se combinarem entre si, dão origem a uma vasta gama de compostos com funções distintas e/ou ainda desconhecidas. As unidades de formação dos metabólitos secundários estão apresentadas na Figura 1 (17,18).

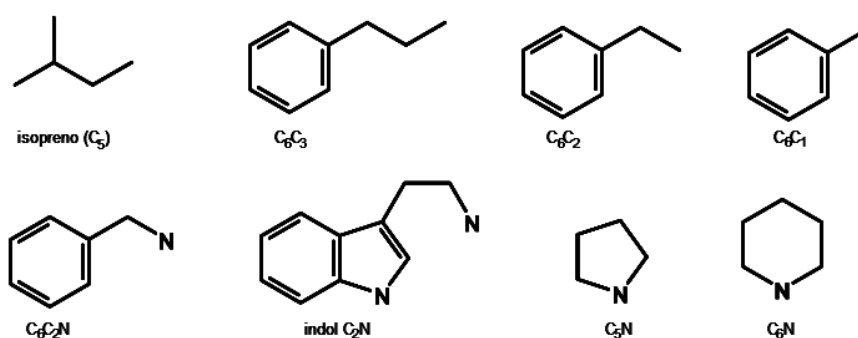


Figura 1. Unidades básicas formadoras dos metabólitos secundários (18).

As principais classes de metabólitos secundários são os ácidos fenólicos, flavonoides, ligninas, lignanas, cumarinas, alcaloides, terpenoides, taninos, antraquinonas, esteróis (17,19). Neste trabalho, serão destacados os compostos fenólicos, mais especificamente flavonoides e ácidos fenólicos, de importância em alimentos, e especialmente em citros.

Os compostos fenólicos tem estrutura constituída por um ou mais anéis aromáticos contendo um ou mais grupos hidroxila, sendo principalmente classificados como ácidos fenólicos (ácidos gálico, ferúlico, cumárico, entre outros) e polifenóis (flavonoides, taninos, ligninas, lignanos, entre outros) (19).

Os ácidos fenólicos são subclassificados em ácidos benzóicos, que

possuem estrutura C_6C_1 , e ácidos cinâmicos ou fenilpropanoides, de estrutura C_6C_3 . São formados pela via do chiquimato, provenientes diretamente do ácido chiquímico (ácidos gálico e protocatecuíco) e por meio dos intermediários fenilalanina (ácido cinâmico) e tirosina (ácido *p*-cumárico). Nas plantas, estão presentes na forma livre ou conjugada, e também atuam como precursores para a formação de outros compostos, de estrutura mais complexa, como taninos (ácido gálico), lignanas e ligninas (ácidos *p*-cumárico, ferúlico e sinápico) (17-19). A estrutura básica dos ácidos benzóicos e cinâmicos está apresentada na Figura 2.

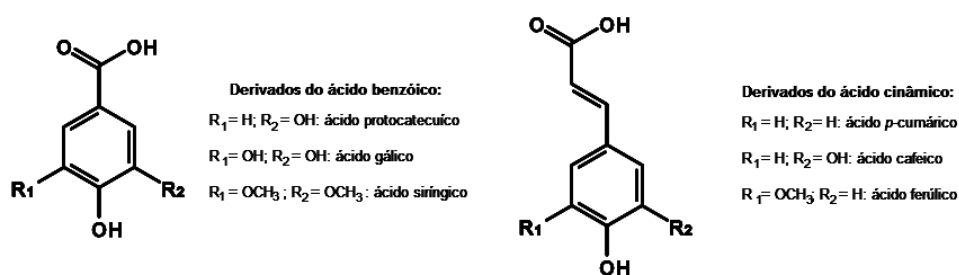


Figura 2. Estrutura básica dos ácidos fenólicos.

Os flavonoides são a principal classe de polifenóis. São metabólitos secundários derivados das vias do chiquimato e do acetato, organizados em cadeia $C_6C_3C_6$, e formados a partir da combinação do cumaroil coenzima A (C_6C_3) com três unidades de malonil coenzima A (C_3), e cuja estrutura está representada na Figura 3. Tanto a unidade heterocíclica quanto os anéis aromáticos pode sofrer substituições; os substituintes do heterociclo determinam as classes de flavonoides, enquanto os substituintes dos anéis aromáticos representam os diferentes compostos de cada classe (17-20).

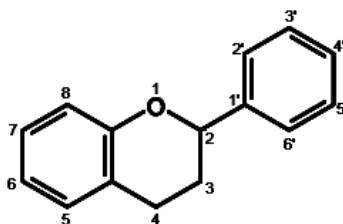


Figura 3. Estrutura básica dos flavonoides.

Os flavonoides são subclassificados em flavanonas, flavonas (incluindo as polimetoxiflavonas), isoflavonas e antocianidinas. Os flavonoides ocorrem na forma metoxilada, hidroxilada, e conjugada a C- ou O-glicosídeos. Na natureza, estão sob a forma de agliconas ou glicosídeos, quando conjugados a mono ou dissacarídeos. As flavanonas são a primeira classe de flavonoides formada durante o metabolismo, que dá origem às outras, e são a principal classe de flavonoides dos citros (18,20-22). As classes de flavonoides estão apresentadas na Figura 4.

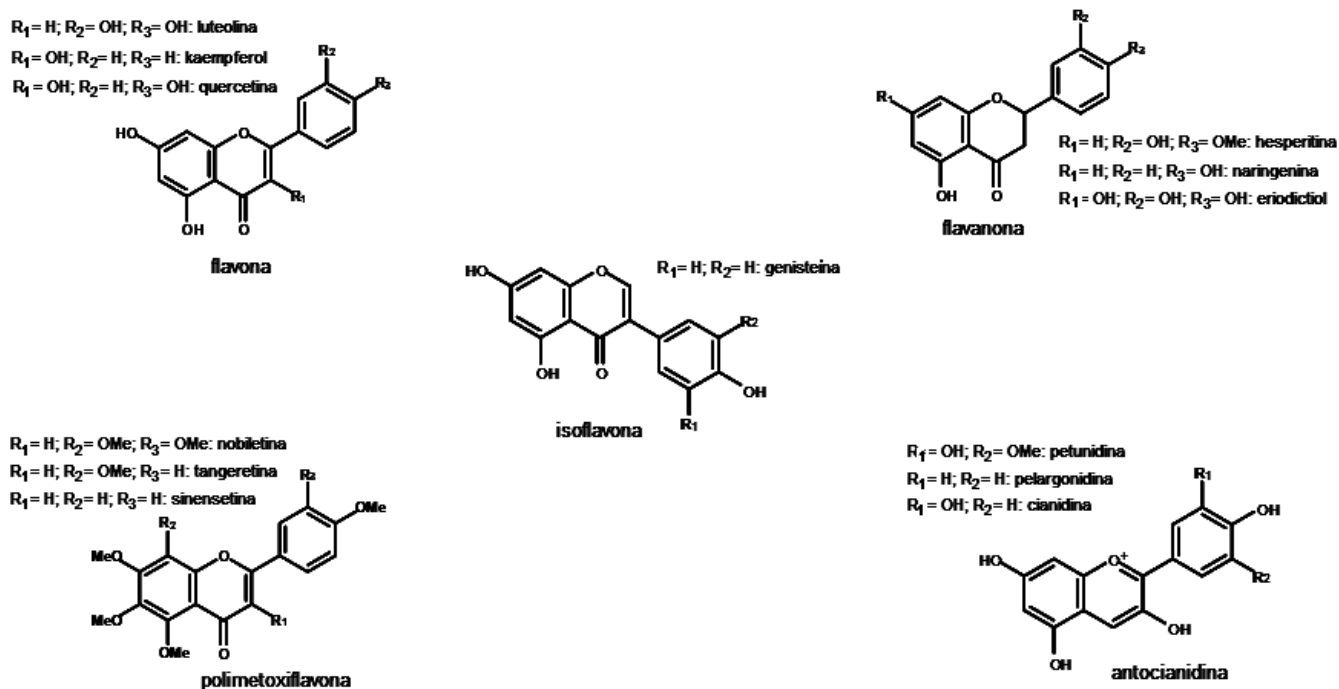


Figura 4. Classes dos flavonoides (22).

5. Flavonoides em citros

Os flavonoides estão presentes em diversas espécies de citros, laranjas doces e azedas, tangerinas, limões, limas, pomelos, tangores e tangelos, tanto na fruta quanto no suco e outros subprodutos. Dentre as agliconas, as principais flavanonas são a naringenina e a hesperitina, presentes na casca e nas sementes, e ausentes no suco de citros. Os principais glicosídeos de flavanonas são a narirutina e a neohesperidina, e a hesperidina e naringina, presentes no suco de laranjas, limas, limões, tangerinas e pomelos (Figura 5). O tipo de açúcar conjugado é a maior diferença entre os flavonoides glicosilados; a rutinose e a neohesperidose são os diglicosídeos mais comumente presentes nas flavanonas (20-24).

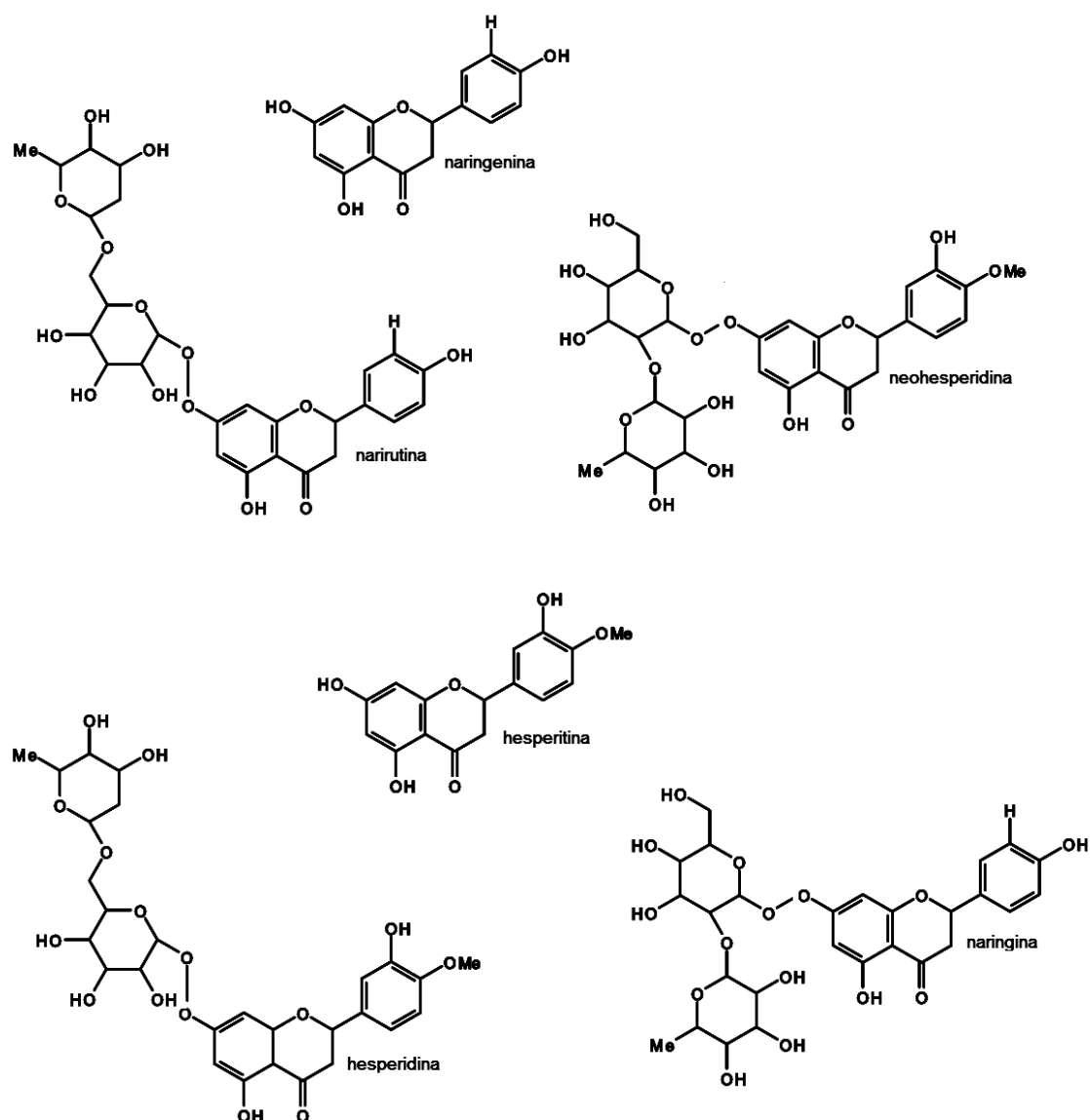


Figura 5. Principais agliconas e glicosídeos de citros (23).

As flavonas, em especial as polimetoxiflavonas, também estão presentes nos citros, embora em menor quantidade. Nobiletina, sinensetina, heptametoxiflavona e tangeretina estão presentes na casca e no suco de laranjas (21).

6. Propriedades dos compostos fenólicos

Os compostos fenólicos apresentam bioatividade, cujo principal mecanismo está relacionado à atividade antioxidante, capaz de estabilizar as espécies reativas produzidas no organismo pelo estresse oxidativo celular. Estes compostos são capazes de reduzir, a partir de seus grupos fenólicos, os radicais formados, estabilizando-os e inibindo as reações destes com os componentes celulares. Ainda, são capazes de atuar sobre o processo inflamatório por meio da modulação de enzimas e da inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias e de óxido nítrico (22-28).

O consumo de frutas cítricas vem sendo associado à redução do risco de doenças crônico-degenerativas, como câncer, diabetes e doenças cardiovasculares, o que está relacionado à presença de compostos antioxidantes, principalmente vitamina C, flavonoides e carotenoides (22,24,25,30-32).

7. Análise de compostos fenólicos

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é a técnica analítica mais largamente utilizada para a determinação de compostos fenólicos em diferentes matrizes, sobretudo em alimentos. O emprego de colunas de fase reversa, detectores de arranjo de diodos (CLAE-DAD) e de espectrometria de massas (CLAE-EM e CLAE-EM-EM) é bastante usual, assim como o uso de solventes polares e ácidos. Para a separação de compostos com diferentes polaridades e estruturas diversas, é necessário utilizar o modo gradiente. Devido à presença do núcleo fundamental e de substituintes específicos, o espectro de absorção UV/Vis dos flavonoides é característico para cada classe,

usualmente com duas bandas de absorção, entre 240-280 nm (absorção máxima; banda I) e entre 300-380 nm (banda II). Mais especificamente, as flavanonas apresentam absorção máxima entre 275-290 nm (banda I), com ombro de 320-340 nm (banda II), enquanto as flavonas apresentam absorção máxima entre 245-260 nm (banda I), e absorção também entre 350 e 380 nm (banda II). A variação entre as estruturas dentro de uma mesma classe de flavonoides fornece variações discretas de espectro, com efeitos hipsocrômicos ou batocrômicos, de acordo com os substituintes dos anéis aromáticos, o que, entretanto, não é suficiente para a diferenciação estrutural. Os espectros de massas (EM e EM-EM) dos flavonoides também são característicos da estrutura básica e dos núcleos comuns entre as classes. A quebra de ligações produz fragmentos específicos para os glicosídeos e para as agliconas. O uso da espectrometria de massas facilita a elucidação estrutural dos flavonoides e confirmação de identidade (21,33).

Existem diversos estudos sobre a composição e o teor de compostos fenólicos de citros, sobretudo flavanonas, disponíveis na literatura. Foram estudadas laranjas doces (*C. sinensis*) das variedades Salustiana, Maltaise, Sanguinello, Valencia, Navel, Washington Sanguinello, Thomson, Hamlin, Shamouti, Pera, Cara-Cara, Baía, Lima, Moro e Tarocco, laranjas azedas (*C. aurantium* e *C. bergamia*), toranjas (*C. paradisi*), limas e limões, além de outros citros resultantes de cruzamentos entre essas espécies. Vale ressaltar que muitos estudos não especificam as variedades estudadas (21,25).

De maneira geral, as flavanonas são a classe mais abundante, das quais a hesperidina e narirutina, e naringina e neohesperidina são os compostos mais importantes, presentes principalmente em laranjas doces e azedas,

respectivamente. Eriocitrina, didimina, poncirina e neoeriocitrina também foram identificadas em laranjas e sucos de laranja das diferentes espécies supracitadas, e estão presentes em quantidades menores (20,21,23).

Os dados disponíveis sobre as flavonas tratam principalmente das polimetoxiflavonas nobiletina, sinensetina, heptametoxiflavona e tangeretina, também presentes em todas as espécies e variedades de citros supracitadas, de acordo com Gattuso et al. (21). Em relação aos ácidos fenólicos, os dados disponíveis são mais escassos. Rapisarda et al. (34,35) identificaram os ácidos sinápico, cumárico, ferúlico e cafeico em suco de laranjas doces das variedades Moro, Sanguinello, Tarocco, Valencia, Washington Navel, Naveline e Ovale calabrese. Gil-Izquierdo et al. (36) identificaram derivados dos ácidos sinápico, cafeico, ferúlico e cumárico em sucos de laranja Navel.

Embora existam estudos sobre os principais compostos fenólicos de citros e seus teores nas frutas e no suco, ainda existe uma grande lacuna com relação à diversidade de compostos fenólicos presentes, o que corrobora a necessidade de estudos que avaliem o perfil de compostos fenólicos dos citros em função da variedade, da maturação, do cultivo e do processamento.

8. Conclusões

Os flavonoides e os ácidos fenólicos são os principais compostos fenólicos dos citros, com destaque para as flavanonas. As principais flavanonas de citros são hesperidina, narirutina, naringina e neohesperidina, presentes em quantidades variadas no suco, na fruta e na casca.

A cromatografia líquida de alta eficiência, em fase reversa e modo gradiente, é a técnica mais utilizada para a determinação de compostos

fenólicos, com a utilização de detectores de arranjo de diodos e espectrometria de massas. Os estudos disponíveis na literatura avaliam apenas as principais flavanonas de citros, sem considerar outros compostos fenólicos importantes, o que torna necessária a realização de estudos que avaliem o perfil e os níveis destes compostos.

9. Referências

- (1) Fundo de Defesa da Citricultura. Revista do citricultor. São Paulo: Fundecitrus; 2017. 15 p.
- (2) Neves MF, Trombin VG, Milan P, Lopes FF, Cressoni F, Kalaki R. O retrato da citricultura brasileira. São Paulo: Markestrat; 2010. 138 p.
- (3) United States Department of Agriculture. Brazil: Citrus annual. Florida: GAIN Report; 2016. 12 p.
- (4) Mastello RB, Janzantti NS, Monteiro M. Volatile and odoriferous compounds changes during frozen concentrated orange juice processing. Food Res Int. 2015; 77: 591-598.
- (5) Janzantti NS, Santos GC, Monteiro M. Shelf life of fresh and pasteurized organic passion fruit (*Passiflora edulis* F. *Flavicarpa* deg.) pulp. J Food Proces Preserv. 2012; 38(2014): 262-270.
- (6) Queiroz CE, Menezes HC. Suco de laranja. In: Bebidas não alcoólicas- Ciência e Tecnologia. São Paulo: Edgard Blücher, 2010. p. 243-265.
- (7) Macoris MS, De Marchi R, Janzantti NS, Monteiro M. The influence of ripening stage and cultivation system on the total antioxidant activity and total phenolic compounds of yellow passion fruit pulp. J Sci Food Agric. 2011; 92: 1886-1891.

- (8) Baldwin EA, Scott JW, Shewmaker CK, Schuch W. Flavor trivia and tomato aroma: biochemistry and possible mechanisms for control of important aroma components. Hort Science. 2000; 35(6): 1013-1022.
- (9) Conselho Brasileiro de Produção Orgânica e Sustentável. Consumo de produtos orgânicos no Brasil [Cited 2017 Sep 21] Available from: https://www.organicnewsbrasil.com.br/wp-content/uploads/2017/06/Pesquisa-Consumo-de-Produtos-Org__nicos-no-Brasil-Palestra-07Jun-1.pdf
- (10) Brasil Food Trends 2020. [Cited 2017 Sep 18] Available from: <http://www.brasilfoodtrends.com.br/publicacao.html>
- (11) International Federation of Organic Agriculture Movements. Organic Basics [Cited 2017 Sep 22] Available from: <https://www.ifoam.bio/en/our-library/organic-basics>
- (12) Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Orgânicos [Cited 2017 Sep 22] Available from: <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/sustentabilidade/organicos>
- (13) Santos GC, Monteiro M. Sistema orgânico de produção de alimentos. Alim Nutr. 2004; 15(1): 73-86.
- (14) International Federation of Organic Agriculture Movements. Annual Report 2016. Cologne: IFOAM; 2016. 24 p.
- (15) International Federation of Organic Agriculture Movements. Annual Report 2015. Cologne: IFOAM; 2015. 24 p.
- (16) Food and Agriculture Organization of the United Nations. World markets for organic citrus and citrus juices. Rome: FAO; 2003. 30 p.
- (17) Simões CMO. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 3a ed. Florianópolis: UFSC; 2010. 883 p.

- (18) Dewick PM. Medicinal natural products: a biosynthetic approach. 2nd ed. West Sussex: John Wiley & Sons, Ltd; 2002. 514 p.
- (19) Shahidi F, Naczki M. Phenolics in foods and nutraceuticals. 3rd ed. Florida: CRC Press; 2006. 575 p.
- (20) Khan MK, Huma ZE, Dangles O. A comprehensive review on flavanones, the major citrus polyphenols. J Food Compos Anal. 2014; 33: 85-104.
- (21) Gattuso G, Barreca D, Gargiulli C, Leuzzi U, Caristi C. Flavonoid composition of citrus juices. Molecules. 2007; 12: 1641-1673.
- (22) Tripoli E, La Guardia M, Giammanco S, Di Majo D, Giammanco M. *Citrus* flavonoids: molecular structure, biological activity and nutritional properties: a review. Food Chem. 2007; 104: 466-479.
- (23) Peterson JJ, Dwyer JT, Beecher GR, Bhagwat AS, Gebhardt SE, Haytowitz DB et al. Flavanones in oranges, tangerines (mandarins), tangors, and tangelos: a compilation and review of the data from the analytical literature. J Food Compos Anal. 2006; 19: S66-S73.
- (24) Di Majo D, Giammanco M, La Guardia M, Tripoli E, Giammanco S, Finotti E. Flavanones in *Citrus* fruit: structure-antioxidant activity relationships. Food Res Int. 2005; 38: 1161-1166.
- (25) Barreca D, Gattuso G, Bellocco E, Calderaro A, Trombetta D, Smeriglio A et al. Flavanones: citrus phytochemical with health-promoting properties. BioFactors. 2017; 43(4): 495-506.
- (26) Zou Z, Xi W, Hu Y, Nie C, Zhou Z. Antioxidant activity of *Citrus* fruits. Food Chem. 2016; 196: 885-896.

- (27) Coutinho MAS, Muzitano MF, Costa SS. Flavonoides: potenciais agentes terapêuticos para o processo inflamatório. *Rev Virtual Quim.* 2009; 1(3): 241-256.
- (28) Nijveldt RJ, Van Nood R, Van Hoorn DEC, Boelens PG, Van Norren K, Van Leeuwen PAM. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am J Clin Nutr.* 2001; 74: 418-425.
- (29) Apetekmann NP, Cesar TB. Long-term orange juice consumption is associated with low LDL-cholesterol and apolipoprotein B in normal and moderately hypercholesterolemic subjects. *Lipids Health Dis.* 2013; 12(119): 1-10.
- (30) Medina-Remón A, Estruch R, Tresserra-Rimbau A, Vallverdú-Queralt A, Lamuela-Raventós R. The effect of polyphenol consumption on blood pressure. *Mini Rev Med Chem.* 2013; 13: 1137-1149.
- (31) Lima CG, Basile LG, Silveira JQ, Cesar TB. Ingestão regular de suco de laranja vermelha reduz pressão arterial de adultos. *J Health Sci Inst.* 2012; 30: 50-63.
- (32) Roza JM, Xian-Liu Z, Guthrie N. Effect of citrus flavonoids and tocotrienols on serum cholesterol levels in hypercholesterolemic subjects. *Altern Ther Health Med.* 2007; 13(6):.44-48.
- (33) Barreca D, Bellocco E, Caristi C, Leuzzi U, Gattuso G. Distribution of C- and O-glycosyl flavonoids, (3-hydroxy-3-methylglutaryl)glycosyl flavanones and furocoumarins in *Citrus aurantium* L. juice. *Food Chem.* 2011; 124: 576-582.
- (34) Rapisarda P, Carollo G, Fallico B, Tomaselli F, Maccarone E. Hydroxycinnamic acids as markers of italian blood orange juices. *J Agric Food Chem.* 46: 464-470.

- (35) Rapisarda P, Tomaino A, Lo Cascio R, Bonina F, De Pasquale A, Saija A. Antioxidant effectiveness as influenced by phenolic content of fresh orange juices. *J Agric Food Chem.* 1999; 47: 4718-4723.
- (36) Gil-Izquierdo A, Gil MI, Ferreres F, Tomás-Barberán FA. In vitro availability of flavonoids and other phenolics in orange. *J Agric Food Chem.* 2001; 49: 1035-1041.

Capítulo 2.

Simultaneous HPLC determination of flavonoids and phenolic acids profile in Pêra-Rio orange juice

Artigo publicado no periódico *Food Research International*

E. Mesquita, M. Monteiro, Simultaneous HPLC determination of flavonoids and phenolic acids profile in Pêra-Rio orange juice, Food Research International, Volume 106, 2018, Pages 54-63, ISSN 0963-9969, <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.12.025>.



Contents lists available at ScienceDirect

Food Research International

journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodres

Simultaneous HPLC determination of flavonoids and phenolic acids profile in Pêra-Rio orange juice

Mesquita E., Monteiro M.*

Department of Food and Nutrition, School of Pharmaceutical Science, São Paulo State University, UNESP, 14800-903 Araraquara, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Phenolic compounds
HPLC-DAD
Validation
Organic orange juice
Flavonoids
Phenolic acids

ABSTRACT

The aim of this study was to develop and validate an HPLC-DAD method to evaluate the phenolic compounds profile of organic and conventional Pêra-Rio orange juice. The proposed method was validated for 10 flavonoids and 6 phenolic acids. A wide linear range ($0.01\text{--}223.4\ \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$), good accuracy (79.5–129.2%) and precision ($\text{CV} \leq 3.8\%$), low limits of detection ($1\text{--}22\ \text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$) and quantification ($0.7\text{--}7.4\ \mu\text{g}$), and overall ruggedness were attained. Good recovery was achieved for all phenolic compounds after extraction and cleanup. The method was applied to organic and conventional Pêra-Rio orange juices from beginning, middle and end of the 2016 harvest. Flavones rutin, nobiletin and tangeretin, and flavanones hesperidin, narirutin and eriocitrin were identified and quantified in all organic and conventional juices. Identity was confirmed by mass spectrometry. Nineteen non-identified phenolic compounds were quantified based on DAD spectra characteristic of the chemical class: 7 cinnamic acid derivatives, 6 flavanones and 6 flavones. The phenolic compounds profile of Pêra-Rio orange juices changed during the harvest; levels increased in organic orange juices, and decreased or were about the same in conventional orange juices. Phenolic compounds levels were higher in organic ($0.5\text{--}1143.7\ \text{mg}\cdot 100\ \text{g}^{-1}$) than in conventional orange juices ($0.5\text{--}689.7\ \text{mg}\cdot 100\ \text{g}^{-1}$). PCA differentiated organic from conventional FS and NFC juices, and conventional FCOJ from conventional FS and NFC juices, thus differentiating cultivation and processing.

1. Introduction

Orange is the main fruit produced in Brazil, with ca 450 million boxes in 2017. The majority of oranges are delivered for NFC (Not From Concentrate) and FCOJ (Frozen Concentrated Orange Juice) production and exportation. Of the total 1.01 million ton juice produced in 2016, 921,000 ton were from São Paulo, of which 699,000 ton FCOJ and 222,000 ton NFC (FCOJ equivalent). The prediction is 848,000 ton in 2017, 771,000 from São Paulo; 531,000 ton FCOJ and 240,000 ton NFC (FCOJ equivalent). More than 80% of the juice is exported to Europe and the USA (Fundecitrus, 2017; Neves et al., 2010; USDA, 2016).

Organic citrus fruit represents 0.9% of the total worldly production; amongst it, oranges are the most cultivated fruit and orange juice is the main organic product. Latin America holds the biggest area of organic cultivation in the world (ca 15,000 ha), where Brazil has a strong position as a producer and a potential consumption market (FAO, 2003; IFOAM, 2015).

There is still very little knowledge about the influence of the cultivation system on food quality, despite the increasing consumption of organic foods especially by environment-friendly and health-conscious

consumers (Janzantti, Santos, & Monteiro, 2012; Macoris, De Marchi, Janzantti, & Monteiro, 2011; Macoris, Janzantti, Garruti, & Monteiro, 2011; Santos & Monteiro, 2004). It is necessary to assess organic foods from the chemical, nutritional and sensory points of view, to evaluate the characteristics and verify the potential health benefits associated with consumption.

Orange juice consumption has been associated with health benefits, mainly related to modulation of the human metabolism, and anti-oxidant and anti-inflammatory activities, which prevent chronic-degenerative diseases such as cardiovascular diseases, diabetes and cancer. Orange juice is a dietary source of ascorbic acid, and also contains flavonoids and phenolic acids, which highly prevent oxidative stress (Barreca et al., 2017; Khan, Huma, & Dangles, 2014; Medina-Remon, Estruch, Tresserra-Rimbau, Vallverdú-Queralt, & Lamuela-Raventos, 2013; Peterson et al., 2006; Tripoli, La Guardia, Giammanco, Di Majo, & Giammanco, 2007).

The phenolic composition of orange juice is influenced by the variety and maturity of the fruit, edaphoclimatic conditions, cultivation system, post-harvest and processing conditions (Baldwin, Scott, Shewmaker, & Schuch, 2000; Haard, 1984; Macoris, De Marchi, et al.,

* Corresponding author.

E-mail address: monteiro@fcar.unesp.br (M. Monteiro).

<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.12.025>

Received 11 October 2017; Received in revised form 8 December 2017; Accepted 12 December 2017

Available online 14 December 2017

0963-9969/ © 2017 Published by Elsevier Ltd.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os flavonoides e os ácidos fenólicos são os principais compostos fenólicos dos citros, com destaque para as flavanonas. As principais flavanonas de citros são hesperidina, narirutina, naringina e neohesperidina, presentes em quantidades variadas no suco, na fruta e na casca de diferentes citros.

A cromatografia líquida de alta eficiência, em fase reversa e modo gradiente, é a técnica mais utilizada para a determinação de compostos fenólicos, com a utilização de detectores de arranjo de diodos e espectrometria de massas. Os estudos disponíveis na literatura avaliam apenas as principais flavanonas de citros, sem considerar outros compostos fenólicos importantes, o que torna necessária a realização de estudos que avaliem o perfil e os níveis destes compostos.

Foi desenvolvido e validado um método empregando CLAE-DAD para a determinação do perfil de compostos fenólicos do suco de laranja Pêra-Rio. Linearidade, faixa linear ampla para a aplicação proposta, boa precisão e exatidão, baixos limites de detecção e quantificação e robustez foram obtidas. O procedimento de extração e limpeza também mostrou recuperação suficiente para todos os compostos fenólicos avaliados.

Hesperidina, narirutina, eriocitrina, nobiletina, rutina e tangeretina foram identificadas, com sua identidade confirmada por espectrometria de massas, e quantificadas em todos os sucos orgânicos e convencionais da safra de 2016. Derivados de ácido cinâmico (7), flavanonas (6) e flavonas (6) foram tentativamente identificados pela classe. Houve alterações no perfil de compostos fenólicos de suco de laranja orgânico e convencional durante a

safra, e os níveis nos sucos orgânicos foram mais elevados do que nos sucos convencionais.

A análise de componentes principais foi capaz de diferenciar os sucos recém-extraído e NFC orgânicos e o FCOJ convencional dos demais sucos convencionais, possibilitando assim a separação por cultivo e processamento. Os sucos orgânicos da safra de 2016 foram caracterizados por níveis mais elevados de flavanonas e flavonas.

REFERÊNCIAS

- (1) Fundo de Defesa da Citricultura. Revista do citricultor. São Paulo: Fundecitrus; 2017. 15 p.
- (2) United States Department of Agriculture. Brazil: Citrus annual. Florida: GAIN Report; 2016. 12 p.
- (3) Neves MF, Trombin VG, Milan P, Lopes FF, Cressoni F, Kalaki R. O retrato da citricultura brasileira. São Paulo: Markestrat; 2010. 138 p.
- (4) International Federation of Organic Agriculture Movements. Annual Report 2015. Cologne: IFOAM; 2015. 24 p.
- (5) Food and Agriculture Organization of the United Nations. World markets for organic citrus and citrus juices. Rome: FAO; 2003. 30 p.
- (6) Santos GC, Monteiro M. Sistema orgânico de produção de alimentos. Alim Nutr. 2004; 15(1): 73-86.
- (7) Apetekmann NP, Cesar TB. Long-term orange juice consumption is associated with low LDL-cholesterol and apolipoprotein B in normal and moderately hypercholesterolemic subjects. Lipids Health Dis. 2013; 12(119): 1-10.

- (8) Medina-Remón A, Estruch R, Tresserra-Rimbau A, Vallverdú-Queralt A, Lamuela-Raventós R. The effect of polyphenol consumption on blood pressure. *Mini Rev Med Chem*. 2013; 13: 1137-1149.
- (9) Haard NF. Postharvest physiology and biochemistry of fruits and vegetables. *J Chem Educ*. 1984; 61(4): 277-283.
- (10) Baldwin EA, Scott JW, Shewmaker CK, Schuch W. Flavor trivia and tomato aroma: biochemistry and possible mechanisms for control of important aroma components. *Hort Science*. 2000; 35(6): 1013-1022.
- (11) Macoris MS, De Marchi R, Janzantti NS, Monteiro M. The influence of ripening stage and cultivation system on the total antioxidant activity and total phenolic compounds of yellow passion fruit pulp. *J Sci Food Agric*. 2011; 92: 1886-1891.
- (12) Gattuso G, Barreca D, Gargiulli C, Leuzzi U, Caristi C. Flavonoid composition of citrus juices. *Molecules*. 2007; 12: 1641-1673.
- (13) Peterson JJ, Dwyer JT, Beecher GR, Bhagwat AS, Gebhardt SE, Haytowitz DB et al. Flavanones in oranges, tangerines (mandarins), tangors, and tangelos: a compilation and review of the data from the analytical literature. *J Food Compos Anal*. 2006; 19: S66-S73.
- (14) Khan MK, Huma ZE, Dangles O. A comprehensive review on flavanones, the major citrus polyphenols. *J Food Compos Anal*. 2014; 33: 85-104.