

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

**COMPOSTOS BIOATIVOS EM
FRUTAS CÍTRICAS:
QUANTIFICAÇÃO, AVALIAÇÃO DA
ATIVIDADE ANTIOXIDANTE,
PARÂMETROS DE COR E EFEITO
DA PASTEURIZAÇÃO**

LÍLIAN MARIA MOURA
Bióloga
Mestre em Ciência dos Alimentos

Profa. Dra. Célia Maria de Sylos
Orientadora

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
2010

Ficha Catalográfica

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

M929c Moura, Lilian Maria
Compostos bioativos em frutas cítricas: quantificação, avaliação da atividade antioxidante, parâmetros de cor e efeito da pasteurização / Lilian Maria Moura. – Araraquara, 2011
142 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. Flavanonas. 3. Carotenóides. 4. Constituintes bioativos. 5. Laranjas de póla vermelha. I. Sylos, Célia Maria, orient. II. Título.

CAPES: 50700006

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Célia Maria de Sylos

Prof^a. Dr^a. Samara Ernandes

Prof. Dr. Rodrigo Rocha Latado

Prof. Dr. João Bosco Faria

Prof^a. Dr^a. Thais Borges Cesar

À minha mãe Leonice pelo amor incondicional e pelo exemplo de força nos
momentos mais difíceis,

Ao meu marido Juliano, meu amor, por incentivar-me na busca de novos
conhecimentos e pela paciência em se privar de muitos momentos ao meu
lado,

À meiga Thainá, que apareceu sem querer em minha vida, conquistou meu
coração e tem ensinado lição de vida a todos que a rodeiam,

Aos meus irmãos, pela felicidade em minhas conquistas,

À Deus pelos ensinamentos, proteção e bençãos.

E ao meu doce e eterno pai Edson...
Que não viu o final deste trabalho que com certeza era seu maior orgulho.
Que jamais mediu esforços para minha realização e que, muitas vezes,
abdicou de seus sonhos para que eu pudesse realizar o meu.
À você, dedico minha vida, meu amor e meu eterno carinho e gratidão.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Célia Maria de Sylos, pela paciência e atenção, proporcionando através do convívio, uma grande amizade.

Ao Centro Apta Citros Sylvio Moreira/IAC pelo fornecimento das amostras para a realização deste trabalho, em especial, ao Rodrigo Rocha Latado.

Aos membros da banca examinadora por terem aceitado participar e por colaborar na melhoria deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Elizeu A. Rossi e à Profa. Dra. Thais Borges Cesar, pelas ricas contribuições no Exame Geral de Qualificação.

Aos meus colegas Mateus, Camila, Priscila, Laura, Alexandra, Juliana, Maria Fernanda e todos os outros que conviveram comigo, pelo companheirismo, apoio e cumplicidade durante estes anos.

A todos os colegas do Departamento de Alimentos e Nutrição da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, UNESP, especialmente, Elizene, Maraiza, Roseli e Adriana, pelo auxílio e amizade.

Aos funcionários da Secretaria da Pós-Graduação e Biblioteca, pela satisfação e disposição em ajudar.

Ao laboratório de Química de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos (Unicamp) pelas análises de parâmetros de cor.

À CNPQ (476118/20007-7)- Projeto: Quantificação de Constituintes Bioativos e Atividade Antioxidante em Frutas Cítricas e Estocagem de Sucos Cítricos.

A Citrosuco pelo processamento do suco de laranja.

Às minhas sobrinhas Ana Catarina e Angelina, por fazerem minha vida ser mais feliz e completa.

SUMÁRIO

RESUMO.....	1
ABSTRACT	3
INTRODUÇÃO GERAL	5
OBJETIVOS	8
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	9
CAPÍTULO 1 –	11
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	
Classificação das Frutas Cítricas	12
Propriedades Antioxidantes Presentes em Frutas Cítricas	14
Agentes Antioxidantes.....	15
2.1.1. Método DPPH•.....	17
2.1.2. Método ABTS•.....	18
Compostos Fenólicos.....	19
Flavonóides.....	21
Carotenóides	23
Ácido Ascórbico (Vitamina C).....	27
Parâmetros de Cor CIELAB	29
Medição de Cor pelo Sistema CIELAB	29
Referências Bibliográficas.....	33
CAPÍTULO 2-	40
DETERMINATION OF BIOACTIVE COMPOUNDS AND RADICAL SACAVENGING ACTIVITY OF GRAPEFRUIT, PERSIAN LIME, SICILIAN LEMON AND HAMLIN CULTIVATED IN BRAZIL	
Abstract.....	41
1-Introduction	42

2-Materials and Methods	43
2.1-Chemicals	43
2.2-Citrus varieties samples.....	44
2.3- Titratable acidity (TA)	44
2.4- Total soluble solids (TSS)	44
2.5- Ascorbic acid (AA)	44
2.6- Total phenolics	45
2.7- Total flavonoids	45
2.8- Total carotenoids	46
2.9- Free radical scavenging activity	46
2.9.1- Extraction	46
2.9.2- Antioxidant Cactivity by DPPH• method	47
2.9.3- Antioxidant Cactivity by ABTS• method	47
2.10-Statistical analysis	47
3- Results and Discussion.....	48
3.1- Physicochemical characterization	48
3.2. Antioxidant Compound Contents	48
3.3. ABTS and DPPH Radical Scavenging Capacity	50
4- Conclusion.....	52
5- References	53
CAPÍTULO 3-	56
QUANTIFICAÇÃO DE CAROTENÓIDES E FLAVANONAS E DETERMINAÇÃO DA SUA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E COR EM FRUTAS CÍTRICAS.....	57
Resumo	58
Introdução	59
Material e Métodos	62

Amostras	62
Métodos	62
Determinação da cor	62
Extração dos carotenóides	63
Determinação do teor dos carotenóides por CLAE	63
Determinação do teor das flavanonas glicosídicas (FGs)	64
Análise estatística	65
Resultados e discussão	65
Medida da cor	65
Conteúdo de Carotenóides por CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência)	66
Conteúdo de flavanonas glicosídicas (FGs)	68
Conclusões.....	71
Referências	72
CAPÍTULO 4-	75
DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E CONSTITUINTES BIOATIVOS EM LARANJAS DE POLPA VERMELHA	
Resumo	76
Introdução.....	77
Material e Métodos.....	79
Amostras	79
Métodos	79
Determinação de sólidos solúveis totais (SST), de acidez titulável total (ATT) e do ratio	79
Determinação de ácido ascórbico (AA)	79
Determinação de compostos fenólicos	80
Determinação do teor de flavonóides totais	80

Atividade Sequestrante do Radical Livre	80
Extração para os métodos DPPH• e ABTS•	80
Determinação da atividade antioxidante pelo método de DPPH•	80
Determinação da atividade antioxidante pelo método de ABTS•	81
Análise estatística	81
Resultados e Discussão.....	82
Sólidos solúveis totais (SST), de acidez titulável total (ATT) e do ratio	82
Ácido ascórbico, fenólicos totais, flavonóides totais e carotenóides totais.....	83
Atividade Antioxidante por DPPH• e ABTS•	87
Conclusão	89
Referências	90
CAPÍTULO 5-	92
CAROTENÓIDES E FLAVANONAS E PARÂMETROS DE COR EM LARANJAS DE POLPA VERMELHA	92
Resumo	93
Introdução.....	94
Material e Métodos.....	96
Amostras	96
Métodos	96
Determinação da cor.....	96
Extração dos carotenóides	97
Determinação do teor dos carotenóides por CLAE	97
Deteminação do teor das flavanonas glicosídicas (FGs)	98
Análise estatística	98
Resultados e Discussão.....	99

Conteúdo de Carotenóides por CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência)	103
Conteúdo de flavanonas glicosídicas (FGs)	106
Análise de Componentes Principais (ACP)	107
Conclusões	112
Referências	113
CAPÍTULO 6-	115
EFEITO DO PROCESSO DE OBTENÇÃO DE SUCO DE LARANJA VERMELHA SOBRE SEUS COMPOSTOS ANTIOXIDANTES, CAPACIDADE SEQUESTRANTE DOS RADICAIS DPPH• E ABTS• E PARÂMETROS DE COR	115
Resumo	116
Introdução	117
Material e Métodos	119
Amostras	119
Métodos	119
Determinação da cor	119
Determinação de compostos fenólicos	119
Determinação do teor de flavonóides totais	120
Extração dos carotenóides Totais	120
Determinação do teor dos carotenóides por CLAE	120
Determinação do teor das flavanonas glicosídicas (FGs) por CLAE	121
Análise estatística	122
Resultados e Discussão	122
Sólidos Solúveis Totais (SST), Acidez Total Titulável (ATT), ratio, Fenólicos Totais, Flavonóides Totais e Carotenóides Totais	122
Atividade antioxidante dos sucos pelos métodos DPPH• e ABTS•	125

Medida da cor	126
Análise de Componentes Principais (ACP)	128
Conteúdo de flavanonas glicosídicas (FGs)	131
Conteúdo de Carotenóides por CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência)	135
Conclusão	138
Referências	138

RESUMO

As frutas cítricas são muito consumidas e apreciadas, não só devido ao seu paladar agradável como também ao valor nutricional que possuem. O Brasil é o maior produtor e exportador mundial de laranjas, suco de laranja concentrado congelado e de suco de laranja pasteurizado (NFC - Not From Concentrated), sendo o estado de São Paulo o maior produtor. Já outras frutas cítricas como limão Siciliano, Grapefruit e Lima da Pérsia possuem uma produção nacional ainda pequena e parte do consumo interno é importada. Outro grupo de laranjas ainda pouco estudado é o das laranjas de polpa vermelha que apresentam o carotenóide licopeno na sua composição. Os compostos antioxidantes (carotenóides, compostos fenólicos, flavonóides) apresentam atividade anti-radical livre e alguns deles também são responsáveis pela cor das frutas. Considerando a importância das frutas cítricas com relação aos seus benefícios para a saúde, os objetivos deste trabalho foram avaliar a atividade anti-radical livre (DPPH• e ABTS•), compostos bioativos (carotenóides, flavanonas e ácido ascórbico) e parâmetros de cor de quatro variedades de frutas cítricas de polpa clara (Lima da Pérsia, *Grapefruit*, Limão Siciliano e Hamlin); comparar estes mesmos parâmetros entre duas variedades de polpa vermelha (Sanguíneas de Mombuca e baía Cara Cara) e uma de polpa clara (Pera Rio), colhidas no início, meio e fim de safra; e verificar o efeito da pasteurização nos compostos bioativos presentes no suco de laranja de polpa vermelha e de clara. As variedades Baía Cara Cara (CN486) e Pera Rio foram cultivadas na cidade Cordeirópolis/SP e a Sanguínea de Mombuca (CV 93) em três diferentes cidades do Estado de São Paulo, São Bento do Sapucaí, Cordeirópolis e Mogi Mirim. A variedade limão Siciliano apresentou o maior teor de ácido ascórbico (78,86mg), *Grapefruit* e Hamlin apresentaram o maior conteúdo de carotenóides totais das quatro frutas (13,58 e 11,32µg/mL) e a capacidade antioxidante foi maior nas frutas que apresentaram melhores teores de carotenóides totais e compostos fenólicos. A hesperidina esteve presente em três dessas frutas e a eriocitrina foi encontrada no limão Siciliano (91,08mg/L). Para as laranjas vermelhas, concluiu-se que cada fruta cultivada em local diferente e colhida em época distinta possui constituintes específicos. A flavanona encontrada em maior quantidade nessas laranjas vermelhas foi a hesperidina com valores entre 121,07mg/L e 147,37mg/L para a produção de 2008 e 152,76mg/L e 169,27mg/L para a produção de 2009. Para os carotenóides β -caroteno, β -criptoxantina,

α -criptoxantina, luteína, violaxantina, a variedade Mombuca de Mogi Mirim nos anos de 2008 e 2009, (73,86 e 68,33 $\mu\text{g/L}$; 74,88 e 69,57 $\mu\text{g/L}$; 12,80 e 14,46 $\mu\text{g/L}$; 106,07 e 104,73 $\mu\text{g/L}$; 56,87 e 52,07 $\mu\text{g/L}$, respectivamente) demonstrou ser a fruta que apresentava os maiores teores em sua polpa relacionada às demais estudadas. O carotenóide licopeno foi encontrado apenas nas laranjas de polpa vermelha. A variedade Sanguínea de Mombuca cultivada em São Bento do Sapucaí apresentou média do carotenóide licopeno maior que as demais frutas estudadas tanto na produção de 2008 como na de 2009 (81,75 e 77,5 $\mu\text{g/L}$, respectivamente). Para os sucos, os valores de carotenóides totais se mostraram superiores antes do processo de pasteurização (fresco) e apenas as flavanonas hesperidina e narirutina foram identificadas nesses sucos. O teor de hesperidina encontrado nos sucos cítricos variou de 103,30 $\pm$ 2,23mg/L no suco Pêra fresco a 159,21 $\pm$ 7,88mg/L no suco de Mombuca fresco. Apenas o suco da variedade Sanguínea de Mombuca apresentou o carotenóide Licopeno com valores 82,90 $\mu\text{g/L}$ (suco não pasteurizado) e 107,60 $\mu\text{g/L}$ (suco pasteurizado) não presente na outra variedade.

Palavras-chave: frutas cítricas, laranjas de polpa vermelha, constituintes bioativos, carotenóides, flavanonas e atividade antioxidante.

ABSTRACT

Citrus fruits are widely consumed and enjoyed, not only because of its pleasant taste but also the nutritional value they have. Brazil is the largest producer and exporter of oranges, frozen concentrated orange juice (FCOJ) and orange juice NFC (Not from Concentrated), and the state of Sao Paulo largest producer. Yet other citrus fruits like lemon, grapefruit and Sweet Lime still have a small domestic production and share of domestic consumption is imported. Another group of oranges still less studied are the red pulp of oranges that have the carotenoid lycopene in its composition. The antioxidants (carotenoids, phenolic compounds, flavonoids) have anti-free radical activity and some of them are also responsible for the color of the fruit. Considering the importance of citrus fruits in relation to their health benefits, the objectives were to evaluate the anti-free radical (DPPH • and ABTS •), bioactive compounds (carotenoids, ascorbic acid, and flavanones) and parameters of color four varieties of citrus pulp clear (Sweet Lime, Grapefruit, Lemon and Hamlin), to compare these same parameters between two varieties of red pulp (of Blood and Mombuca Baía Cara Cara) and a clear pulp (Pera Rio) taken at the beginning, middle and end of harvest, and check the effect of pasteurization on bioactive compounds in orange juice pulp and red light. Varieties Baía Cara Cara (CN486) and Pear River were grown in the city Cordeirópolis / SP and Blood of Mombuca (CV 93) in three different cities of São Paulo, São Bento do Sapucaí, Cordeirópolis and Mogi Mirim. The Sicilian lemon variety had the highest content of ascorbic acid (78.86 mg), Grapefruit and Hamlin had the highest content of total carotenoids of the four fruits (13.58 and 11.32 mg / mL) and the antioxidant capacity was higher in fruit that had best levels of carotenoids and phenolic compounds. The hesperidin was present in three of these fruits and eriocitrina was found in the Sicilian lemon (91.08 mg / L). For the red oranges, it was concluded that each fruit grown and harvested in a different place in time has distinct specific constituents. The largest amount in flavanone found these red oranges was hesperidin with values between 121.07 mg / L and 147.37 mg / L for the production of 2008 and 152.76 mg / L and 169.27 mg / L for 2009 production. For the carotenoids β -carotene, β -cryptoxanthin, α -cryptoxanthin, lutein, violaxanthin, the variety of Mombuca Mogi Mirim in the years 2008 and 2009 (73.86 and 68.33 mg / L, 74.88 and 69 57 mg / L, 12.80 and 14.46 mg / L, 106.07 and 104.73 mg / L, 56.87 and 52.07 mg / L,

respectively) proved to be the fruit that had the highest levels in its pulp related to the other studied the carotenoid lycopene was detected only in the red pulp of oranges. The variety grown in Mombuca Blood of São Bento do Sapucaí carotenoid lycopene had a mean greater than all other fruits studied both in the 2008 production as in 2009 (81.75 and 77.5 $\mu\text{g} / \text{L}$, respectively). For juices, the amounts of carotenoids were higher than before the process of pasteurization (fresh) and flavanones hesperidin and only narirutina were identified in these juices. The content of hesperidin found in citrus juices ranged from $103.30 \pm 2.23 \text{ mg} / \text{L}$ in fresh pear juice to $159.21 \pm 7.88 \text{ mg} / \text{L}$ in the fresh juice Mombuca. Only the juice of the variety of Blood Mombuca showed the carotenoid lycopene values with 82.90 mg / L (unpasteurized juice) and 107.60 mg / L (pasteurized juice) which is absent in the other variety.

Keywords: Citrus, oranges red pulp, bioactive constituents, carotenoids and HPLC.

INTRODUÇÃO GERAL

As frutas e os vegetais são excelentes fontes de compostos bioativos e as frutas cítricas, importantes fontes de compostos com atividade antioxidante como ácido ascórbico, polifenóis (antioxidantes hidrofílicos) e carotenóides (antioxidantes lipofílicos). Conferem vários benefícios à saúde, prevenindo o desenvolvimento de desordens crônico-degenerativas, tais como cânceres, diabetes, doenças cardiovasculares, inflamações, catarata, degeneração macular e outras (JOHNSTON et al., 2002; ZULUETA et al., 2009).

A citricultura é um dos setores mais competitivos e de maior potencial de crescimento do agronegócio (NEVES e JANK, 2006). Com a maior parte de sua produção voltada ao mercado externo, a citricultura brasileira traz, anualmente, mais de US\$ 1,0 - 1,5 bilhão em divisas para o Brasil, sendo um dos principais produtos na pauta das exportações (FNP, 2007). Hoje, a maior parte da produção brasileira de laranja destina-se à indústria do suco, que está concentrada no Estado de São Paulo. Como os Estados Unidos se dedicam a abastecer seu mercado interno, o Brasil transformou-se no maior exportador mundial de suco de laranja. Em 2008/09, o Brasil exportou cerca de 80% do suco produzido, seguido dos Estados Unidos (9%), México (1%) e outros (ABECITRUS, 2008; FOODNEWS, 2009).

A produção mundial de limão tanto os verdadeiros (Siciliano e Eureka) como as limas ácidas, cujas variedades mais conhecidas são o Tahiti e o Galego, representam aproximadamente 70% dessa classe (AMARO et al., 2003). 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, 2008). Segundo o IBGE, em 2006, o Estado de São Paulo foi responsável por 80% da produção brasileira de lima ácida.

Outros cítricos, com menor expressão no paladar e consumo brasileiro, como a Lima da Pérsia (*Citrus aurantiifolia*) e Grapefruit (*Citrus paradisi*), são evidenciados em estudos como sendo fontes benéficas a saúde humana e são mais consumidos e apreciados, principalmente, como bebidas, sobremesas, etc.

Com a constante preocupação de melhoramento dos cítricos frente a fatores como pragas, doenças e vulnerabilidade genética, há um grande interesse na seleção de novas variedades de laranjas que atendam tanto para geração de frutas mais resistentes a esses fatores, como na melhoria do seu valor nutricional, quer para o consumo in natura e/ou para a produção de suco. Um grupo de laranja ainda pouco explorado comercialmente no Brasil é o das laranjas vermelhas, cuja coloração é devida a presença de carotenóides.

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). Esses testes servem para medir a atividade anti-radical livre em alimentos e sistemas biológicos e podem ser divididos em dois grupos: métodos diretos (avaliam a peroxidação lipídica usando como substrato um lipídio ou lipoproteína) e métodos indiretos (que medem a habilidade de capturar radicais livres podendo ser empregados na avaliação da capacidade anti-radical livre de compostos puros e de extratos complexos como os radicais DPPH[•] (2,2-difenil-2-picrilidrazilo) e ABTS[•] (ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzoatiazolina)-6-sulfônico) (ROGINSKY e LISSI, 2005). 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; SCHERER e GODOY, 2008).

Desta forma, o estudo sobre a composição dos carotenóides, flavonóides e atividade antioxidante de suco fresco e processamento de frutas cítricas claras e vermelhas, torna-se muito importante.

OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho são:

- **Geral:** Estudar e quantificar os teores dos compostos antioxidantes (fenólicos totais, ácido ascórbico, sólidos solúveis totais, acidez total titulável, flavonóides totais e carotenóides totais), atividade antioxidante (capacidade sequestrante dos radicais DPPH e ABTS), *ratio* e parâmetros de cor.
- **Específicos:** a) Determinar a composição dos carotenóides e flavonóides em sucos de frutas cítricas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), b) verificar o efeito da região de cultivo das laranjas de polpa vermelha sobre os parâmetros analisados, c) comparar a capacidade antioxidante de cada suco com seus principais compostos bioativos presentes.

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.

ANTOLOLOVICH, M.; PRENZLER, P. D.; PATSALIDES, E.; MCDONONALD, S.; ROBARDS, K. Methods for testing antioxidant activity. ***Analyst.***, v. 127, p.183-198, 2002.

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.

FNP. **Agrianual 2007: anuário de agricultura brasileira**. FNP consultoria & agroinformativos, São Paulo, p.257-270, 2007.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITES NATIONS – FAO - FAOSTAT. Disponível em: <http://www.fao.org>. Acessado em: 11 de Abril de 2008.

IBGE. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br>. Acessado em: 28 de Novembro de 2008.

JOHNSTON, C. S., & BOWLING, D. L. J. Stability of ascorbic acid in commercially available orange juices. ***Journal of the American Dietetic Association***, v. 102, p. 525-529, 2002.

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_PENSAICONE. Acesso em: 20 Dez. 2009.

ROBARDS, K.; KPRENZLER, 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.

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.

ZULUETA, A.; ESTEVE, M. J.; FRÍGOLA, A. ORAC and TEAC assays comparison to measure the antioxidant capacity of food products. **Food Chem.**, v.114,p. 310-316, 2009.

CAPÍTULO 1

REVISÃO

BIBLIOGRÁFICA

1. CLASSIFICAÇÃO DAS FRUTAS CÍTRICAS

A fruticultura hoje é um dos segmentos mais importantes da agricultura brasileira, respondendo por 25% do valor da produção agrícola nacional. Com grande parte de sua produção voltada ao mercado externo, a cadeia citrícola traz, anualmente, mais de US\$ 1,0 - 1,5 bilhão em divisas para o Brasil, sendo um dos principais produtos na pauta das exportações (FNP, 2007). A agroindústria brasileira detém a liderança mundial na produção de laranjas, de suco de laranja concentrado congelado (SLCC) e de suco de laranja NFC (*Not From Concentrated*), representando mais de 80% das exportações mundiais de suco (FNP, 2007).

Segundo NEVES e LOPES (2005) um dos principais problemas da cadeia comercial da laranja brasileira é o baixo consumo no mercado interno de frutos e do suco *in natura*. No ano de 2002, por exemplo, apenas 17% do total de frutos produzidos foram comercializados no mercado interno. Várias propostas e ações foram apresentadas e consideradas importantes para o aumento do consumo, tais como uso de uma publicidade intensa aliado ao desenvolvimento de novas variedades cítricas de mesa ou suco de laranja pasteurizado (NFC).

As laranjas podem ser divididas em dois grandes grupos de acordo com sua coloração: grupo das laranjas brancas ou claras e grupo das laranjas sanguíneas (BITTERS, 1961). As laranjas claras seriam caracterizadas pela cor laranja na polpa e no suco, devido a presença de carotenóides. As variações de cor da polpa de frutos observadas entre as variedades deste grupo seriam devidas as flutuações na quantidade dos diferentes carotenóides presentes (GAMA e SYLOS, 2005). Este grupo inclui, quase que a totalidade das laranjas comerciais cultivadas no mundo, incluindo as

variedades de mesa (laranjas Baías, Navel, Baianinhas e outras), variedades usadas para a extração de suco (Pêra, Valência, Natal, Hamlin e outras) e laranjas sem acidez como Laranja Lima e Suchari (Figura 1).

Já as laranjas sanguíneas, caracterizadas pela coloração vermelha-intensa da polpa e do suco, devido a presença do pigmento antocianina, são mais cultivadas nas regiões do mediterrâneo e na Índia, onde apresentam grande aceitação comercial (KELEBEK et al, 2008; MONDELLO et al, 2000). Como exemplos de variedades mais conhecidas e utilizadas, podem ser citadas a: Tarroco, Moro, Sanguigno doppio, Sanguinella e Sanguinelo (*Citrus sinensis*(L.) Osbeck), dentre outras (MONDELLO et al, 2000).

Nas laranjas sanguíneas, a presença da coloração violácea e a sua intensidade são dependentes de vários fatores, mas principalmente do clima da região em que são cultivadas. Segundo MACKINNEY (1961), as regiões de clima ameno e/ou que apresentam maior amplitude térmica diária (dias quentes e noites frias), são as que favorecem a formação de frutos com maior teores de antocianina, resultando numa coloração mais intensa.

Um terceiro grupo de variedades, não descrito por BITTERS (1961), são as variedades de laranja com coloração vermelha intensa da polpa, chamadas de laranjas de falsas-sanguíneas (Figura 1). Esta coloração é devida a presença de carotenóides: beta-caroteno e licopeno na polpa, em comparação com as laranjas claras (XU et al., 2006). Como, provavelmente, a polpa destas variedades não apresentam o pigmento antocianina, os sucos obtidos com os frutos das laranja de polpa vermelha não apresentam coloração tão intensa como os das laranjas sanguíneas.



Figura 1. Fruto de laranja Valência e da variedade Mombuca.
Fonte: BAG Citros “Sylvio Moreira”-IAC

O Banco Ativo de Germoplasma (BAG Citros) do Centro APTA Citros “Sylvio Moreira”-IAC localizado em Cordeirópolis, apresenta três variedades que podem ser consideradas como pertencentes a este grupo: as laranjas ‘Sanguínea-de-mombuca’; Valência ‘Puka’ e a Baía ‘Cara-cara’.

Outras frutas, com consumo ainda pouco expressivo para o paladar brasileiro, são a *Grapefruit (Citrus paradisi)*, o limão Siciliano (*Citrus lemon*) e a Lima da Pérsia (*Citrus aurantifolia*).

As frutas cítricas são conhecidas como fontes de constituintes antioxidantes (PERNICE et al.,2009; SANCHEZ-MORENO et al., 2003), que apresentam várias ações benéficas ao ser humano, como por exemplo a atividade antioxidante (PERNICE et al.,2009; PUPIN et al., 1999).

2. PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES PRESENTES EM FRUTAS CÍTRICAS

As propriedades antioxidantes presentes nos alimentos são definidas como substâncias que, em baixas concentrações, retardam ou previnem o aparecimento de alteração oxidativa no alimento (Anvisa/portarias, 2009). Enquanto outros autores

definem, como “substância sintética ou natural adicionada a produtos para prevenir ou retardar a deteriorização produzida pela ação do oxigênio do ar” (HALLIWELL, 1995).

Pela importância do papel dos alimentos antioxidantes na prevenção de certas doenças, fez-se crescente o número de métodos para determinar a capacidade antioxidante (PÉREZ-JIMÉNEZ e SAURA-CALIXTO, 2006). As frutas cítricas se destacam neste contexto por apresentarem importantes constituintes antioxidantes como os carotenóides, flavonóides, ácidos fenólicos, ácido ascórbico (vitamina C) e outros capazes de prevenirem o organismo humano contra diversas doenças crônicas cardio e cérebro-vascular, oculares, neurológicas e, certos tipos de cânceres (GAMA e SYLOS, 2007; GARDNER et al., 2000; JOHNSTON et al., 2002; KLIMCZAK et al., 2007; PERNICE et al., 2009; SANCHEZ-MORENO et al., 2003).

Atualmente, os antioxidantes também são evidenciados na literatura pela capacidade de conservar os alimentos, retardando a deterioração, rancidez e/ou descoloração e, principalmente, devido aos efeitos em relação à prevenção de doenças e propriedades biológicas importantes à saúde humana.

2.1. Agentes Antioxidantes

Nas últimas décadas, foram realizadas inúmeras pesquisas para esclarecer o papel dos radicais livres em processos fisiopatológicos como envelhecimento e também doenças degenerativas associadas ao envelhecimento, como câncer, aterosclerose, inflamação, doenças cardiovasculares, catarata, declínio do sistema imune e disfunções cerebrais (ATOUI et al., 2005).

Os radicais livres são átomos ou grupos de átomos, com um elétron desemparelhado ($R^\bullet$), sendo altamente reativos e cujos produtos de suas reações geram outros radicais livres (reação em cadeia). Os radicais são gerados normalmente no

metabolismo e intensificados após exposição ao estresse, luz solar, poluição, cigarro, etc. (YOUNG e LOVE, 2001). São exemplos de radicais livres: as formas tóxicas do oxigênio compreendendo o oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) e as espécies reativas do oxigênio, radical hidroxil ($\text{OH}^\bullet$), ânion superóxido (O_2^-), radical peroxil ($\text{ROO}^\bullet$), radical alcóxil ($\text{RO}^\bullet$) e óxido nítrico ($\text{NO}^\bullet$) (PEREIRA, 1994; ARUOMA, 1994; YU, 1994; SJODIN et al., 1990). Destes radicais livres, o $\text{OH}^\bullet$ 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).

O estresse oxidativo é o resultado do desequilíbrio entre a peroxidação e a antioxidação, com maior produção de espécies reativas de oxigênio e menor produção de antioxidantes, caracterizando-se, principalmente, pela peroxidação da membrana lipídica celular (AW et al., 1991; EVELO et al., 1992).

Os alimentos, principalmente as frutas, os vegetais e os condimentos, contêm numerosos fitoquímicos, além dos compostos como as vitaminas A, C e E, os flavonóides, os carotenóides, os tocoferóis, entre outros, com significativa capacidade antioxidante, capazes de restringir a propagação das reações em cadeia e as lesões induzidas pelos radicais livres (DEGÁSPARI e WASZCZYNSKYJ, 2004; STAVRIC, 1994; FOTSIS et al., 1997; POOL-ZOBEL et al., 1997).

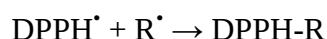
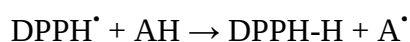
Atividade (capacidade ou potencial) antioxidante é um parâmetro amplamente utilizado (isolado ou com mais) para caracterizar diferentes matrizes como os vegetais, vinhos, óleos, chás, etc.

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) (ARNAO, 2000; ROGINSKY e LISSI, 2005).

2.1.1. Método DPPH[•]

O DPPH[•] é um radical livre adquirido diretamente sem preparo enquanto que, o ABTS[•] é gerado por reações enzimáticas ou químicas. O DPPH[•] é um radical muito estável, solúvel em meio orgânico (especialmente alcoólico) e insolúvel em meio aquoso. A redução do DPPH[•] é acompanhada pelo monitoramento do decréscimo da absorbância a um determinado comprimento de onda. O DPPH[•] absorve a 515 nm, mas quando reduzido por um antioxidante (AH) ou espécies radiais (R[•]), a absortividade diminui (ARNAO, 2000; BRAND-WILLIAMS et al., 1995).



O DPPH[•] é formado diretamente em solução, 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, 1998).

Usualmente, os métodos utilizados expressam a capacidade antioxidante dos alimentos testados como capacidade antioxidante equivalente Trolox (TEAC-Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) ou valor de EC₅₀ em unidades molares. O Trolox, potente antioxidante análogo hidrossolúvel da vitamina E, não é um composto naturalmente presente nos alimentos (KIM et al., 2002).

2.1.2. Método ABTS•

A vantagem do método ABTS• é sua simplicidade que permite ser utilizado em determinações de rotina em laboratório. Porém, o resultado expressa a capacidade da amostra em reagir com o radical ABTS (ABTS^{•+}) e não a capacidade de inibir um processo oxidativo (ROGINSKY e LISSI, 2005).

De acordo com o método de Re et al. (1999), o radical é gerado diretamente por persulfato de potássio, ou seja, o radical pré-formado ABTS^{•+} forma um cromóforo verde azulado de cor intensa com absorção máxima a 645, 734 e 815nm, conforme a Figura 2 (THOMAS et al., 2004).

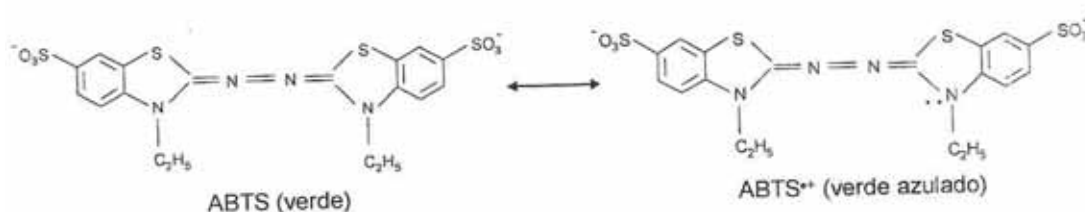


Figura 2. Formação do radical ABTS.

A oxidação do ABTS começa imediatamente após a adição do persulfato de potássio. Depois de formado, o ABTS• pode ser reduzido na presença de antioxidantes doadores de hidrogênio perdendo sua coloração. Através da redução do ABTS• será determinada a porcentagem de inibição em função da concentração do antioxidante e o

cálculo da atividade anti-radical livre será relativo à reatividade do padrão Trolox, sob as mesmas condições e o resultado sendo expresso por TEAC.

De acordo com alguns autores, os resultados dos métodos ABTS e DPPH, realizados para a determinação da atividade anti-radical de alguns alimentos e plantas medicinais (LEONG e SHUI, 2002; MILIAUSKAS et al., 2004) mostraram boa correlação. No entanto, Wang et al. verificaram que alguns compostos que apresentam atividade em ABTS• podem não ter atividade em DPPH• (WANG et al., 1998; citado por LEONG e SHUI, 2002). Os resultados de atividade anti-radical livre obtidos com estes dois radicais dependem do solvente, da concentração do extrato e do método empregado (SUN e HO, 2005; PINELO et al., 2004; FRANKEL e MEYER, 2000; SANCHEZ-MORENO, 2002).

2.2. Compostos Fenólicos

Os fenóis são uma das maiores classes de metabólitos secundários das plantas e os principais componentes antioxidantes presentes em frutas e vegetais. Constituem uma ampla classe de compostos como ácidos fenólicos, flavonóides e tocoferóis, podendo apresentar características lipofílicas (vitamina E), e características hidrofílicas (Quercetina).

Com mais de 8.000 compostos já identificados, os compostos fenólicos podem ser classificados quanto à sua estrutura básica, por exemplo, fenóis simples, benzoquinonas, ácidos fenólicos, acetofenonas, ácidos fenilacéticos, ácidos hidroxicinâmicos, fenilpropenos, cumarinas, cromonas, naftoquinonas, xantonas, estilbenos, antraquinonas, flavonóides, lignanas e lignina (WOLLGAST e ANKLAM, 2000). Também podem ser classificados, de uma forma mais simplificada, de acordo com seu peso molecular, como, compostos fenólicos de baixo peso molecular (ácidos

hidroxibenzóicos e ácidos hidroxicinâmicos), peso molecular intermediário (flavonóides) e alto peso molecular (taninos condensados e os taninos hidrolizáveis) (ESCARPA e GONZALEZ, 2001).

Quimicamente, podem ser definidos como substâncias que possuem um anel aromático contendo um ou mais grupos hidroxila (Figura 3) (DUBICK e OMAYE, 2001).

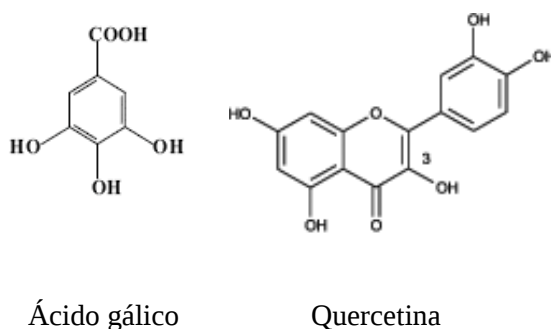


Figura 3. Estrutura química de compostos fenólicos

Os compostos fenólicos são efetivos doadores de hidrogênio e sua atividade antioxidante está correlacionada 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).

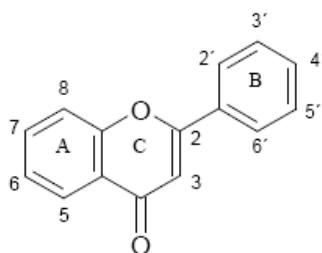
A metodologia mais utilizada para a quantificação de compostos fenólicos em uma amostra é a determinação com o reagente Folin-Ciocalteu, sendo considerada simples, com reprodutibilidade e reage com vários tipos de fenóis encontrados na natureza. Este reagente contém tungstato de sódio, molibdato de sódio e sulfato de lítio em meio ácido, apresentando uma coloração amarela. Na presença do reagente Folin-Ciocalteu e em meio básico (pH $\sim$ 10), os compostos fenólicos são energeticamente oxidados, ou seja, pode ocorrer uma reação de transferência de elétrons e a formação no

final da reação, da coloração azul, é devido à presença do molibdato reduzido formando óxido de molibdênio, com absorbância muito intensa próxima a 750nm (SINGLETON et al., 1999).

2.3. Flavonóides

Os flavonóides constituem o mais importante grupo de compostos fenólicos e o mais largamente distribuído entre os vegetais, podendo ser divididos nos seguintes subgrupos: antocianinas (cianidina, delphinidina), flavanas (catequina, epicatequina, luteoforol, procianidina, theaflavina), flavanonas (hesperidina, naringenina, neohesperidina, narirutina), flavonas (apigenina, luteolina, diomestina, tangeritina, nobiletina, tricetina), flavonóis (quercetina, rutina, miricetina) e isoflavonóides (daidzeína, genisteína) (BRAVO, 1998; LOPES et al., 2000).

Estruturalmente, os flavonóides constituem substâncias aromáticas com 15 átomos de carbono no seu esqueleto de difenil propano ($C_6-C_3-C_6$) com dois anéis benzênicos (A e B) ligado a um anel pirano (C) (Figura 4) (BEHLING et al., 2004).



As flavanonas em *Citrus* estão presentes em duas formas, ou seja, na forma aglicona onde as principais são hesperitina e naringenina e na forma glicosídica onde são classificadas como rutinose e neohesperidose (TRIPOLI et al., 2007).

As flavanonas glicosídicas dominantes nas laranjas doces (*C. sinensis*) são a hesperidina e a narirutina, enquanto que nas laranjas amargas (*C. aurantium*) as duas flavanonas glicosídicas predominantes são a neohesperidina e a naringina. A principal diferença entre as flavanonas glicosídicas de laranjas doces e amargas está na molécula de açúcar, que influencia o gosto. O açúcar rutinose (6-O- α -A rhamnosyl- β -D-glucose) apresenta um sabor neutro nas flavanonas hesperidina e narirutina e é relativamente elevado em laranjas doces, tangerinas e tangor. Enquanto que, o açúcar neohesperidose (2-O- α -L-rhamnosyl- β -D-glicose) é elevado em tangelos, grapefruits e laranjas amargas apresentando um sabor amargo ou picante às flavanonas neohesperidina e naringina (PETERSON et al., 2006).

Como algumas flavanonas são específicas de determinadas espécies cítricas, elas são usadas como marcadores de adulteração em sucos comerciais (GONZÁLEZ-MOLINA et al., 2010).

Os flavonóides tem se mostrado eficientes antioxidantes em diferentes modelos (HIDALGO et al., 2010). 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 a 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 pro-oxidantes (RICE-EVANS, 1997). Quanto maior o número de hidroxilas, maior a atividade como agente doador de H e de elétrons (CAO et al., 1997).

Além de sua atividade antioxidante, esses compostos apresentam diversos efeitos biológicos ao organismo quando na ingestão de alimentos como frutas e vegetais e bebidas como chás e vinhos, podendo prevenir contra vários tipos de doenças crônicas como câncer, doenças degenerativas e cardiovasculares (HIDALGO et al., 2010; TRIPOLI et al., 2007). Os flavonóides também apresentam poder antiviral, antimicrobiano e atividade antiinflamatória, inibem a agregação de plaquetas, são antiulcerogênicos e antialérgicos (GATTUSO et al., 2007).

2.4. Carotenóides

Os carotenóides são importantes compostos isoprenóides constituindo uma classe de pigmentos naturais lipossolúveis amplamente distribuídos na natureza (frutas, vegetais, flores, peixes, invertebrados, pássaros e microrganismos), apresentando diversidade estrutural e numerosas funções biológicas e fornecendo uma coloração atrativa em flores e frutas (ALQUEZAR et al., 2008; GUERRA-VARGAS et al., 2001; OLIVER E PALOU, 2000). Embora sejam micronutrientes (microgramas por grama), os carotenóides estão entre os constituintes alimentícios mais importantes.

Mais de 650 carotenóides naturais já foram encontrados na natureza (MERCADANTE e EGELAND, 2004), isolados e caracterizados, sem considerar os isômeros *trans* e *cis*. Desses, somente uma pequena fração destes foi detectada nos alimentos (ROCK, 1997; PAIVA e RUSSEL, 1999; OLIVIER e PALOU, 2000). Podem ser obtidos facilmente por extração a frio com solventes orgânicos (FRANCKI et al.,

2005). Como os animais são incapazes de sintetizar carotenóides, adquirem estes compostos através da dieta ao consumir principalmente vegetais e frutas.

Os carotenóides dos alimentos são tetrapernóides C_{40} formados pela união cauda-cabeça de oito unidades isoprenóides C_5 , exceto na posição central, onde a junção ocorre no sentido cauda-cauda, invertendo assim a ordem e resultando numa molécula simétrica. A característica de maior destaque nestas moléculas é um sistema extenso de duplas ligações conjugadas, responsáveis por suas propriedades e funções tão especiais. Este sistema é o cromóforo que confere aos carotenóides as suas atraentes cores (RODRIGUEZ-AMAYA et al., 2008). A estrutura do licopeno (Fig. 5) é considerada a estrutura fundamental dos carotenóides, da qual podem ser derivadas outras formas estruturais por reação de hidrogenação, ciclização, oxidação ou a combinação dessas (BRITTON et al., 1995; OLIVER e PALOU, 2000).

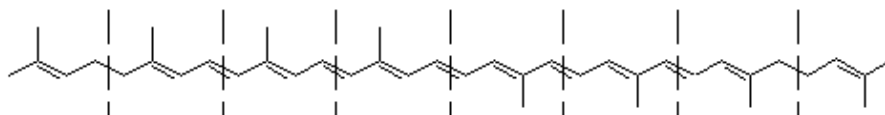


Figura 5. Estrutura do licopeno.

Os carotenóides estão presentes em todos os organismos fotossintéticos, tem coloração intensa que varia do amarelo ao vermelho e se dividem em: carotenos, carotenóides constituídos por carbono e hidrogênio (por exemplo, o β -caroteno e o licopeno); e xantofilas, derivados do caroteno que possuem um ou mais átomo de oxigênio (hidroxílicos, os carbonílicos e os epóxidos (Figura 6). Nas plantas, os carotenóides estão localizados nos plastídios onde são sintetizados e podem ser obtidos

facilmente por extração a frio com solventes orgânicos (DIAS et al.,2009; FRANCKI et al., 2005; FRASER e BRAMLEY, 2004).

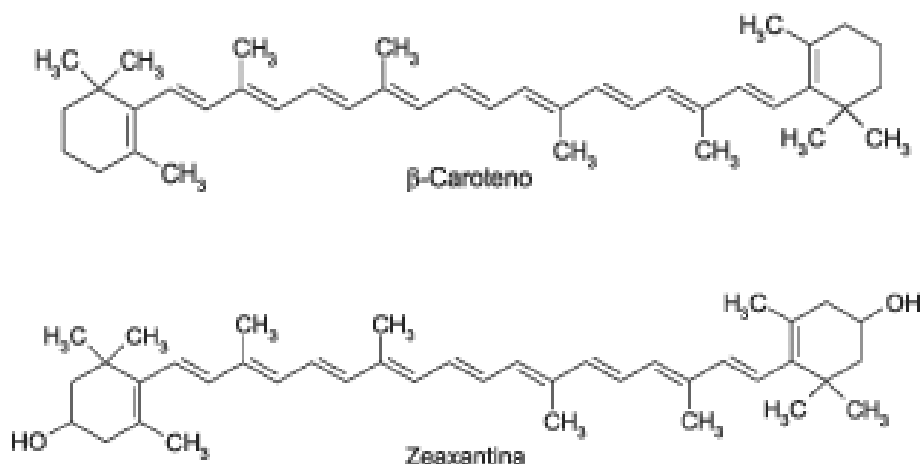


Figura 6-Exemplo de estrutura química de um caroteno (β -caroteno) e de uma xantofila (zeaxantina).

Esses pigmentos são importantes para a saúde por suas funções biológicas. Alguns carotenóides são conhecidos por sua atividade pró-vitâmica A, especialmente o β -caroteno e, em menor extensão, o α -caroteno, a β -criptoxantina e o γ -caroteno (DIAS et al.,2009; GUERRA-VARGAS et al., 2001; KHACHIK et al., 1992; SULAEMAN et al., 2001; TONUCCI et al., 1995).

Em anos mais recentes, outros efeitos promotores da saúde têm sido atribuídos aos carotenóides, como agentes antioxidantes, protegendo o organismo contra doenças crônicas e certos tipos de câncer, doenças cardiovasculares, degeneração macular, catarata, desordens neurológicas e apresentar atividade antiúlcera gástrica e fortalecimento do sistema imunológico (DIAS et al.,2009; GAMA e SYLOS, 2007; TRIPOLI et al., 2007; ZANATTA e MERCADANTE, 2007).

Nos últimos anos, o licopeno tem recebido a atenção de muitos pesquisadores, sendo a evidência científica mais forte em relação ao câncer do pulmão, esôfago e

próstata. Esse carotenóide é normalmente encontrado em alimentos de coloração avermelhada, como tomate, goiaba, melancia e mamão. Estudos epidemiológicos revelaram que o consumo de alimentos ricos em licopeno está inversamente associado com o risco de doenças cardiovasculares e aterosclerose, câncer de próstata, alterações cognitivas entre outras (KONG e ISMAIL, 2010). Assim, há um grande interesse na exploração de fontes alternativas de licopeno em linha com o crescimento da demanda desse composto. Por isso, a importância de estudos com o objetivo de investigar novas espécies de laranjas como fontes de licopeno e antioxidante.

Aproximadamente, 60% do total dos carotenóides presentes nas laranjas encontram-se na casca (MOULY, GAYDOU e CORSETTI, 1999; MOULY et al., 1999).

A composição dos carotenóides nos alimentos pode ser afetada por fatores como variedade, estágio de maturação, localidade geográfica ou climática da produção, manuseio da colheita e pós-colheita, processamento e estocagem. O cultivo em diferentes regiões leva a matizes de cores diversas, na polpa e na casca de uma mesma variedade (KIMURA e RODRIGUEZ-AMAYA, 2002; PERFETTI et al, 1988; RODRIGUEZ-AMAYA, 1999).

A luteína e a violaxantina foram os principais carotenóides encontrados nos estádios iniciais do amadurecimento da laranja Budd Blood. A luteína foi o pigmento majoritário apresentando um declínio em seu conteúdo durante a maturação. O conteúdo de β -criptoxantina aumentou durante o amadurecimento da fruta, tornando-se o pigmento predominante ao término deste estágio. A violaxantina apresentou um aumento em seu conteúdo no início da maturação e depois, um decréscimo (LEE, 2001; LEE e CASTLE, 2001).

Os carotenóides com mais de sete ligações duplas conjugadas são capazes de aprisionar ou desativar (quencher) oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) e interagir com os radicais livres, sendo que esta atividade aumenta com o aumento do sistema de ligações duplas conjugadas (DI MASCIO et al. 1989). Existem duas maneiras em que os carotenóides podem desativar o oxigênio singlete: no processo químico quando, reagindo com ele forma produtos de oxidação ou no processo físico em que dissipa a energia adquirida do oxigênio singlete na forma de calor, desta forma, voltam ao estado fundamental. Esta segunda maneira é a que ocorre preferencialmente (STRATTON et al., 1993).

Os carotenóides presentes em citros formam uma mistura complexa de mais de 115 substâncias naturais, mas nem todas essas substâncias são precursoras 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; SLATERRY et al., 2000; TEMPLE, 2000).

2.5. Ácido Ascórbico (Vitamina C)

O ácido ascórbico (AA) é a principal forma biologicamente ativa da vitamina C (Figura 7), tem diversas funções biológicas e desempenha um importante papel como antioxidante, prevenindo danos celulares causados pela oxidação (BLOCK, 1993). 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).

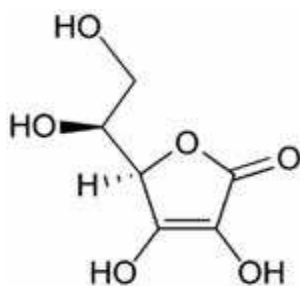


Figura 7. Estrutura química do ácido ascórbico

Sendo encontrado no organismo na forma de ascorbato, os seres humanos não são capazes de sintetizar o ácido ascórbico, portanto, a principal fonte desta vitamina vem da dieta através do consumo de vegetais e frutas. O AA é uma vitamina solúvel em água, sensível pH alcalino e facilmente oxidado, principalmente por íons metálicos (em particular Fe^{3+} e Cu^{2+}). Os principais fatores que podem afetar a degradação da vitamina C, em sucos de fruta além de catalisadores metálicos e enzimas, incluem o tipo de processamento, condições de estocagem, tipo de embalagem, pH, presença de oxigênio e luz. O AA possui alta atividade antioxidante, pois, de modo geral, quanto maior o número de hidroxilas, maior a atividade como agente antioxidante (AOAC, 1990; LEE e CHEN, 1998; LEE e COATES, 1999). As propriedades pró-oxidantes (íons Fe^{2+} e Cu^{1+}) encontradas no ascorbato 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 atividades pró-oxidantes (HALLIWEL, 1999; PODMORE et al, 1998).

A concentração de AA nas frutas cítricas varia de acordo com o tipo de cultivar, estágio de maturação, condições de cultivo entre outras. 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 determinação do AA pode ser realizada por titulometria (AOAC, 1990). Este método é baseado na redução do 2-6-diclorofenol-indofenol (DCFI) pelo ácido ascórbico em meio ácido. No início da titulação o DCFI, com coloração azul em meio aquoso neutro, será reduzido pelo ácido ascórbico passando para a sua forma reduzida, que é incolor. Ao final da titulação, depois que todo AA presente for consumido, a solução passa para a coloração rosa, pois em meio ácido o DCFI é rosa, indicando o ponto final.

3. PARÂMETROS DE COR CIELAB

3.1. Medição de Cor pelo Sistema CIELAB

O aspecto visual indica a qualidade de um produto e a cor é considerada o principal atributo na aceitação e escolha de um alimento. O sentido da visão é o primeiro a ser utilizado na escolha de itens alimentares (ARIAS et al.; 2000; LIMA et al., 2005).

A percepção das cores primárias (vermelho, azul, amarelo) e de suas combinações (laranja, verde, púrpura, etc.) torna-se complexa uma vez que, observadores, tamanhos do objeto, planos de fundo (*background*) e direções do olhar alteram a *tonalidade, saturação e luminosidade* da cor (LÓPEZ CAMELO e GÓMEZ, 2004; COLOR GLOSSARY, 2008). Essas três sensações (tonalidade, saturação e luminosidade) são responsáveis pela natureza tridimensional da cor sendo denominadas de estímulos cromáticos (MELÉNDEZ-MARTINEZ et al., 2005).

A cor pode ser representada numericamente pela escala de cor CIELab. O sistema CIELab ($L^*a^*b^*$) (Commission Internationale de l'Éclairage - Lightness, redness-greenness, and yellowness-blueness) tem sido empregado desde 1976 por vários autores para caracterizar a cor dos alimentos, onde uma particular cor tem uma única localização, especificada numericamente em um espaço tridimensional esférico, definido por três eixos perpendiculares. A cromaticidade é composta pelas coordenadas retangulares do sistema CIELab (Figura 8) que são luminosidade (L^*), a^* (vermelho-verde: valor positivo representa vermelho e negativo, verde) e b^* (amarelo-azul: valor positivo representa amarelo e negativo, azul) (OLIVEIRA et al., 2003). Tal relaciona-se à reflectância da luz visível em comprimentos de onda específicos (ARIAS et al., 2000; KONICA MINOLTA, 2008).

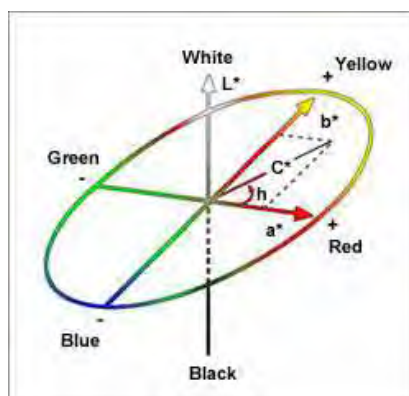


Figura 8: Parâmetros do sistema de cor CIELAB.
 Fonte: <http://www.athloneextrusions.ie/athlone/colours/colour.php>

A saturação (C^* ou Chroma) define a vivacidade (próximo de 60) ou opacidade da cor (próximo de zero) (COLOR GLOSSARY, 2008; KONICA MINOLTA, 2008) sendo calculado através da equação $C^* = (a^{*2} + b^{*2})^{1/2}$ (ARIAS et al., 2000).

Hue ou ângulo Hue relaciona-se às diferenças de absorbância em diferentes comprimentos de onda permitindo distinguir colorações de mesma luminosidade,

calculado a partir de $\tan^{-1}(b^*/a^*)$, quando $a^*>0$ e $b^*\geq 0$, e $180 + \tan^{-1}(b^*/a^*)$, quando $a^*<0$ (ARIAS et al., 2000). O valor hue de 180° representa o verde puro e 0° , vermelho puro; quanto mais próximo de zero for este valor mais vermelho será a cor do alimento (COLOR GLOSSARY, 2008; KONICA MINOLTA, 2008).

Os parâmetros do sistema CIELAB fornecem dados quantificáveis e precisos sobre a cor de frutas e vegetais *in natura* e processados.

A cor dos sucos cítricos é devida, principalmente, a 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; MELÉNDEZ-MARTÍNEZ et al., 2010).

De acordo com Meléndez-Martínez et al. (2010) a tradicional cor amarelada das laranjas doces é devida a presença de alguns carotenóides. Algumas laranjas avermelhadas, conhecidas como laranjas sanguíneas, também acumulam compostos antocianos. Já para as variedades mutantes de polpa vermelha, a cor é devida a presença do carotenóide licopeno que também foram descritos por Liu et al. (2007).

Através dos dados obtidos no diagrama CIELAB é possível determinar diferenças existentes entre um padrão e uma amostra (L^* , a^* , b^*), por exemplo, se o valor de a^* é positivo a amostra está mais vermelha que o padrão. Ou seja, é possível verificar se a amostra está dentro do limite de tolerância ou mesmo, para realizar ajustes na cor. Através deste sistema também é possível avaliar a mudança de cor ocorrida durante um processamento ou talvez, no processo de amadurecimento de uma fruta.

Segundo Meléndez-Martínez et al. (2007) é possível avaliar o comportamento de diversos padrões de carotenóides (anteroxantina, auroxantina, cantaxantina, α -caroteno, β -caroteno, ζ -caroteno, β -criptoxantina, luteína, luteína epóxi, luteoxantina, licopeno,

mutatoxantina, neocromo, neoxantina, violaxantina e zeaxantina) através do CIELAB. Estes autores verificaram que o licopeno e a cantaxantina possuem valores positivos de a^* e b^* , indicando que estes pigmentos são mais vermelhos. Os demais carotenóides possuem valores negativos de a^* e positivos de b^* , apresentando coloração mais alaranjada e amarela (MELÉNDEZ-MARTÍNEZ et al., 2010).

Atualmente, este sistema vem sendo empregado no estudo da influência da localidade geográfica ou climática da produção (GÓMEZ et al., 2001), dos estádios de maturação (ARIAS et al., 2000; BRANDT et al., 2006; CARVALHO et al., 2005), do cultivar, da colheita e pós-colheita (GIOVANELLI et al., 1999) e do processamento e estocagem (SAHLIN et al., 2004; SANCHEZ-MORENO et al., 2006).

Na indústria do suco cítrico, a variedade Hamlin (*C. sinensis*) é muito utilizada por apresentar uma capacidade produtiva maior, mas sua cor, sabor e qualidade são relativamente pobres comparada a outras variedades de laranjas doces. Ao suco é misturado suco de outras fontes para melhorar a cor e sabor. Lee e Castle (2001) caracterizaram os carotenóides e compararam as mudanças sazonais em sucos de laranja Hamlin e duas variedades vermelhas. Verificaram que a concentração de carotenóides na laranja vermelha A foi de 4.9%, variedade B 4.5% e na Hamlin 3.9%. Verificaram que mudanças drásticas podem ocorrer com os pigmentos durante a safra e que alguns pigmentos aumentavam sua concentração consideravelmente com a maturação da fruta.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AOAC International 1995. Official methods of analysis of AOAC International (vol. II). Gaithersburg: AOAC International.
- ALQUEZAR, B.; RODRIGO, M. J.; ZACARÍAS, L. Regulation of carotenoid biosynthesis during fruit maturation in the red-fleshed orange mutant Cara Cara. **Phytoch.**, v.69, p.1997-2007, 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.
- ARNAO, M.B. Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a practical case. **Trends in Food Scie & Technol.**, v.11,p.419-421, 2000.
- 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.
- AW, T.Y.; WIERZICKA, G.; JONES, D.P. Oral glutathione increases tissue glutathione in vivo. **Chem. Biol. Interac.**, v.80, p.89-97, 1991.
- BEHLING, E.; SENDÃO, M.; FRANCESCATO, H.; ANTUNES, L.; BIANCHI, M. Flavonóide quercetina: Aspectos gerais e ações biológicas. **Alimentos e Nutrição** Araraquara - ISSN: 0103-4235 América do Norte, v. 15, n. 3, p. 285-292, 2004.

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.

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.

BRANDT, S.; PÉK, Z.; BARNA, E.; LUGASI, A.; HELYES, L. Lycopene content and colour of ripening tomatoes as affected by environmental conditions. **J. Sci. Food Agric.**, v.86, p.568-572, 2006.

BRITTON, G.; LIAAEN-JENSEN, S.; PFANDER, H. **Carotenoids: Isolation and Analysis**. Basel: Birkhäuser, 1995. v.1A, 187 p.

CAO, G.; SOFIC, E.; PRIOR, R. L. Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. **Free Rad. Biol. Med.** v. 22, p. 749-760, 1997.

COLOR GLOSSARY. **Color Glossary**. Disponível em: http://www.sapdesignguild.org/resources/glossary_color. Acesso em: 22 mai. 2010.

DEGASPARI, C.H.; WASZCZYNSKY, N. Propriedades antioxidantes de compostos fenólicos. **Visão Acadêmica**, v.5, p.33-40, 2004.

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.

DUBICK, M. A.; OMAJE, 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.

EVELO, C.T.A.; PALMEN, N.G.M.; ARTUR, Y.; JANSSEN, G.M.E. Changes in blood glutathione concentrations, and in erythrocyte glutathione reductase and

glutathione Stransferase activity after running training and after participation in contests. **Eur. J. Appl. Physiol.**, v.64, p.354-358, 1992.

FRANCKI, V. M.; GOLLUCKE, A. P. B.; PIMENTEL, C. V. B. Alimentos funcionais: introdução às principais substâncias bioativas em alimentos. Ed.Varela, 2005.

GAMA, J.J.T.; SYLOS, C.M. Effect of thermal pasteurization and concentration on carotenoid composition of Brazilian Valencia orange juice. **Food Chem.**,v.100, pp.1686-1690, 2007.

GARDNER, P.T.; WHITE, T.A.C.; McPHAIL, D.B.; DUTHIE, G.G. The relative contributions of vitamin C, carotenoids and phenolics to the antioxidant potential of fruit juices. **Food Chem**, v.68, p.471-474, 2000.

GATTUSO, G.; BARRECA, D.; GARGIULLI, C.; LEUZZI, U.; CARISTI, C. Flavonoid composition of *Citrus* juices. **Molecules**, v.12, p.1641-1673, 2007.

GIOVANNUCCI, E. Tomatoes, tomato-based products, lycopene and cancer: a review of the epidemiological literature. **J. Nat. Canc. Instit**, v. 91, p. 317–331, 1999.

GIOVANELLI, G.; LAVELLI, V.; PERI, C.; NOBILI, S. Variation in antioxidant components of tomato during vine and post-harvest ripening. **J. Sci. Food Agric.**, v.79, p.1583-1588, 1999.

GÓMEZ, R.; COSTA, J.; AMO, M.; ALVARRUIZ, A. Physicochemical and colorimetric evaluation of local varieties of tomato grown in SE Spain. **J. Sci. Food Agric.**, v.81, p.1101-1105, 2001.

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.

JOHNSTON, C. S., & BOWLING, D. L. J. Stability of ascorbic acid in commercially available orange juices. **J. Amer. 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).

KIM, D.O.; LEE, K.W.; LEE, H.J.; LEE, C.Y. Vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of phenolic phytochemicals. **J. Agric. Food Chem.**, v.50, p.3713-3717, 2002.

KONICA MINOLTA. **Precise color communication.** Disponível em: <<http://www.konicaminoltaeurope.com/pcc/en>>. Acesso em: 20 abr. 2010.

LEE, H.S.; CASTLE, W.S. Seasonal changes of carotenoid pigments and color in Hamlin, Earlygold, and Budd Blood orange juices. **J. Agric. Food Chem.**, v.49, n.2, p.877-882, 2001.

LEE, H.S.; CASTLE, W.S.; COATES, G.A. High-performance liquid chromatography for the characterization of carotenoids in the new sweet orange (Earlygold) grown in Florida, USA. **J. Chromatogr. A**, v.913, p.371-377, 2001.

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.

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.

- LÓPEZ CAMELO, A.F.; GÓMEZ, P.A. Comparison of color indexes for tomato ripening. **Hortic. Bras.**, v.22, p.534-537, 2004.
- 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. Sci.**, 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.
- MERCADANTE, A. Z.; ENGELAND, E. S. Carotenoids Handook, 1 st.; Britton, G.; Liaaen-Jensen, S.; Pfander, H., Eds.; Birkhauser: Basel, Switzerland, 2004.
- 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.
- PAIVA, S. A. R.; RUSSELL, R. M. b-carotene and other carotenoids as antioxidants. **J. Am. Coll. Nutr.**, v.18, p.426-433, 1999.
- 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

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.

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 Rad. 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.

RODRIGUEZ-AMAYA D B. 1999. A guide for carotenoid analysis in foods. Washington, DC: International Life Sciences Institute Press, 59.

ROCK, C. L. Carotenoids: biology and treatment. **Pharmacol. Ther.**, v.75, p.185-197, 1997.

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.

SAHLIN, E.; SAVAGE, G.P.; LISTER, C.E. Investigation of the antioxidant properties of tomatoes after processing. **J. Food Compost. Anal.**, v.17, p.635-647, 2004.

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.

SÁNCHEZ-MORENO, C.; PLAZA, L.; DE ANCOS, B.; CANO, M.P. Nutritional characterization of commercial traditional pasteurized tomato juices: carotenoids, vitamin C and radical-scavenging capacity. **Food Chem.**, v.98, p.749-756, 2006.

SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolibidic-phosphotungistic acid reagents. *Amer. J. Enol. Viticult*, v. 16, p. 144-158, 1965.

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.; APLLE, 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.

YAMAGUCHI, T.; TAKAMURA, H.; MATOBA, T.; TERAOKA, 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.

YU, B. P. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. **Physiol. Rev.** v. 74, p.:139-161, 1994.

CAPÍTULO 2

DETERMINATION OF BIOACTIVE COMPOUNDS AND RADICAL SCAVENGING ACTIVITY OF GRAPEFRUIT, SWEET LIME, SICILIAN LEMON AND HAMLIN CULTIVATED IN BRAZIL

**DETERMINATION OF BIOACTIVE COMPOUNDS AND RADICAL
SCAVENGING CAPACITY OF GRAPEFRUIT, SWEET LIME, SICILIAN
LEMON AND HAMLIN ORANGE CULTIVATED IN BRAZIL**

Moura L. M.; Petrarca M. H.; Inohue C. M.; Sylos, C. M.*

School of Pharmaceutical Sciences – São Paulo State University – UNESP, Food and Nutrition
Department, 14801-902, Araraquara, SP, Brazil

*Corresponding author: Tel.: + 55-16-33016924; Fax: + 55-16-33220073
E-mail address: syloscm@fcar.unesp.br (CM Sylos)

Abstract

Citrus varieties cultivated in Brazil – Grapefruit (*Citrus paradisi*), Sweet Lime (*Citrus aurantiifolia*), Sicilian Lemon (*Citrus limon*) and Hamlin Orange (*Citrus sinensis*), were evaluated for physicochemical characterization, total phenolics, total flavonoids, total carotenoids and ascorbic acid contents, and antioxidant activity based on the capacity of the citrus varieties aqueous extracts to scavenge DPPH[•] and ABTS[•] radical. The Sicilian Lemon has the highest total titratable acidity, ascorbic acid and total flavonoídes contents, and the lowest total phenolics and total carotenoids contents. The Grapefruit showed the highest total carotenoids and total phenolics contents. The antioxidant activity ranged from 1.53 ± 0.04 to 4.47 ± 0.09 μM Trolox/g of juice for DPPH[•] method, and from 1.71 ± 0.17 to 3.71 ± 0.28 μM Trolox/g for ABTS[•] method. The ABTS[•] and DPPH[•] radical scavenging capacity of the citrus varieties studied was higher in the fruits with high content of total carotenoids and phenolic contents.

Keywords: ABTS radical scavenging assay, DPPH, Ascorbic Acid, Carotenoids, Flavonoids.

1. Introduction

Citrus fruits are produced all around the world and one of the most important and consumed mostly because of the juice nutritional value. According to US Department of Agriculture (USDA) data, in 2009, the largest citrus producers are Brazil, the United States and China. In Brazil, the state of São Paulo is the largest producer of oranges, but the fruits as grapefruit, lime juice and lemon produced in Brazil are more appreciated in Europe and North America (Guimarães et. al., 2010).

This paper focus the antioxidant activity of grapefruit, lime, lemon and orange Hamlin in the genus *Citrus*. All grapefruits are members of the species *C. paradisi* the varieties vary in the color of flesh their owing to the presence (pink / red) or absence (white) of lycopene. The Hamlin orange (*Citrus sinensis*) is very much used in industry to obtain the processed juice. Lemon (*Citrus lemon*) is a rich source of nutrients, in particular, to have been associated their vitamin C contents, but it has been recently shown that may also flavonoids play a role in relation to antioxidant (Gonzalez-Molina et. al., 2008).

The health benefits of fruits and vegetables have been confirmed by many studies and have mainly been attributed to the presence of bioactive compounds, such as phenolics, vitamin C, and flavonoids and others, for the prevention of variety diseases, particularly cardiovascular diseases, some types of cancer, type-2 diabetes, obesity, immune-system decline, cataracts, different inflammatory processes and antioxidants preventing free radicals from damaging proteins, DNA and lipids (Guimarães et. al., 2010; Isabelle et. al., 2010; Kuljarachanan, et. al., 2009; Lachman et. al., 2010).

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 radicals 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH[•]) and 2,2'-

azinobis(3-ethylbenzoathiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS[•]) has been widely used to test the free radical-scavenging ability of various dietary antioxidant polyphenols (Brand-Williams et al., 1995; Rufino et al., 2007; Sánchez-Moreno et al., 1998).

Carotenoids act in vivo as deactivators of singlet oxygen or peroxy radicals as scaveng, reducing oxidation of DNA and lipids, which is associated with degenerative diseases such as cancer, heart disease and others. The main antioxidant activity of carotenoids is the deactivation of singlet oxygen (Burry, 1997; Palace et al., 1999).

The aim of this work was to evaluate the ABTS[•] and DPPH[•] radical scavenging capacity of some citrus varieties cultivated in Brazil - Grapefruit, Persian Lime, Sicilian Lemon and Hamlin Orange, and to compare their antioxidant compound contents.

2. Materials and Methods

2.1. Chemicals

The chemicals 2,2-diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH[•]), 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzo-thiazoline-6- sulfonic acid) (ABTS[•]), 6-hydroxy-2,5,7,8-tetrametilchroman-2-carboxilic acid (Trolox), rutin and quercetin were purchased from *Sigma-Aldrich* (St. Louis, Mo, USA). Methanol was purchased from *Quemis* (Jundiaí, SP, Brazil); 2,6-dichlorophenolindophenol and sodium nitrite were purchased from *Vetec* (Rio de Janeiro, RJ, Brazil); sodium carbonate, potassium persulfate and oxalic acid were purchased from *Labsynth* (Diadema, SP, Brazil), L-ascorbic acid and gallic acid were purchased from *Mallinckrodt Baker* (Phillipsburg, NJ, USA); sodium hydroxide and Folin-Ciocalteu reagent were purchased from *Dinamica Quimica* (Diadema, SP, Brazil).

2.2. Citrus Varieties Samples

Three lots each of four citrus varieties – Grapefruit *Ruby Red* (*Citrus paradisi*), Sweet Lime (*Citrus aurantiifolia*), Sicilian Lemon (*Citrus limon*) and Hamlin Orange (*Citrus sinensis*), cultivated in Brazil, were selected for this research. The citrus varieties were purchased from supermarkets of the municipal district of Araraquara (Sao Paulo, Brazil) and the Hamlin Oranges were supplied by an industry of the region. The juices from citrus varieties were bottled, leaving a minimum amount of headspace, and wrapped in aluminum paper. Once filled, the bottles were sealed and stored at -18°C until analysed, the analyses being carried out in triplicate.

2.3. Titratable Acidity (TA)

The solution of juice from citrus varieties was titrated with 0.1N NaOH and the results were expressed as % of citric acid (AOAC, 1990).

2.4. Total Soluble Solids (TSS)

The total soluble solids (°Brix) content was determined according to the Association of Official Analytical Chemists (1990).

2.5. Ascorbic Acid (AA)

The ascorbic acid content of the samples was determined using the 2,6-dichlorophenolindophenol titrimetric method from the Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists (1990). The results were expressed as mg of ascorbic acid/100mL of juice.

2.6. Total Phenolics

The total phenolics were extracted using a modification of the method describe by Yu and Dahegren (2000). Juices from citrus varieties were vortexed with 10mL of 80% acetone for 1 min. All samples were held for 1h in the dark, at room temperature, followed by centrifugation at 6500 rpm for 2 min. The total phenolic content was determined spectrophotometrically using the Folin–Ciocalteu colorimetric method (Singleton and Rossi, 1965) as modified by Scalbert et al. (1989). The supernatant (0.5mL) was mixed with 2.5 mL of freshly diluted 0.2 N Folin-Ciocalteu reagent, and incubated at 50°C for 5 min. The reaction was then neutralized by adding 2.0mL of 7.5% Na₂CO₃ and the samples incubated at 50°C for 5 min before reading the absorbance of the resulting blue color at 760 nm in a UV/Vis spectrophotometer (Beckman DU[®] 640, Fullerton, CA, USA). A linear standard curve was prepared using gallic acid in the range from 5 to 25 µg/mL. The total phenolic content of sample was expressed as g of gallic acid equivalents/100mL of juice.

2.7. Total Flavonoids

The total flavonoids were extracted using a modification of the method described by Yu and Dahegren (2000), as describe above for total phenolics. The total flavonoid content was measured using the colorimetric assay developed by Zhishen et al. (1999). A known volume (5 ml) of the supernatant was added to a test tube and at zero time, 0.3 ml of 5% NaNO₂ was added. After 5 min, 0.6 ml of 10% AlCl₃ was added, and, after 6min, 2 ml of 1 M NaOH, followed by the addition of 2.1 ml distilled water. Sample absorbance was read at 510 nm using a UV/Vis spectrophotometer. A linear standard curve was obtained using rutin and quercetin in the range from 100 to 500 µg/mL, and

the total flavonoids content expressed as mg rutin equivalents/100mL and mg quercetin equivalents/100mL of juice.

2.8. Total Carotenoids

The carotenoids were extracted according to Rodriguez-Amaya (1999). Thirty milliliter of each juice from citrus varieties was placed in a nalgene vessel and mixed with thirty milliliter of the acetone, centrifuged and repeating the procedure until the white precipitate. Upon centrifugation, the upper colored layers containing the carotenoid pigments were recovered and washed with water to remove any trace of acetone. To obtain saponified carotenoids, the extracts were treated with ethanolic KOH solution (10% w/v) for 16 hours under dim light and at room temperature, after which they were washed with water to remove any trace of base. The pigment extract was partitioned to petroleum ether. The total carotenoid content was determined by measuring the absorbance at 450nm in a UV/Vis spectrophotometer and it was calculated according to Rodriguez-Amaya (1999) using the absorption coefficient of β -carotene ($A_{1\text{cm}}^{1\%} = 2592$). The total carotenoids content was expressed as $\mu\text{g/mL}$ of juice.

2.9. ABTS• and DPPH• Radical Scavenging Capacity

2.9.1. Extraction

Each sample of juice from citrus varieties (40g) was centrifuged at 6500 rpm for 3 min and different volumes of the supernatants were transferred into a 5 mL volumetric flasks and water were added up to mark – aqueous extract.

2.9.2. Antioxidant Capacity by DPPH[•] Method

The procedure followed was according to Brand-Williams et al. (1995) with some modifications. An aliquot (0.1 ml) of different concentrations for each extract, prepared in 2.9.1, was added to 2.46 mL of methanolic DPPH[•] solution (0.025g/L) and kept in the dark for 30 min. Absorbance was measured at 515 nm. The absorbance of the DPPH[•] solution was measured daily, until an absorbance value of 0.80 ± 0.05 . A linear standard curve from 100 to 500 μM of trolox was prepared and the results were expressed as μMol of Trolox equivalents/g of juice from citrus variety.

2.9.3. Antioxidant Capacity by ABTS[•] Method

The procedure followed was according to Rufino et al. (2007) with some modifications. An aliquot (30 μl) of different concentrations for each extract, prepared in 2.9.1, was added to 3.0 mL of radical ABTS[•] solution, and kept in the dark for 6 min. Absorbance was measured at 734 nm. The radical ABTS[•] solution was prepared by reaction of 5mL 7mM aqueous ABTS[•] solution and 88 μL potassium persulfate solution and stored in the dark for 16 hours at room temperature. The radical ABTS[•] solution was further diluted in methanol until an absorbance value of 0.70 ± 0.05 . A linear standard curve from 100 to 2000 μM of trolox was prepared and the results were expressed as μMol of Trolox equivalents/g of juice from citrus variety.

2.10. Statistical Analysis

All the results were submitted to an analysis of variance (ANOVA). Differences amongst the citrus varieties were determined using the Tukey test with the significance defined as $p < 0.05$. All data were reported as the mean $\pm$ standard deviation of the mean of three replicates.

3. Results and Discussion

3.1. Physicochemical Characterization

The quality parameters, TSS and TA, of each citrus variety studied are presented in Table I. The highest total soluble solid contents were found in the Grapefruit and Hamlin Orange, and these were significantly different from the Sweet Lime and Sicilian Lemon. The lowest total soluble solid content was found in the Sweet Lime.

The Sicilian Lemon was the fruit that had the highest titratable acidity content (6.60 g of acid citric/100mL juice) followed by Grapefruit (1.74 g of acid citric/100mL juice), while the Sweet Lime had the lowest content (0.53 g of acid citric/100mL juice) along with Hamlin Orange (0.65 g of acid citric/100mL juice).

Duzzioni et al. (2009) reported titratable acidity content (0.75 ± 0.09 %) in the Pera Orange close to that found in the Hamlin Orange (0.65 ± 0.02 %) of the present study.

Table I. Total Soluble Solids (TSS), Titratable Acidity (TA) and Ratio of Citrus Varieties Cultivated in Brazil.

	Scientific name	TSS (%)	TTA (%)	Ratio (TSS/TTA)
Sweet Lime	<i>Citrus aurantiifolia</i>	$7.29 \pm 0.41b$	$0.53 \pm 0.09a$	13.75
Hamlin Orange	<i>Citrus sinensis</i>	$12.30 \pm 0.14a$	$0.65 \pm 0.02a$	18.92
Grapefruit	<i>Citrus paradisi</i>	$12.91 \pm 0.87a$	$1.74 \pm 0.04b$	7.41
Sicilian Lemon	<i>Citrus limon</i>	$9.25 \pm 0.15c$	$6.60 \pm 0.08c$	1.40

Values are expressed as the mean $\pm$ standard deviation of three replicates for each value. Different letters in the same column indicate a significant difference ($p < 0.05$).

3.2. Antioxidant Compound Contents

The ascorbic acid, total carotenoids, total phenolics and total flavonoïds contents of some citrus varieties cultivated in Brazil are presented in the Table II.

The content of ascorbic acid in citrus varieties ranged from 11.57 mg ascorbic acid/100mL of juice (Sweet Lime) to 78.85 mg ascorbic acid/100mL of juice (Sicilian Lemon). The ascorbic acid content of the Sicilian Lemon was close to that reported in the variety Lima Orange (80.94 mg/100mL) by Duzzioni et al. (2009). The variety Grapefruit showed ascorbic acid content (42.06 mg/100mL) close to that in the variety Ponkan Tangerine (45.67 mg/100mL) described by Duzzioni et al. (2009). Dhuique-Mayer et al. (2005) reported ascorbic acid content in the variety Pera Orange of the 58.8 mg/100mL, its similar to that found in the variety Hamlin Orange (58.89 mg/100mL) of the present study. The ascorbic acid concentration in citrus fruits varies with the type of cultivar, maturity stage, growing conditions and others factors (Lee and Chen, 1998; Lee and Coates, 1999).

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 Sicilian Lemon and Sweet Lime had the lowest total phenolics contents (1.00 g and 1.07 g GAE/100mL of juice, respectively). The highest total phenolics content was found in variety Grapefruit (1.72 g GAE/100mL of juice).

The highest total flavonoids contents were of the Sicilian Lemon and Grapefruit (42.34 and 41.64 mg RE/100mL of juice, respectively), while that the Hamlin Orange had the lowest content (23.66 mg RE/100mL of juice). Also for the total flavonoids content expressed as mg of quercetin equivalent per 100mL of juice, the varieties that showed the highest contents were Sicilian Lemon and Grapefruit, and the lowest content was found in the Hamlin Orange.

Total carotenoids contents of the citrus varieties studied ranged from 0.29 ± 1.09 to 13.58 ± 2.18 $\mu\text{g/mL}$. The varieties Grapefruit and Hamlin Orange contained higher total carotenoids contents and were significantly different from the other citrus varieties. The composition of carotenoids in food may be affected by factors such as variety, maturity stage, geographic location or climate of the production, handling, harvesting and post harvest processing and storage. The cultivation in different regions leads to different shades of color, in the pulp and peel of the same variety (Kimura and Rodriguez-Amaya, 2002; Perfetti et al., 1988; Rodriguez-Amaya, 1999).

Table II. Ascorbic Acid, Total Phenolics, Total Flavonoids and Total Carotenoids Contents of Citrus Varieties Cultivated in Brazil.

	Ascorbic Acid (mg/100mL)	Total Phenolics (g GAE/100mL)	Total Flavonoids (mg RE/100mL) (mg QE/100mL)	Total Carotenoids (μg β -caroteno/mL)
Sweet Lime	$11.57 \pm 0.1\text{d}$	$1.07 \pm 2.12\text{c}$	$33.22 \pm 1.23\text{c}$ $55.27 \pm 1.43\text{b}$	$0.35 \pm 1.26\text{b}$
Hamlin Orange	$58.89 \pm 0.41\text{b}$	$1.50 \pm 3.02\text{b}$	$23.66 \pm 0.98\text{d}$ $38.53 \pm 2.56\text{c}$	$11.32 \pm 2.21\text{a}$
Grapefruit	$42.06 \pm 0.54\text{c}$	$1.72 \pm 1.06\text{a}$	$41.64 \pm 2.79\text{b}$ $69.38 \pm 0.97\text{a}$	$13.58 \pm 2.18\text{a}$
Sicilian Lemon	$78.85 \pm 1.37\text{a}$	$1.00 \pm 1.93\text{d}$	$42.34 \pm 4.95\text{a}$ $70.51 \pm 0.91\text{a}$	$0.29 \pm 1.09\text{b}$

Values are expressed as the mean $\pm$ standard deviation of three replicates for each value. Different letters in the same column indicate a significant difference ($p < 0.05$). GAE: gallic acid equivalent; RE: rutin equivalent; QE: quercetin equivalent.

3.3. ABTS• and DPPH• Radical Scavenging Capacity

The DPPH• radical scavenging capacity ranged from 1.53 ± 0.04 to 4.47 ± 0.09 $\mu\text{Mol Trolox/g}$ of juice and for ABTS• radical method the levels ranged from 1.71 ± 0.17 to 3.71 ± 0.28 $\mu\text{Mol Trolox/g}$ of juice (Figure 1). The lowest radical scavenging

capacity was found in the Sweet Lime (1.53 ± 0.04 $\mu\text{Mol Trolox/g}$ of juice) for ABTS• method, and Sicilian Lemon (1.71 ± 0.17 $\mu\text{Mol Trolox/g}$ of juice) for DPPH• method. The Sweet Lime had the lowest ascorbic acid content (11.57 mg/100mL) and intermediate total flavonoid content (33.22 mg RE/100mL and 55.27 mg RQ/100mL), and the Sicilian Lemon had the lowest total phenolic content (1.00 g GAE/100mL).

The highest radical scavenging capacity was found in the variety Grapefruit for both methods (4.47 ± 0.09 $\mu\text{Mol Trolox/g}$ of juice for DPPH method and 3.71 ± 0.28 $\mu\text{Mol Trolox/g}$ of juice for ABTS method). The Grapefruit had the higher total phenolics (1.72g GAE/100mL) and total carotenoids contents (13.58 $\mu\text{g/mL}$). These results suggest that phenolics compounds and carotenoids are the main contributors to the antioxidant capacity of citrus.

Comparing both the methods for evaluate the radical scavenging capacity of citrus varieties, can see that the varieties Sweet Lime, Grapefruit and Sicilian Lemon showed significant difference in the antioxidant capacity between the methods. There was not significant difference between both the methods only in the variety Hamlin Orange. But if to compare the radical scavenging capacities between the citrus varieties studied, for the ABTS• method only the Grapefruit differed significantly from the other varieties, and for the DPPH• method all the citrus varieties were significantly different (Figure 1).

The antioxidant activity shown by citrus fruit extracts may has been ascribed to the presence of flavonoids, carotenoids and ascorbic acid (Gorenstein et al., 2004). 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 (Ghahua et al., 2008).

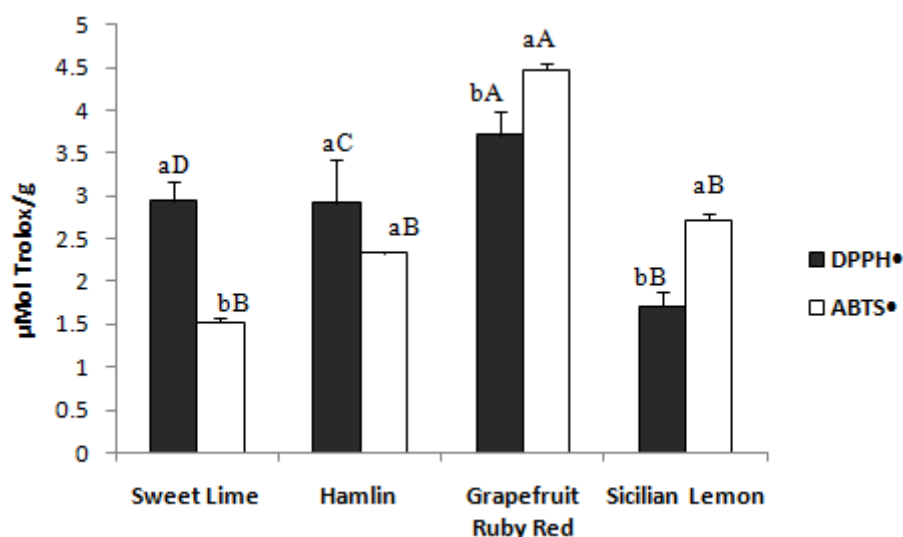


Figure 1. ABTS• and DPPH• radical scavenging capacity of the citrus varieties cultivated in Brazil.

*Values are expressed as the mean $\pm$ standard deviation of three replicates for each value. Different lowercase letters indicate a significant difference ($p < 0.05$) between the methods for each citrus variety. Different capital letters indicate a significant difference ($p < 0.05$) between the citrus varieties for each method.

4- Conclusion

The Sicilian Lemon had the highest total titratable acidity, ascorbic acid and total flavonoides contents, and the lowest total phenolics and total carotenoids contents. The Grapefruit showed the highest total carotenoids and total phenolics contents. Among the citrus varieties analyzed in the present study, the Grapefruit showed higher radical scavenging capacity. These results suggest that the phenolics compounds and carotenoids are the main contributors to the total antioxidant capacity of citrus.

5- References

- Association of Official Analytical Chemists. (1990). Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists. Arlington, USA: AOAC Inc.
- Arena E, Fallico B, Maccarone E. (2001). Evaluation of antioxidant capacity of blood orange juices as influenced by constituents, concentration process and storage. *Food Chem* 74:423-427.
- Bartolomé B, Bengoechea ML, Sancho AI, Estrella I, Hernández T, Gómez-Cordovés C. (1998). Differentiation of intermediate products (concentrates and purées) from the fruit industry by means of phenolics content. *Z Lebensm Unters Forsch A* 206:355-359.
- Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. (1995). Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm Wiss Technol* 22:25-30.
- Burri BJ. (1997). Beta-carotene and human health: a review of current research. *Nutr Res* 17:547-580.
- Caro AD, 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 Chem* 84:99-105.
- Dhuique-Mayer C, Caris-Veyrat C, Ollitrault P, Curk F, Amiot MJ. (2005). Varietal and interspecific influence on micronutrient contents in citrus from Mediterranean area. *J Agric Food Chem* 53:2140-2145.
- Duzzioni AG, Franco AG, Sylos CM. (2009). Radical scavenging activity of orange and tangerine varieties cultivated in Brazil. *Intern Journal of Food Sciences and Nutrition* 60:107-115.
- Gardner PT, White TAC, Mcphail DB, Duthie GG. (2000). The relative contributions of vitamin C, carotenoids and phenolics to the antioxidant potential of fruit juices. *Food Chem* 68:471-474.

- Gorenstein S, Cvikrova M, Machackova I, Harakit R, Park JI, Jung S. (2004). Characterization of antioxidant compounds in Jaffa sweeties and white grapefruits. *Food Chem* 84:503-510.
- González-Molina E, Moreno DA, García-Viguera C. (2008). Genotype and harvest time influence the phytochemical quality of Fino lemon juice (*Citrus limon* L.) Burn. F.) for industrial use. *J Agric Food Chem* 56:1669-1675.
- 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 Chem* 106:545-551.
- Guimarães R, Barros L, Barreira JCM, Sousa MJ, Carvalho AM, Ferreira ICFR. (2010). Targeting excessive free radicals with peels and juices of citrus fruits: grapefruit, lemon, lime and orange. *Food Chem Toxicol* 48: 99-106.
- Isabelle M, Lee BL, Lim MT, Kooh W, Huang D, Ong CN. (2010). Antioxidant activity and profiles of common fruits in Singapore. *Food Chem* 120:993-1003.
- Kimura M, Rodriguez-Amaya DB. (2002). A scheme for obtaining standards and HPLC quantification of leafy vegetable carotenoids. *Food Chem* 78:389-398.
- Kuljarahanan T, Devahastin S, Chiewchan N. (2009). Evolution of antioxidant compounds in lime residues during drying. *Food Chem* 113:944-949.
- Lachman J, Orsák M, Hejtmánková A, Kovarová F. (2010). Evaluation of antioxidant activity and total phenolics of selected Czech honeys. *LWT - Food Sci Technol* 43:52-58.
- Lee HS, Chen CS. (1998). Rates of vitamin C loss and discoloration in clear orange juice concentrate during storage at temperature of 4-24°C. *J Agric Food Chem* 46:4723-4727.

Lee HS, Coates GA. (1999). Vitamin C in frozen, fresh squeezed, unpasteurized, polyethylene-bottled, orange juice: a storage study. *Food Chem* 65:165-168.

United States Department of Agriculture, (2010). Production, Supply and Distribution Online. Available at: <http://www.fas.usda.gov/psdonline/psdHome.aspx>. Accessed on 13 Sept 2010.

Palace VP, Khaper N, Quin Q, Singal PK. (1999). Antioxidant potentials of vitamin a and carotenoids and their relevance to heart disease. *Free Radical Biol Med* 26:746-761.

Perfetti GA, Joe FLJ, Fazio T, Page SW. (1988). Liquid chromatographic methodology for the characterization of orange juice. *Journal Assoc Off Anal Chem* 71:469-473.

Rapisarda P, Tomaino A, Lo Cascio R, Bonina F, De Pasquale A, Saija A. (1999). Antioxidant effectiveness as influenced by phenolic content of fresh orange juices. *J Agric Food Chem* 47:4718-4723.

Rodriguez-Amaya DB. (1999). A guide for carotenoid analysis in foods. Washington, DC: International Life Sciences Institute Press.

Rufino MSM, Alves RE, Brito ES, Morais SM, Sampaio CG, Pérez-Jinénez J, Saura-Calixto FD. (2007). Metodologia científica: Determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre ABTS•. Embrapa - Comunicado Técnico online128.

Sánchez-Moreno C, Larrauri JA, Saura-Calixto F. (1998). A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *J Sci Food Agric* 76:270-276.

Scalbert A, Monties B, Janin G. (1989). Tannins in wood: Comparison of different estimation methods. *J Agric Food Chem* 37:1324-1329.

Serafini M, Bellocchio R, Wolk A, Ekstrom AM. (2002). Total antioxidant potential of fruit and vegetables and risk of gastric cancer. *Gastroenterology* 102: 985-991.

- Singleton VL, Rossi JA. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolibdic-phosphotungstic acid reagents. *Amer J Enol Viticult* 16:144-158.
- Sun J, Chu YF, Wu X, Liu RH. (2002). Antioxidant and antiproliferative activities of common fruits. *J Agric Food Chem* 50:7449-7454.
- Wang YC, Chuang YC, Ku YH. (2007). Quantitation of bioactive compounds in citrus fruits cultivated in Taiwan. *Food Chem* 102:1163-1171.
- Yoo KM, Lee KW, Park JB, Lee HJ, Hwang IK. (2004). Variation in major antioxidants and total antioxidants activity of yuzu (*Citrus junos Sieb ex Tanaka*) during maturation and between cultivars. *J Agric Food Chem* 52: 5907-5913.
- Yu D, Dahegren RA. (2000). Evaluation of methods for measuring polyphenol in conifer foliage. *J Chem Ecology* 26:2119-2140.
- Zhishen J, Mengcheng T, Jianming W. (1999). The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chem* 64:555-559.

CAPÍTULO 3

**QUANTIFICAÇÃO DE CAROTENÓIDES,
FLAVANONAS E COR EM FRUTAS
CÍTRICAS**

RESUMO

O Brasil é o maior produtor mundial de laranjas e de suco de laranja concentrado sendo o primeiro lugar em produção ocupado pelo estado de São Paulo. Algumas frutas cítricas, mesmo não sendo popularmente conhecidas como as laranjas doces, demonstram grande interesse por parte de pesquisadores e produtores. A cor é um importante fator de qualidade nos alimentos, pois dela depende a aceitação ou não pelos consumidores e influencia ainda a percepção do aroma, sabor e textura dos alimentos. São fontes de compostos antioxidantes como carotenóides e flavonóides que atuam em defesa ao nosso organismo. O objetivo deste trabalho foi avaliar os teores de carotenóides, flavanonas e cor nas variedades cítricas *grapefruit*, limão Siciliano, laranja Hamlin e lima da Pérsia. As variedades Lima da Pérsia e limão Siciliano apresentaram coloração menos amarelada em relação à Hamlin e a *Grapefruit* apresentou uma coloração mais avermelhada que as demais. A hesperidina foi a flavanona encontrada em três das quatro frutas estudadas e o limão Siciliano foi a única fruta que apresentou a flavanona eriocitrina (91,08 mg/L). A laranja Hamlin apresentou todos os carotenóides estudados e o limão Siciliano apenas β -caroteno e β -criptoxantina.

Palavras-chave: frutas cítricas, Cor; Flavanonas e Carotenóides

Introdução

As frutas cítricas são importantes fontes de compostos antioxidantes como o ácido ascórbico, carotenóides e compostos fenólicos, podendo trazer vários benefícios à saúde e associados à prevenção de várias doenças degenerativas, como câncer, diabetes, doenças cardiovasculares e neurológicas, catarata, degeneração macular associada à idade entre outras (MULLER et al, 2010, 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 um atributo decisivo na 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).

O sistema CIELab (*Comission Internationale de l'Eclairage, International Comission on Illumination* –Lightness, redness-greenness, and yellowness-blueness) fundado em 1976, 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 Chroma (C^*) e o ângulo Hue (OLIVEIRA et al., 2003).

A cor dos sucos cítricos é devida principalmente à presença dos pigmentos carotenóides. Citros em geral, são excelentes fontes de carotenóides, com uma larga variedade destes pigmentos. Eles fornecem a cor amarela, laranja e vermelho de muitos alimentos (MELÉNDEZ-MARTÍNEZ et al., 2005). Os carotenóides apresentam estrutura básica tetraterpênica com 40 átomos de carbono, formada por oito unidades isoprenóides de cinco carbonos, ligados de tal forma que a molécula é linear com simetria invertida no centro.

O suco de laranja é a mais importante fonte alimentar de pró-vitamina A (β -caroteno, α -caroteno e β -criptoxantina) e antioxidantes carotenóides (β -caroteno, β -criptoxantina, luteína e zeaxantina), devido ao seu conteúdo e elevado consumo (GIOVANNUCCI, 1999; SLATERRY et al., 2000; TEMPLE, 2000). As pró-vitaminas A constituem a maior fonte de vitamina A da dieta, contribuindo com uma média de 68% mundialmente e 82% nos países em desenvolvimento (SIMPSON, 1983). Esses carotenóides têm sido indicados na diminuição de doenças degenerativas, como câncer e doenças cardio e neurovasculares (TIBLE, 1998) devido a sua propriedade antioxidante (De ANCOS et al., 2002), cataratas e degeneração macular, como também melhora do sistema imunológico (VAN DEN BERG et al., 2000; MAOKA et al., 2001).

Os flavonóides constituem o mais importante grupo de compostos fenólicos, onde três tipos de flavonóides ocorrem com frequência em frutas cítricas: flavanonas, flavonas e flavonóis (BENAVENTE-GARCIA et al., 1997, CALABRÓ et al., 2004; MOURA et al., 2008). A maior parte dos flavonóides encontrados nos alimentos ocorre na forma de glicosídeo, isto é, com alguma molécula de açúcar ligada à sua estrutura, podendo ser encontrados como glicose e outros açúcares, tais como glicoramnose, arabinose, galactose e ramnose (COOK e SAMMAN, 1996; HEIN et al., 2002). Os flavonóides que não se encontram ligados a nenhuma substância química são chamados de agliconas.

A importância dos flavonóides na saúde humana se deve às inúmeras funções biológicas, verificadas tanto *in vitro* como *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 Brasil é o maior produtor mundial de laranjas e maior exportador de suco de laranjas, atendendo hoje cerca de 50% da demanda e 75% das transações internacionais (ABECITRUS, 2009). As frutas cítricas são produzidas em todo o mundo e de acordo com os dados de 2009 do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA), os maiores produtores de cítricos são Brasil, Estados Unidos, a China e os países do Mediterrâneo. No Brasil, o estado de São Paulo é o maior produtor de laranjas, mas frutas como *grapefruit*, lima e limão Siciliano mesmo sendo produzidos no Brasil, são mais apreciadas na Europa e América do Norte (GUIMARÃES et al., 2010).

As *grapefruits* pertencem a *C. paradisi* e as variedades variam de cor na sua polpa, devido à presença (rosa/vermelho) ou ausência (branco) de licopeno. A laranja Hamlin (*Citrus sinensis*) é muito usada na indústria para obtenção de suco processado. O limão (*Citrus lemon*) é uma fonte rica de nutrientes antioxidantes e tem sido associado ao conteúdo de vitamina C, mas foi recentemente demonstrado que os flavonóides podem igualmente desempenhar um importante papel em relação à atividade antioxidante (GONZALEZ-MOLINA et al. 2008).

Por serem frutas pouco conhecidas e apreciadas no Brasil são escassos os estudos brasileiros destas frutas. O objetivo deste trabalho é avaliar os teores de alguns constituintes químicos que apresentam funcionalidade como carotenóides, flavanonas, assim como os parâmetros de cor nas variedades cítricas *grapefruit*, limão Siciliano, laranja Hamlin e lima da Pérsia.

Material e Métodos

Amostras

Foram selecionados três lotes de quatro variedade cítricas: *grapefruit* Ruby Red, lima da Pérsia, limão Siciliano e laranja Hamlin. As frutas foram adquiridas em indústria e supermercados da região de Araraquara (São Paulo, Brasil), sendo escolhidas aleatoriamente, independentemente do seu grau de maturação, onde cada lote continha aproximadamente 15 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: *Hamlin*=18,65; *lima da Pérsia*=13,21; *limão Siciliano*=1,17 e *Grapefruit* = 7,46.

Métodos

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, CQIIUNI 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 $(a^*/b^*)^2$. Os ângulo hue e Chroma foram calculados segundo as equações (ARIAS *et al.*, 2000):

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

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

Extração dos carotenóides

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 450nm. 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 dos carotenóides por CLAE

Os pigmentos carotenóides foram analisados por RP-HPLC usando gradiente ternário de eluição e uma coluna Symmetry C₁₈ (4.6 x 150 mm I.D., 3.5 μ m) da Waters. O sistema cromatográfico era equipado com detector por arranjo de fotodiodos (DAD) e a fase móvel consistia de acetonitrila: metanol: acetato de etila contendo 0.05% de trietilamina com vazão de 0.6 mL/min. Um gradiente foi aplicado a partir de 99:1:0 para 64:1:35 em 30 minutos e 99:1:0 em 60 min. O volume de injeção foi de 20 μ L. Detecção realizada de 350 a 550 nm. As amostras e as soluções foram filtradas em membrana de 0.22 μ m antes da injeção.

Os carotenóides isolados individualmente em amostras foram identificados por comparação de seu tempo de retenção no HPLC e pelas características dos espectros do arranjo de diodos com padrões e também valores na literatura.

Determinação do teor das flavanonas glicosídicas (FGs)

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

A coluna empregada na separação das flavanonas foi C18 Shimadzu Shimpack CLC-ODS (M) (4,6 x 250 mm, 5µm) e como fase móvel, a mistura acetonitrila:água (ajustada para o pH 2,5 com ácido acético) e vazão de 0,7mL/min com detector por arranjo de fotodiodos (DAD). O tempo de corrida foi de 30minutos e a detecção realizada a 280nm. As amostras e as soluções padrão foram filtradas em membrana 0,22µm antes da injeção.

Todos os solventes utilizados foram previamente filtrados em sistema Millipore de filtração à vácuo com membrana filtrante Nylon 66 para solvente orgânico de 0,45µm (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 narirutina) entre 200 e 450nm. Os resultados foram expressos como mg/L.

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 parâmetros significativamente diferentes. A variedade Lima da Pérsia apresentou o maior valor negativo de a^* e a *Grapefruit* valor positivo de a^* , indicando que, a maior saturação da cor vermelha (valor positivo a^*) demonstra que o suco da *Grapefruit* é mais vermelho que as demais, ou seja, os carotenóides mais amarelos presentes nos sucos apresentam-se com valor negativo de a^* e positivo de b^* . O mesmo comportamento foi observado por Meléndez-Martínez et al. (2007), os carotenóides vermelhos, licopeno e cantaxantina apontaram valor positivo de a^* e b^* , enquanto que, os mais amarelos apresentaram valor negativo de a^* e positivo de b^* . Os valores referentes ao parâmetro b^* foram positivos para todas as variedades, no entanto os valores das variedades Lima da Pérsia e Hamlin se destacaram o que indica a presença mais amarelada destes sucos. O parâmetro h mostra a localização da cor em um diagrama, onde o ângulo 0° representa vermelho puro; 90° , o amarelo puro; 180° , o verde puro e o 270° , o azul puro. As frutas *Grapefruit*, Lima da Pérsia e limão Siciliano apresentaram ângulo próximo a 25° (tonalidade pouco amarelada) e a variedade Hamlin

próximo a 80° (tonalidade amarelada). 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 (OLIVEIRA, 2002). Das quatro variedades de frutas cítricas estudadas, os valores mais próximos de zero são os das variedades *Grapefruit* e Limão Siciliano.

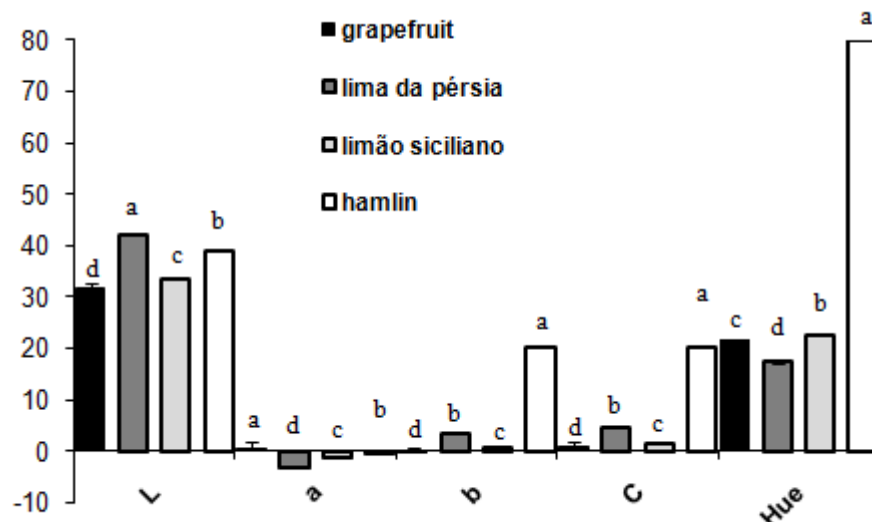


Figura 1: Valores de cor do sistema CIELAB para os quatro tipos de sucos cítricos. Os valores representam médias±DP. Médias com letras iguais não diferem significativamente ($p \leq 0,05$) entre si pelo teste de Tukey.

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 C e h foram inversamente proporcionais.

Conteúdo de Carotenóides por CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência)

Os carotenóides presentes nas quatro frutas foram o β -caroteno e β -criptoxantina, sendo que a variedade *Grapefruit* apresentou teores de β -caroteno

(1483,24 $\mu\text{g/L}$) bem acima das demais e a variedade Hamlin, apresentou o carotenóide β -criptoxantina (400,18 $\mu\text{g/L}$), superior às outras três variedades (Tabela 1), sendo que este carotenóide é o principal de muitas frutas de polpa alaranjada.

A variedade Hamlin foi a única fruta que apresentou todos os carotenóides estudados e a fruta limão Siciliano apresentou somente dois carotenóides.

Ao tentar correlacionar o teor do carotenóide com valores do parâmetro a^* das frutas das variedades Lima da Pérsia e limão Siciliano, percebe-se que o teor de β -caroteno dessas duas frutas é menor indicando o valor do parâmetro a^* negativo, ou seja, apresentando suco mais claro em relação à *Grapefruit* e Hamlin.

Sánchez-Moreno et al., (2003) em seus estudos com sucos comerciais de laranjas, não encontraram uma correlação significativa entre a concentração total de carotenóide 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.

Para os carotenóides luteína, violaxantina, β -criptoxantina e zeaxantina, a variedade Hamlin (252,98 $\mu\text{g/L}$; 234,69 $\mu\text{g/L}$; 400,18 $\mu\text{g/L}$; 443,05 $\mu\text{g/L}$, respectivamente) demonstrou ser a fruta que apresentava os maiores teores em sua polpa relacionada às demais frutas estudadas.

Embora as implicações da violaxantina na saúde ainda não tenham sido demonstradas, esse carotenóide representa um dos principais por estar largamente distribuído em alguns alimentos, tendo em conta que a violaxantina é um carotenóide que pode ser perdido facilmente durante a análise (Rodriguez-Amaya et al., 2008).

Tabela 1: Conteúdo de carotenóides ($\mu\text{g/L}$) nas variedades de frutas *Grapefruit* Ruby Red, Lima da Pérsia, Limão Siciliano e Hamlin.

	Grapefruit Ruby Red	Lima da Pérsia	Limão Siciliano	Hamlin
β-caroteno	1483,24 $\pm$ 210,02a	6,34 $\pm$ 0,5b	6,06 $\pm$ 0,86b	90,03 $\pm$ 4,9b
β-criptoxantina	101,13 $\pm$ 40,62b	75,5 $\pm$ 5,8b	21,04 $\pm$ 0,12c	400,18 $\pm$ 7,0a
α-criptoxantina	36,42 $\pm$ 22,75a	-*	-*	60,07 $\pm$ 3,87a
Zeaxantina	194,38 $\pm$ 5,48b	-*	-*	443,05 $\pm$ 39,4a
Luteína	42,2 $\pm$ 2,19b	5,45 $\pm$ 0,5b	-*	252,98 $\pm$ 67,2a
Violaxantina	-*	2,54 $\pm$ 0,0b	-*	234,69 $\pm$ 52,2a

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

- *não determinado.

Conteúdo de flavanonas glicosídicas (FGs)

Quatro diferentes tipos de flavanonas glicosídicas (eriocitrina, naringina, hesperidina e narirutina) foram analisados nas quatro variedades de frutas cítricas (Tabela 2). A naringina, flavanona típica de frutas amargas, foi detectada somente na grapefruit e no limão Siciliano. A hesperidina e a narirutina foram encontradas em três das quatro frutas cítricas em questão.

O teor de hesperidina encontrado nas frutas cítricas analisadas variou de 55,80 a 287,38 mg/L. A variedade Hamlin apresentou o maior teor deste constituinte ($p \leq 0,05$) diferindo das demais variedades, enquanto que a variedade Limão Siciliano apresentou o menor teor ($p \leq 0,05$).

Tabela 2: Conteúdo de flavanonas glicosídicas (mg/L) nas variedades de frutas Grapefruit, Lima da Pérsia, Limão Siciliano e Hamlin.

	Grapefruit Ruby Red	Lima da Pérsia	Limão Siciliano	Hamlin
Eriocitrina	nd	-	91,08±0,1	Nd
Naringina	965,14±3,1b	nd	1005,59±4,8a	Nd
Hesperidina	nd	58,60±0,8b	55,80±0,7b	287,38±8,3a
Narirutina	55,09±02b	12,09±1,56c	nd	64,01±1,8b

Os valores representam médias de três lotes±DP. Linhas com diferentes letras são significativamente diferentes no teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

nd - não determinado.

Segundo Xu et al., (2008) as principais flavanonas glicosídicas presentes no suco de laranjas e tangerinas cultivadas na China foram a hesperidina e a narirutina, sendo que a naringina e a neohesperidina não foram detectadas. Em seus estudos, o teor de hesperidina 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 variedade Hamlin, neste estudo, conteve um valor superior deste constituinte (287,38 mg/L).

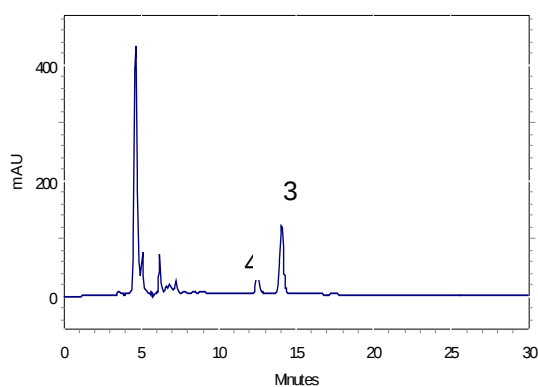
Grapefruit não é uma fruta cítrica muito consumida e produzida no Brasil, embora esteja disponível no comércio para consumo. Assim como o limão Siciliano, apresenta uma composição de flavanona diferente das laranjas doces, tendo como flavanona principal a naringina que não é encontrada em laranjas doces. Assim, foi possível avaliar a separação de flavanonas de uma fruta cítrica com uma composição diferente das demais.

O teor de naringina encontrado foi de 965,14 mg/L para *Grapefruit* Ruby Red e 1005,59 mg/L no limão Siciliano. E o teor de eriocitrina encontrado no limão Siciliano foi de 91,08 mg/L.

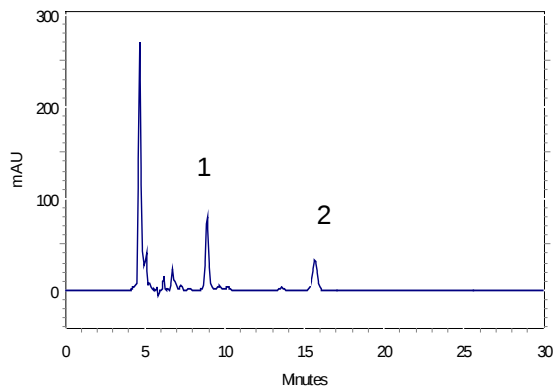
Marin et al., (2002) estudaram duas variedades de limão cultivadas na Espanha e encontraram duas flavanonas, a eriocitrina e a hesperidina com teores variando de $81,5 \pm 5$ a 111 ± 12 mg/L e 104 ± 15 a 224 ± 20 mg/L respectivamente, estando de acordo com nossos resultados para a flavanona eriocitrina, mas para a hesperidina, em nossos resultados apresentou teores mais baixos. No entanto, alguns fatores tais como variedades de citros e grau de maturidade da fruta entre outros, podem causar estas divergências nos valores encontrados.

De acordo com Vanamala et al., 2006 o teor de naringina encontrado em suco pasteurizado de *Grapefruit* variou de 230,50 a 370,20 mg/L, valores bem abaixo do que foi encontrado neste trabalho (965,14 mg/L), no entanto estes mesmos autores encontraram teores de narirutina nesta fruta (90,1 a 110,7 mg/L), a qual não foi detectada neste estudo.

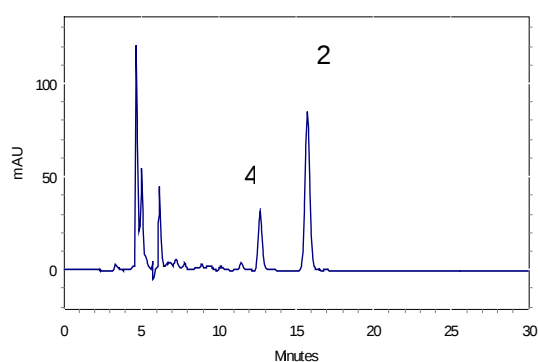
Entre as limas doces ou comuns, a variedade Lima da Pérsia se encontra disponível no mercado brasileiro, mas existem poucos relatos na literatura sobre a composição de flavanonas nessa variedade. O teor médio de hesperidina encontrado foi de 58,60 mg/L e a narirutina 12,9 mg/L.



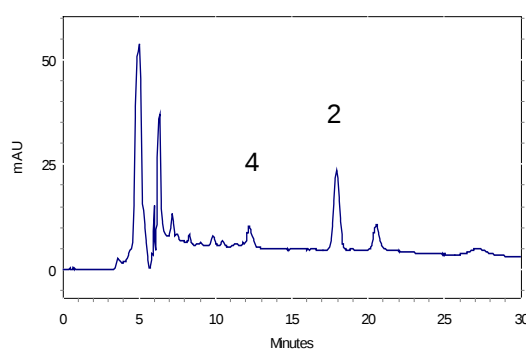
a) *grapefruit* Ruby Red



b) Limão Siciliano



c) laranja Hamlin



d) Lima da Pérsia

Figura 3: Cromatogramas característicos obtidos por CLAE das flavanonas das variedades *Grapefruit*, limão Siciliano, laranja Hamlin e lima da Pérsia. Identificação dos picos: 1- Eriocitrina; 2- Hesperidina; 3- Naringina; 4- Narirutina.

Conclusões

Com os resultados obtidos das análises das quatro variedades cítricas, pode-se concluir que a variedade Hamlin apresentou em seu suco todos os carotenóides analisados. Para os parâmetros de cor, percebeu-se que as quatro variedades de frutas cítricas avaliadas apresentaram parâmetros significativamente diferentes. A fruta *Grapefruit* obteve um conteúdo de β -caroteno superior ($p \leq 0.05$) às demais variedades.

A flavanona hesperidina foi encontrada em maior quantidade na fruta Hamlin. O limão Siciliano foi a fruta que apresentou três das quatro flavanonas estudadas.

Referências

- ABECITRUS – Associação Brasileira dos Exportadores de Cítricos. Disponível em http://www.abecitrus.com.br/industria_br.html, acessado em outubro de 2009.
- BENAVENTE-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.
- COOK, N. C. e SAMMAN, S. Flavonoids: Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. **J. Nutr Bioch.**, v.7, p.66-76, 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.
- 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. **J. Nat. Cancer Instit.**, v.91, p.317-331, 1999.
- GONZÁLEZ-MOLINA, E.; MORENO, D. A.; GARCÍA-VIGUERA, C. Genotype and harvest time influence the phytochemical quality of Fino lemon juice (*Citrus limon* L.) Burn. F.) for industrial use. **J. Agric. Food Chem.**, v.56, p.1669-1675, 2008.

GUIMARÃES, R.; BARROS, L.; BARREIRA, J. C. M.; SOUSA, M. J.; CARVALHO, A. M.; FERREIRA, I. C. F. R. Targeting excessive free radicals with peels and juices of citrus fruits: grapefruit, lemon, lime and orange. **Food Chem Toxicol**, v. 48, p. 99-106, 2010.

HEIM, K. E.; TAGLIAFERRO, A. R.; BOBILYA, D. J. Flavonoid antioxidants: chemistry metabolism and structure-activity relationships. **J. Nutr. Biochem.**, v.13, p. 572-584, 2002.

HOLLMAN, P. C. H.; HERTOOG, M. G. L.; KATAN, M. B. Analysis and health effects of flavonoids. **Food Chem.**, v.57, p. 43-46, 1996.

KAWAI, 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.

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.

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.

MOURA, L. M.; SYLOS, C. M. The effect of the manufacturing process on the citrus juice on the concentrations of flavanones. **Alim Nutr**, v.19, p.379-384, 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.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B.; KIMURA, M.; AMAYA-FARFAN, J. Fontes Brasileira de carotenóides: tabela brasileira de composição de carotenóides em alimentos. Brasília:MMA/SBF, 2008.

SÁNCHEZ-MORENO, C.; BEGOÑA DE ANCOS, L. P.; CANO, M. P. Effect of high-pressure processing on health-promoting attributes of freshly squeezed orange juice (*Citrus sinensis* L.) during chilled storage. **Eur. Food Res. Technol.**, v.216, p.18-22, 2003.

SIVAM, G. Analysis of flavonoids. Methods of analysis for functional foods and nutraceuticals. Ed. W. J. Hurst. Cap.9, 2002, p.350.

VANAMALA, J.; REDDIVARI, L.; YOO, K. S.; PIKE, L. M.; PATIL, B. S. Variation in the content of bioactive flavonoids in different brands of orange and grapefruit juices. **J. Food Comp Anal.**, v.19, p.157-166, 2006.

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.

CAPÍTULO 4

DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E CONSTITUINTES BIOATIVOS EM LARANJAS DE POLPA VERMELHA

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 laranja claras, no entanto as laranjas de polpa vermelha, 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. 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 quatro frutas vermelhas, sendo três Sanguíneas de mombuca cultivadas em lugares distintos, uma baía Cara Cara (CCSM - Cordeirópolis) e a fruta controle Pêra Río, quanto aos principais constituintes bioativos e atividade antioxidante via radical livre DPPH• e ABTS• colhidas no início, meio e fim de safra. A variedade mombuca cultivada em São Bento do Sapucaí apresentou o maior teor de ácido ascórbico no 1º lote tanto de 2008 como de 2009 e o menor de flavonóides totais, já as variedades Sanguínea de Mombuca de Mogi Mirim e Baía Cara Cara contiveram os maiores teores de fenólicos totais. Para os teores de carotenóides totais, a mombuca de Cordeirópolis (CV93) apresentou no 1º e 2º lotes os maiores teores. A atividade antioxidante de cada fruta analisada demonstrou ser o DPPH• o método mais ideal avaliado, sendo que na fruta controle foi o inverso, ou seja, o ABTS• mostrou-se mais adequado.

Palavras-chave: frutas cítricas, DPPH•, ABTS•, fenólicos totais, ácido ascórbico e carotenóides totais.

Introdução

O aumento da demanda dos consumidores por alimentos que apresentam propriedades funcionais tem impulsionado o interesse de pesquisadores e indústria pelo segmento de novos produtos. Nos últimos anos, têm se observado um aumento significativo no consumo de frutos tropicais, principalmente frutas cítricas. Atualmente a maior parte da produção 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). O Estado de São Paulo é o maior produtor brasileiro de laranjas com 80% da produção, seguido da Bahia (4%), Sergipe (4%) e Minas Gerais (3%) (NEVES e LOPES, 2005).

As laranjas podem ser divididas em dois grandes grupos de acordo com sua coloração: grupo das laranjas brancas ou claras e grupo das laranjas sanguíneas (BITTERS, 1961). A coloração na polpa e no suco das laranjas é devido a presença de carotenóides, podendo variar de cor na polpa entre as variedades devidas as variações na quantidade dos diferentes carotenóides presentes (GAMA e SYLOS, 2005). O grupo das laranjas claras inclui quase todas as laranjas comerciais cultivadas no mundo, incluindo as variedades de mesa (laranjas Baías, Navel, Baianinhas e outras), variedades usadas para a extração de suco (Pêra, Valência, Natal, Hamlin e outras) e laranjas sem acidez como Laranja Lima e Suchari.

Já as laranjas sanguíneas são mais cultivadas nas regiões do mediterrâneo e na Índia, onde apresentam grande aceitação comercial e apresentam coloração vermelha-intensa na polpa e no suco, devido à presença do pigmento antocianina sendo muito apreciadas não só pela coloração e sabor, como também pelo benefício a saúde (BERNARDI et al., 2010; KELEBEK et al, 2008; MONDELLO et al, 2000). Como exemplos de variedades mais conhecidas e utilizadas, podem ser citadas: Tarroco,

Moro, Sanguigno doppio, Sanguinella e Sanguinelo (*Citrus sinensis*(L.) Osbeck), dentre outras (MONDELLO et al, 2000).

Um terceiro grupo de variedades, não descrito por BITTERS (1961), são as variedades de laranja com coloração vermelha intensa da polpa, chamadas de laranjas falsas-sanguíneas ou de polpa vermelha que é devida à presença de teores dos carotenóides: beta-caroteno e licopeno na polpa, em comparação com as laranjas claras (XU et al., 2006).

As frutas cítricas são conhecidas como importantes fontes de compostos com atividade antioxidante como ácido ascórbico e compostos fenólicos, e que podem trazer vários benefícios à saúde, estando associados à prevenção de desenvolver doenças degenerativas, como câncer, diabetes, doenças cardiovasculares e neurológicas (BERNARDI et al., 2010; SANCHEZ-MORENO et al., 2003).

Nos últimos anos, a capacidade antioxidante total dos alimentos tem recebido grande destaque em trabalhos científicos devido ao potencial sinérgico de compostos bioativos presentes (SERAFINI et al., 2002). Os radicais livres estável 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH •) e 2,2'-azinobis (ácido 3-ethylbenzoathiazoline-6-sulfônico) (ABTS) • tem sido amplamente utilizados para testar a habilidade dos radicais livres de vários polifenóis antioxidantes na dieta (BRAND-WILLIAMS et al., 1995; RUFINO et al., 2007; SÁNCHEZ-MORENO et al., 1998).

A citricultura brasileira tem apresentado nos últimos anos novas tecnologias para melhoria no uso de mudas com qualidade e novos materiais genéticos. E como são novas as variedades de polpa vermelha cultivadas no Brasil, estudos dessas frutas ainda são muito raros. O objetivo deste trabalho é avaliar a importância dos compostos bioativos, bem como, as variações dos teores em diferentes épocas e sua atividade antioxidante via radical livre DPPH• e ABTS•.

Material e Métodos

Amostras

Foram selecionados três lotes no ano de 2008 e três lotes no ano de 2009 das variedades de laranjas vermelhas: Sanguínea de Mombuca (de São Bento do Sapucaí (MSBS), Cordeirópolis (CV 93) e Mogi Mirim (MMM) e Baía Cara Cara CN486 (Cordeirópolis). As frutas foram fornecidas pelo Instituto Agronômico de Campinas (IAC), sendo escolhidas aleatoriamente, independentemente do seu grau de maturação, onde cada lote continha aproximadamente 15 frutos. O suco das frutas foi obtido a partir de um extrator manual de suco.

Métodos

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

O teor de sólidos solúveis totais (°Brix) e de acidez total titulável (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 absorbância a 510 nm. A rutina foi utilizada como padrão para a obtenção da curva de calibração. Os resultados foram expressos em mg equivalente de rutina/mL.

Atividade Sequestrante do Radical Livre

Extração para os métodos DPPH• e ABTS•

Duplicata de cada amostra (40g) foi centrifugada a 6500 rpm por 3 min e diferentes volumes do sobrenadante foram transferidos para balões volumétricos de 5 mL, adicionando água destilada.

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.

Uma alíquota (0,1mL) de diferentes concentrações do sobrenadante obtido na extração (concentrações do suco em água) de cada suco foi misturada com 2,46 mL da solução metanólica de DPPH• (0,025g/L) e incubados por 30 minutos no escuro. A leitura da absorbância foi realizada a 515 nm. A partir da curva de calibração do DPPH• em Trolox e dos valores da absorbância de cada concentração, os resultados foram expressos em TEAC (atividade antioxidante equivalente em Trolox) como $\mu\text{Mol Trolox/g}$.

Determinação da atividade antioxidante pelo método de ABTS•

O procedimento seguido foi de acordo com Rufino et al. (2007) com algumas modificações. Uma alíquota (30 μL) do sobrenadante obtido na extração de diferentes concentrações, preparada na extração, foi adicionada pela reação de 5 mL de solução etanólica de ABTS•, esta preparada a partir da solução aquosa de ABTS• 7mM e persulfato de potássio (140mM), tal como proposto por Rufino *et al.* Essa solução mista foi armazenada no escuro por 16 horas, a solução radical cátion foi diluído em metanol até o valor de absorbância inicial de $0.70\text{nm} \pm 0.05\text{nm}$ em 734nm, seguido de repouso por 6 minutos no escuro. Os resultados foram expressos em TEAC como $\mu\text{Mol Trolox/g}$.

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), de acidez titulável total (ATT) e do ratio

Os valores para os SST encontrados nas frutas cítricas mostraram que a Mombuca de Cordeirópolis ($9,2 \pm 0,02$) não diferiu significativamente da laranja controle ($9 \pm 0,02$), obtendo essas duas variedades o menor valor, enquanto que as demais contiveram significativamente ($p \leq 0,05$) os maiores valores na colheita do ano de 2008 (Tabela 1). Já na colheita do ano de 2009, apenas o 2º e 3º lotes da Mombuca de Mogi Mirim, apresentaram diferença estatisticamente ($p \leq 0,05$) maior que no ano de 2008 para os mesmos lotes.

Segundo Navarro et al. (2010), a variação dos valores de SST pode ser devido à umidade do local de plantio, ou seja, a hidratação da fruta; a maturação da fruta e outros fatores.

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).

Os teores de Sólidos solúveis totais, acidez total titulável e o ratio, das frutas estudadas, estão apresentados na Tabela 1.

Das quatro laranjas de polpa vermelha estudadas, a variedade Baía Cara Cara (CN486) apresentou no 2º lote valores maiores do teor de acidez (Tabela 1) nos dois anos, diferindo significativamente ($p \leq 0,05$) das mombucas de Cordeirópolis (CV93) e

de São Bento de Sapucaí (MSBS) no mesmo lote no ano de 2008. Enquanto que no ano de 2009, as variedades Baía Cara Cara (CN486) e Mombuca de Mogi Mirim (MMM), diferiram significativamente das Mombucas cultivadas em Cordeirópolis (CV93) e São Bento do Sapucaí (MSBS), sendo que no 2º lote de 2009 foram as variedades CV93 e a Baía Cara Cara (CN486) que apresentaram diferença significativa ($p \leq 0,05$).

Para o *ratio*, um parâmetro muito utilizado pelas indústrias de sucos, a variedade Mombuca cultivada em Cordeirópolis apresentou o maior valor no 3º lote do ano de 2008 devido ao seu teor de acidez. Foi observado também que, como as variedades foram colhidas no início, meio e fim de safra, os maiores valores do *ratio* observados foram no início e fim da safra para quase todas as laranjas.

Ácido ascórbico, fenólicos totais, flavonóides totais e carotenóides totais

O teor de ácido ascórbico encontrado nas variedades não diferiu estatisticamente no 1º lote de 2008, apresentando diferença significativa no 2º lote em relação ao 1º assim como, no 3º lote. No ano de 2009, apenas a variedade Mombuca de Cordeirópolis (CV93) não diferiu estatisticamente do controle, mas apresentou diferença significativa das demais ($p \leq 0,05$) (Tabela 2). E no 3º lote do ano de 2009, a única laranja estudada com diferença significativa foi a Mombuca de São Bento do Sapucaí (MSBS). Por outro lado, o conteúdo dos fenólicos totais diferiu estatisticamente entre todas as variedades estudadas nos anos de 2008 e 2009. A Mombuca de São Bento do Sapucaí (MSBS) foi a única variedade de 2008 que não apresentou diferença significativa do controle, sendo que em 2009 essa diferença foi observada nos três lotes.

Para os flavonóides totais expressos em equivalente Rutina, não foi verificado diferença significativa no 3º lote de 2008, sendo que no ano de 2009 apenas a Mombuca de Cordeirópolis (CV93) foi estatisticamente diferente no 3º lote.

Analisando os dados obtidos dos principais constituintes bioativos presentes nas quatro variedades de polpa vermelha e controle, pode-se concluir que não existe uma única fruta que contenha um alto teor de todos os compostos de interesse. Por exemplo, a variedade Baía Cara Cara (CN486) apresentou o menor teor de Ácido Ascórbico no ano de 2008, enquanto que a variedade Mombuca de Cordeirópolis (CV93) apresentou o menor valor do composto no ano de 2009 e um dos maiores valores de carotenóides totais juntamente com a Mombuca de São Bento do Sapucaí (MSBS) nos dois anos estudados (Tabela 2).

Os resultados de carotenóides totais apontam que as laranjas de polpa vermelha apresentam maiores teores em relação ao controle, isto justifica-se pelo fato de apresentarem o carotenóide licopeno em seu suco. Observa-se claramente que há uma queda nos teores deste constituinte no meio da safra, ou seja, no 2º lote tanto do ano de 2008 como no de 2009 e que a variedade mombuca de Cordeirópolis (CV93) apresentou os melhores resultados.

Tabela 1. Teores de compostos bioativos dos três lotes das variedades Mombuca de São Bento do Sapucaí, de Mogi Mirim e de Cordeirópolis e Baía Cara nos anos de 2008 e 2009.

		Sólidos solúveis totais (% à 20°C)		Acidez total titulável (mg/100ml)		Ratio (SST/ATT)	
		2008	2009	2008	2009	2008	2009
Pera Río	1° lote	9±0,01a	9±0,01a	1,49±0,02aA	0,97±0,00cA	6,03	9,32
	2° lote	9±0,02a	9,8±0,00a	1,20±0,01cA	1,38±0,00aA	7,49	7,27
	3° lote	10,2±0,01b	10,8±0,01b	1,28±0,01aB	1,13±0,00bA	7,97	9,53
BAÍA CARA CARA (CN486)	1° lote	11,9±0,01b	10,8±0,02b	0,60±0,01cD	0,97±0,01bA	19,74	11,11
	2° lote	10,8±0,01b	10,4±0,01b	1,04±0,02aB	1,04±0,01aB	10,37	9,99
	3° lote	12,4±0,00c	13,4±0,01c	0,88±0,00bB	0,85±0,00cB	14,09	15,69
MOMBUCA (Mogi Mirim)	1° lote	11±0,01b	11,8±0,00b	0,72±0,01bC	0,85±0,00bB	15,39	13,82
	2° lote	11,5±0,02b	12,4±0,00c	0,82±0,01aC	0,86±0,01bC	13,96	14,48
	3° lote	11,2±0,01b	13,4±0,01c	0,69±0,01cC	0,74±0,01aC	16,32	18,04
MOMBUCA (Cordeirópolis)	1° lote	9,1±0,00a	6,6±0,01a	0,75±0,01aC	0,62±0,00aD	12,19	10,66
	2° lote	9,2±0,02a	8,4±0,01a	0,68±0,03bD	0,61±0,01aD	13,62	13,89
	3° lote	10±0,01a	9±0,00a	0,48±0,01cE	0,50±0,00bE	21,07	17,90
MOMBUCA (S.B. Sapucaí)	1° lote	10,1±0,01b	11±0,01b	0,79±0,01aB	0,77±0,01aC	12,8	14,21
	2° lote	10,3±0,01b	11,2±0,01b	0,64±0,01bD	0,64±0,00bD	15,99	17,62
	3° lote	11,6±0,01b	11,4±0,00b	0,58±0,00cD	0,57±0,00cD	19,83	19,94

Médias com letras minúsculas na mesma linha em cada ano, não diferem estatisticamente entre os lotes ($p \leq 0,05$) entre si pelo teste de Tukey.

Médias com letras maiúsculas na mesma coluna em cada ano, não diferem estatisticamente entre as variedades e lotes ($p \leq 0,05$) entre si pelo teste de Tukey.

Tabela 2. Conteúdo de Ácido Ascórbico, fenólicos totais, flavonóides totais e carotenóides totais para as variedades de frutas de polpa vermelha nos anos de 2008 e 2009.

		AA (mg/100mL)		Fenólicos Totais (GAE, g/100mL)		Flavonóides Totais (Rutina mg/100mL)		Carotenóides Totais (β- caroteno μg/mL)	
		2008	2009	2008	2009	2008	2009	2008	2009
Pera Río	1° lote	101,21±1,10aA	78,45±2,64abAB	1,42±0,00a	1,49±0,00a	15,62±0,5c	14,52±0,03c	2,29±0,30aC	2,23±0,20bB
	2° lote	95,69±1,82bA	72,10±2,64bAB	1,21±0,01c	1,42±0,00c	19,24±0,01b	19,02±0,02b	3,93±0,66aC	3,19±0,32aC
	3° lote	72,56±0,00cA	79,60±6,24aA	1,31±0,02b	1,47±0,00b	21,78±0,27a	21,53±0,04a	2,24±1,72aD	2,50±0,39bC
BAÍa CARA CARA (CN486)	1° lote	82,87±1,10aD	74,98±9,99aB	1,56±0,00b	1,83±0,00b	19,38±0,02c	9,82±0,02c	5,43±1,50bB	9,53±1,25aA
	2° lote	63,73±1,09bD	73,83±5,00aA	1,46±0,00c	1,71±0,01c	21,41±0,01b	19,55±0,29b	10,35±1,62aAB	10,39±0,51aAB
	3° lote	39,96±0,91cD	72,68±1,73aAB	1,69±0,01a	1,86±0,00a	23,21±0,01a	22,63±0,01a	8,86±1,04abC	8,67±0,96B
MOMBUCA (Mogi Mirim)	1° lote	86,67±1,10aCD	78,45±4,35aAB	1,38±0,01b	1,69±0,00c	15,96±0,02c	14,76±0,37b	7,20±0,75aB	9,53±0,85aA
	2° lote	70,04±1,89bC	69,80±3,60aAB	1,21±0,00c	1,87±0,00b	18,91±0,01b	14,09±0,08b	10,02±0,10aAB	10,33±0,34aB
	3° lote	48,37±0,91cC	76,72±4,35aA	1,77±0,01a	2,04±0,00a	40,83±0,00a	36,81±1,00a	10,34±1,92aBC	9,14±0,19aB
MOMBUCA (Cordeirópolis)	1° lote	89,83±2,19aBC	64,60±4,00bB	1,34±0,00b	1,26±0,00c	16,21±0,02c	10,41±0,03c	12,10±0,75bA	11,22±0,47aA
	2° lote	79,92±1,82bB	61,14±4,35bB	1,01±0,00c	1,39±0,00b	22,07±0,04b	17,52±0,04a	8,21±2,79bB	9,78±0,22cB
	3° lote	72,03±0,91cA	76,71±1,00aA	1,43±0,01a	1,46±0,00a	28,44±0,07a	17,21±0,01b	20,42±1,11aA	13,48±0,64aA
MOMBUCA (S.B. Sapucaí)	1° lote	92,36±2,19aB	94,02±2,64aA	1,67±0,01a	1,75±0,00c	14,76±0,00b	10,37±0,04c	11,80±1,15bA	11,18±1,53aA
	2° lote	80,76±2,19bB	76,71±2,00bA	1,37±0,00c	1,77±0,00b	13,27±0,01c	13,57±0,05b	14,19±0,08aA	11,68±0,59aA
	3° lote	58,89±0,91cB	64,02±1,73cB	1,57±0,00b	1,99±0,00a	19,19±0,18a	19,24±0,02a	10,88±0,31bBC	9,93±0,89aB

Médias com letras minúsculas na mesma linha em cada ano, não diferem estatisticamente entre os lotes ($p \leq 0,05$) entre si pelo teste de Tukey.

Médias com letras maiúsculas na mesma coluna em cada ano, não diferem estatisticamente entre as variedades e lotes ($p \leq 0,05$) entre si pelo teste de Tukey.

Atividade Antioxidante por DPPH• e ABTS•

As frutas e os vegetais, de um modo geral, apresentam em sua constituição vários compostos com ação antioxidante, como o ácido ascórbico, os carotenóides e os polifenóis, importantes componentes na redução do risco de doenças degenerativas (NAVARRO et al., 2010). A quantidade e o perfil desses 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).

Os valores da atividade antioxidante realizadas por dois métodos diferentes DPPH• e ABTS• para as variedades de frutas cítricas em estudo, estão representados nas Figuras 1 e 2.

A Figura 1 representa a capacidade antioxidante pelos métodos DPPH• e ABTS• para a média dos 3 lotes dos anos de 2008 e 2009 nas variedades de laranja de polpa vermelha e controle. Os valores expressos como média $\pm$ SD demonstraram que para ambos os métodos houveram algumas diferenças para as variedades em relação ao métodos.

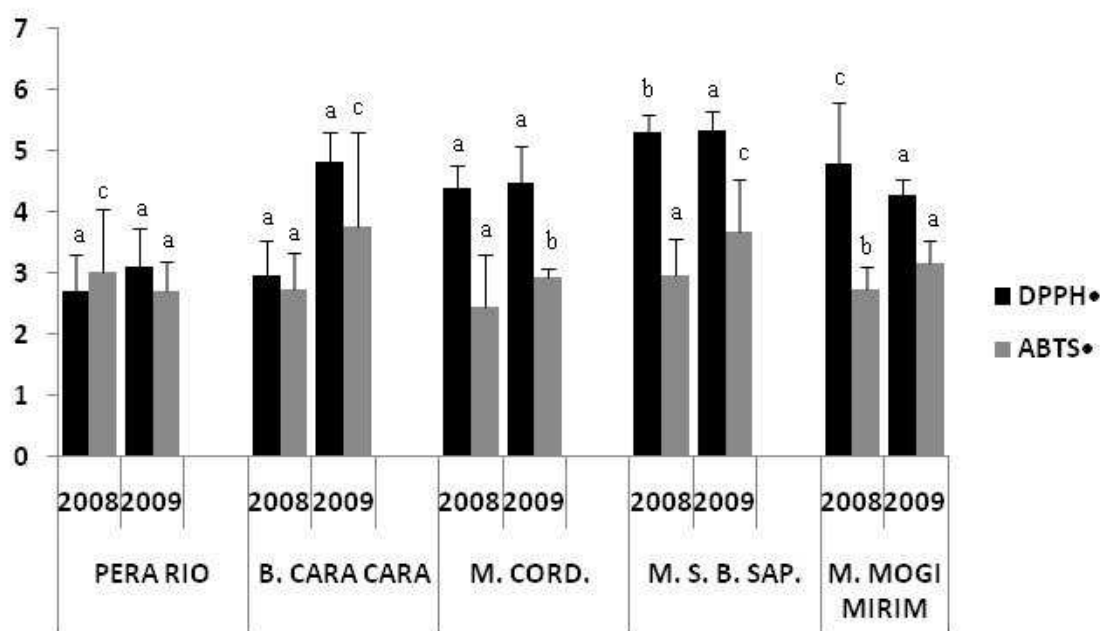


Figura 1. Valores da atividade antioxidante expressa em $\mu\text{Mol Trolox/g}$ do suco das frutas. Os valores representam médias $\pm$ SD dos 3 lotes dos anos de 2008 e 2009. Colunas com diferentes letras são significativamente diferentes no teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Se observarmos o perfil da figura, nota-se que para todas as variedades vermelhas, o melhor método para demonstrar a capacidade antioxidante nos dois anos estudados foi o DPPH•. Diferença notada no controle onde, no ano de 2008, o método ABTS• mostrou-se melhor para avaliar a capacidade antioxidante.

No trabalho de Kuskoski et al. (2005), os autores verificaram que o método ABTS• é um método de elevada sensibilidade, mostrando assim ser melhor que o método DPPH•. Uma das explicações dada foi que no método DPPH• o tempo de medida de 30 minutos foi insuficiente comparado com os resultados do DPPH• lido depois de 60 minutos, sendo desvantagem à sua aplicação e tornando-o mais demorado e de mais alto custo em relação ao ABTS•.

Podemos concluir que, dados obtidos confirmam claramente que um único método antioxidante pode refletir o potencial antioxidante de cada matriz alimentar, isto porque os compostos antioxidantes podem agir diferentemente para diversos testes.

CONCLUSÃO

Deste presente estudo, pode-se concluir que cada fruta cítrica cultivada em locais diferentes e colhida em épocas distintas, possui seus constituintes específicos e, sendo assim, não existe uma fruta que apresente todos ou a maior quantidade de compostos bioativos.

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

São necessárias mais pesquisas relacionadas a essas frutas de polpa vermelha para que se possam comparar com outros estudos os resultados obtidos nesse trabalho.

REFERÊNCIAS

- ABECITRUS – Associação Brasileira dos Exportadores de Cítricos. Disponível em http://www.abecitrus.com.br/industria_br.html, acessado em agosto de 2008.
- BERNARDI, J.; LICCIARDELLO, C.; RUSSO, M. P.; CHIUSANO, M. L.; CARLETTI, G.; RECUPERO, G. R.; MAROCCO, A. Use of a custom array to study differentially expressed genes during blood Orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck) ripening. **J Plant Physiol**, v.167, p. 301-310, 2010.
- BITTERS, W.P. Physical characters and chemical composition as affected by scions and rootstocks. In: SINCLAIR, W.B. (Ed.) **The orange: Its Biochemistry and Physiology**, The University of California, Riverside, p. 56-95, 1961.
- 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.
- GAMA, J. J. T; SYLOS, C.M. Major carotenoid composition of Brazilian Valencia orange juice: Identification and quantification by HPLC. **Food Res Intern** v.38, p. 899–903, 2005.
- KELEBEK, H.; CANBAS, A.; SELLI, S. Determination of phenolic composition and antioxidant capacity of blood orange obtained from cvs. Moro and Sanguinello (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) grown in Turkey. **Food Chem**, v.107, p. 1710-1716, 2008.
- MONDELLO, L.; COTRONEO, A.; ERRENTE, G.; DUGO, G.; DUPO, G. Determination of anthocyanins in blood Orange juice by HPLC analysis. **J Pharmac Biom Anal**, v.23, p.191-195, 2000.
- NEVES, M. F.; LOPES, F. Estratégias para a laranja no Brasil. São Paulo, SP, Editora Atlas, 2005. 225p.
- RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E.S.; MORAIS, S. M.; SAMPAIO, C. G.; PÉREZ-JINÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. D. Metodologia científica: Determinação

da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre ABTS•. **Comunicado Técnico Online**.ISSN 1679-6535, 2007.

SÁNCHEZ-MORENO, C.; LARRAURI, J. A., e 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.; BEGOÑA DE ANCOS, L. P.; CANO, M. P. Effect of high-pressure processing on health-promoting attributes of freshly squeezed orange juice (*Citrus sinensis L*) during chilled storage. **Eur. Food Res. Technol.**, v.216, p.18-22, 2003.

SERAFINI M.; BELLOCO R.; WOLK, A.; EKSTROM A. M. Total antioxidant potential of fruit and vegetables and risk of gastric cancer. **Gastroenterol** 102: 985-991, 2002.

XU, J.; TAO, N.; LIU, Q; DENG, X. Presence de diverse ratios of Lycopene/B-carotene in five pink and red-fleshed citrus variedades. **Scientia Horticult**, v.108, p.181-184, 2006.

CAPÍTULO 5

CAROTENÓIDES E FLAVANONAS E PARÂMETROS DE COR EM LARANJAS DE POLPA VERMELHA

RESUMO

Como a citricultura brasileira detém a liderança mundial, há um grande interesse no desenvolvimento de variedades cítricas de melhor qualidade ou que despertam o interesse dos consumidores. Diante disso, as laranjas de polpa vermelhas oferecem atenção especial tanto nutricional como atrativas. Foram avaliados o conteúdo dos carotenóides e de flavanonas e os parâmetros de cor em duas variedades de laranjas de polpa vermelha (Mombuca e Baía Cara Cara) e em relação a laranja de polpa clara, no caso a variedade Pêra Río. As amostras foram cultivadas em três locais diferentes do Estado de São Paulo. Os parâmetros de cor b^* e Chroma nas frutas aqui estudadas apresentaram valores diretamente proporcionais. Apenas as flavanonas narirutina e hesperidina estiveram presentes em todas as variedades estudadas. O carotenóide licopeno foi encontrado apenas nas variedades de polpa vermelha. Aplicando a Análise de Componentes Principais (ACP), verifica-se que o primeiro componente principal explicou 52,77% e o segundo componente principal, 21,77% da variação observada. Juntos, os dois primeiros componentes explicaram 74,54% das variações.

Palavras-chave: CIELab, laranja de polpa vermelha, carotenóides, flavonóides, Análise de Componentes Principais.

Introdução

A citricultura é um dos setores mais competitivos e de maior potencial de crescimento do agronegócio (NEVES e JANK, 2006). Com grande parte de sua produção voltada ao mercado externo, a cadeia citrícola traz anualmente mais de US\$ 1,0-1,5 bilhão em divisas para o Brasil, sendo um dos principais produtos na pauta das exportações (FNP, 2007). O estado de São Paulo é o maior produtor brasileiro de laranjas com 80% da sua produção, seguido da Bahia (4%), Sergipe (4%) e Minas Gerais (3%) (NEVES e LOPES, 2005).

De acordo com Neves e Lopes (2005) um dos principais problemas da cadeia comercial da laranja brasileira é a queda do consumo no mercado interno de frutos e suco *in natura*. Diante disso, os mesmos autores propuseram várias ações consideradas importantes para o aumento do consumo desses produtos como uso de propaganda intensa e desenvolvimento de produtos e processos para a produção de novas variedades cítricas de mesa ou para produção de suco.

Diante do exposto, novas variedades de laranja doce para o consumo como fruta de mesa e/ou para produção de suco tem despertado o interesse de vários pesquisadores. Além dos grupos das laranjas claras e as sanguíneas descritas por BITTERS (1961), outro grupo de laranjas com coloração vermelha em sua polpa é devido à presença de teores de carotenóides (β -caroteno e licopeno) (XU et al.,2006).

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 ácido ascórbico, carotenóides e compostos fenólicos.

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 um atributo decisivo na 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).

O sistema CIELab (*Comission Internationale de l'Eclairage, International Comission on Illumination* –Lightness, redness-greenness, and yellowness-blueness) fundado em 1976, 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 Chroma (C^*) e o ângulo Hue (OLIVEIRA et al., 2003).

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

Com o aparecimento de novas tecnologias para melhoria no uso de mudas com qualidade e novos materiais genéticos na citricultura como as variedades de polpa vermelha cultivadas no Brasil, estudos das laranjas de polpa vermelha são importantíssimos. O objetivo deste trabalho é avaliar a importância dos compostos bioativos, bem como, as variações dos teores em diferentes épocas.

Por serem frutas pouco conhecidas, são escassos os estudos brasileiros destas frutas de polpa vermelha. O objetivo deste trabalho é realizar uma avaliação dos teores de alguns constituintes químicos que apresentam funcionalidade como carotenóides, flavanonas, assim como os parâmetros de cor em duas variedades de laranja de polpa vermelha: Baia Cara Cara, cultivada em Cordeirópolis/SP e Mombuca, cultivadas em

três regiões diferentes do Estado de São Paulo (Cordeirópolis, Mogi Mirim e São Bento do Sapucaí); e comparar com a variedade Pera, que é uma variedade de laranja de polpa clara.

Material e Métodos

Amostras

As frutas foram fornecidas pelo Instituto Agronômico de Campinas (IAC), sendo escolhidas aleatoriamente, independentemente do seu grau de maturação, onde cada lote continha aproximadamente 15 frutos. As amostras foram coletadas em três épocas diferentes correspondendo ao início, meio e final da safra, e em dois anos consecutivos, 2008 e 2009.

A variedade Baía Cara Cara (polpa vermelha) era proveniente da cidade de Cordeirópolis enquanto que a variedade Mombuca (polpa vermelha) vinha de três cidades paulistas diferentes: São Bento do Sapucaí, Cordeirópolis e Mogi Mirim. A variedade de polpa clara Pêra Rio era proveniente da cidade de Cordeirópolis foi utilizada como controle para comparação. O suco das frutas foi obtido a partir de um extrator manual de suco e as análises realizadas em triplicata.

Métodos

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 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 $(a^*/b^*)^2$. Os ângulos hue e Chroma foram calculados segundo as equações (ARIAS et al., 2000):

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

$$\text{hue} = 180 + \tan^{-1} (b^*/a^*), \text{ quando } a^* < 0 \text{ (Equação 2)}$$

Extração dos carotenóides

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 450nm. 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, 1999).

Determinação do teor dos carotenóides por CLAE

Os pigmentos carotenóides foram analisados por RP-HPLC usando gradiente ternário de eluição e uma coluna Symmetry C₁₈ (4.6 x 150 mm I.D., 3.5 μ m) da Waters. O sistema cromatográfico era equipado com detector por arranjo de fotodiodos (DAD) e a fase móvel consistia de acetonitrila: metanol: acetato de etila contendo 0.05% de trietilamina com vazão de 0.6 mL/min. Um gradiente foi aplicado a partir de 99:1:0 para 64:1:35 em 30 minutos e 99:1:0 em 60 min. O volume de injeção foi de 20 μ L. Detecção realizada de 350 a 550 nm. As amostras e as soluções foram filtradas em membrana de 0.22 μ m antes da injeção.

Os carotenóides isolados individualmente em amostras foram identificados por comparação de seu tempo de retenção no HPLC e pelas características dos espectros do arranjo de diodos com padrões e também valores na literatura.

Deteminação 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-maria à 50°C sob fluxo de nitrogênio, sendo levados a um volume final de 10mL 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.

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.

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. Os dados dos constituintes químicos e atividade anti-

radical em frutas foram avaliados pela análise de Componentes Principais do programa computacional SAS (Statistical Analysis System)/STAT.

Resultados e Discussão

O índice de maturidade *ratio* do suco das frutas foi expresso em média dos 3 lotes de 2008 e os de 2009, respectivamente: Mombuca de São Bento do Sapucaí (MSBS) = 16,29 e 17,26; Mombuca de Mogi Mirim (MMM) = 15,25 e 15,47; Mombuca de Cordeirópolis (MC) = 15,65 e 14,22; Baía Cara Cara (BCC) = 14,77 e 12,30 e a Pêra Río (PR) = 7,17 e 8,7.

Nas tabelas 1 e 2 estão representados os valores dos parâmetros de cor do sistema CIELab. As variedades Pêra Río, Mombuca (três locais de cultivo) e Baía Cara Cara apresentaram parâmetros significativamente diferentes. Ao observarmos entre lotes, notamos que a variedade Pêra Río controle, apresentava o valor de a^* maior no início da safra, indicando maior saturação do amarelo nesta variedade, ou seja, maior quantidade de carotenóides amarelos. Os valores referentes ao parâmetro b^* foram positivos para todas as variedades, no entanto os valores das variedades Pêra Río, Mombuca de Mogi Mirim e Mombuca de São Bento do Sapucaí, se destacaram o que indica a presença mais amarelada destes sucos, devido à maior concentração de carotenóides neste suco (Tabelas 3 e 4). Como, provavelmente, a polpa destas variedades não apresentam o pigmento antocianina, os sucos obtidos com os frutos das laranja de polpa vermelha não apresentam coloração tão intensa como os das laranjas sanguíneas. Esta coloração é devida a presença de elevados teores dos carotenóides: beta-caroteno e licopeno na polpa, em comparação com as laranjas claras (XU et al., 2006).

O parâmetro h mostra a localização da cor em um diagrama, onde o ângulo 0° representa vermelho puro; 90° , o amarelo puro; 180° , o verde puro e o 270° , o azul puro. Todas as variedades apresentaram ângulo próximo a 80° (tonalidade amarelada). 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 (OLIVEIRA, 2002). Também podemos observar que com os resultados da cor do suco das frutas obtidos neste estudo, 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 C e h foram inversamente proporcionais.

A Mombuca de Cordeirópolis apresentou tanto no ano de 2008 como de 2009 menor luminosidade (L^*) que as demais laranjas, indicando que esta fruta tem o suco um pouco mais escuro.

Tabela 1: Valores dos parâmetros de cor (CIELAB) para as laranjas vermelhas e Pera Rio, colhidas no ano de 2008.

2008										
	1° lote			2° lote			3° lote			
	L*	a*	b*	L*	a*	b*	L*	a*	b*	
Pera Rio	48,13±0,01a	-2,47±0,02e	27,08±0,02a	40,76±0,0e	-2,23±0,0d	16,36±0,0e	47,24±0,0b	-0,42±0,0e	26,61±0,01c	
Baia C. Cara	43,31±0,02e	5,91±0,01a	18,10±0,03e	45,32±0,01b	3,63±0,0c	18,89±0,01d	46,47±0,0c	4,02±0,01d	20,86±0,02e	
M. M. Mirim	46,38±0,01b	4,25±0,02b	24,47±0,02b	44,61±0,01c	4,31±0,02b	24,05±0,01b	47,65±0,01a	7,28±0,0a	28,30±0,03b	
M. Cord.	44,14±0,03d	0,43±0,01d	19,74±0,01d	42,41±0,03d	3,72±0,03c	20,55±0,03c	44,76±0,02e	5,43±0,0c	22,96±0,02d	
M. S.B.Sap.	45,42±0,03c	3,23±0,01c	24,22±0,01c	45,69±0,02a	5,47±0,01a	26,49±0,04a	46,12±0,01d	6,44±0,01b	28,97±0,04a	
	Chroma		Hue	Chroma		Hue	Chroma		Hue	
Pera Rio	27,20±0,04a		-84,78±0,03e	16,51±0,0e		-82,25±0,0d	26,62±0,03c		-89,10±0,02a	
Baia C. Cara	19,04±0,02e		71,91±0,02d	19,24±0,01d		79,13±0,02b	21,25±0,02e		79,09±0,02b	
M. M. Mirim	24,84±0,02b		80,16±0,01c	24,43±0,01b		79,85±0,02a	29,22±0,03b		75,58±0,03e	
M. Cord.	19,75±0,01d		88,75±0,0a	20,88±0,02c		79,73±0,01a	23,59±0,01d		76,69±0,04d	
M. S.B.Sap.	24,43±0,01c		82,41±0,0b	27,05±0,02a		78,34±0,01c	29,68±0,01a		77,47±0,03c	

Os valores representam média±DP. Médias com letras iguais não diferem significativamente ($p \leq 0,05$) entre si pelo teste de Tukey.

Tabela 2: Valores dos parâmetros de cor (CIELAB) para as laranjas vermelhas e Pera Rio, colhidas em três épocas diferentes no ano de 2009.

2009									
	1° lote			2° lote			3° lote		
	L*	a*	b*	L*	a*	b*	L*	a*	b*
Pera Rio	45,76±0,01b	-1,83±0,03d	20,40±0,02c	38,86±0,01c	-0,67±0,02d	28,02±0,01b	38,68±0,02d	0,72±0,01e	34,63±0,02a
Baia C. Cara	41,14±0,02c	2,08±0,03c	20,47±0,02c	41,65±0,04b	4,11±0,04c	27,49±0,0b	40,94±0,01b	5,15±0,02d	26,55±0,02d
M. M. Mirim	45,29±0,01b	4,11±0,01ab	30,70±0,02a	44,90±0,01a	5,74±0,02b	34,39±0,03a	40,80±0,04c	7,25±0,02b	33,39±0,04b
M. Cord.	40,74±0,02c	4,38±0,01a	24,66±0,03b	38,43±0,01c	4,26±0,01c	24,56±0,01c	37,56±0,02e	6,65±0,04c	30,04±0,04c
M. S.B.Sap.	48,21±0,01a	3,84±0,01b	26,08±0,03b	44,60±0,02a	6,22±0,04a	33,33±0,02a	43,50±0,02a	7,80±0,04a	33,36±0,03b
	Chroma		Hue	Chroma		Hue	Chroma		Hue
Pera Rio	20,48±0,02c		-84,88±0,04e	28,02±0,02b		-88,64±0,02d	34,63±0,03a		88,80±0,05a
Baia C. Cara	20,57±0,02c		84,21±0,01a	27,80±0,02b		81,50±0,01a	27,04±0,04c		79,01±0,02b
M. M. Mirim	30,97±0,01a		82,37±0,02b	34,86±0,01a		80,52±0,03b	34,17±0,02a		77,75±0,02c
M. Cord.	25,05±0,01b		79,94±0,02d	24,92±0,01c		80,16±0,03b	30,76±0,02b		77,52±0,01d
M. S.B.Sap.	26,36±0,01b		81,63±0,03c	33,91±0,01a		79,44±0,03c	34,26±0,03a		76,84±0,03e

Os valores representam média±DP. Médias com letras iguais não diferem significativamente ($p \leq 0,05$) entre si pelo teste de Tukey.
Nd: não detectado

Conteúdo de Carotenóides por CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência)

As variedades vermelhas apresentaram o carotenóide β -caroteno bem acima do controle Pêra Rio, assim como o carotenóide licopeno, que por sua vez, não estava presente no controle.

Para os carotenóides β -caroteno, β -criptoxantina, α -criptoxantina, luteína, violaxantina, a variedade Mombuca de Mogi Mirim nos anos de 2008 e 2009, (73,86 e 68,33 $\mu\text{g/L}$; 74,88 e 69,57 $\mu\text{g/L}$; 12,80 e 14,46 $\mu\text{g/L}$; 106,07 e 104,73 $\mu\text{g/L}$; 56,87 e 52,07 $\mu\text{g/L}$, respectivamente) demonstrou ser a fruta que apresentava os maiores teores em sua polpa relacionada às demais frutas estudadas (Tabelas 3 e 4).

Ao tentar correlacionar o teor do carotenóide com valores do parâmetro a^* das frutas estudadas, percebe-se que o teor de β -caroteno do controle Pêra Rio é menor indicando o valor do parâmetro a^* negativo, ou seja, apresentando suco um pouco mais claro em relação às variedades vermelhas.

Sánchez-Moreno et al., (2003) em seus estudos com sucos comerciais de laranjas, não encontraram uma correlação significativa entre a concentração total de carotenóide 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.

A variedade Mombuca cultivada em São Bento do Sapucaí apresentou média do carotenóide licopeno maior que as demais frutas estudadas tanto no ano de 2008 como no de 2009 (87,15 e 77,5 $\mu\text{g/L}$, respectivamente). A ação do licopeno na saúde humana tem recebido grande destaque nos últimos anos, sendo a evidência científica mais forte em relação ao câncer do pulmão, esôfago e próstata. A ênfase tem sido a sua ação contra câncer da próstata (HADLEY et al., 2002; WERTZ et al., 2004; STACEWICZ-SAPUNTZAKIS e BOWEN, 2005).

Tabela 3: Conteúdo dos principais carotenóides ($\mu\text{g/L}$) encontrados nas variedades de laranjas estudadas, colhidas no ano de 2008.

		β -caroteno	licopeno	β -criptoxantina	α -criptoxantina	Zeaxantina	lutena	Violaxantina
	Lotes-2008							
Laranja Pêra	1°	3,78 $\pm$ 2,2c	nd	50,67 $\pm$ 2,6a	10,49 $\pm$ 2,8b	41,84 $\pm$ 3,1c	53,77 $\pm$ 3,6b	44,46 $\pm$ 3,2b
	2°	7,51 $\pm$ 3,1a	nd	60,84 $\pm$ 2,5a	13,67 $\pm$ 2,2ab	60,10 $\pm$ 2,8b	51,35 $\pm$ 3,3b	56,34 $\pm$ 3,3b
	3°	5,67 $\pm$ 2,8b	nd	66,73 $\pm$ 2,8a	15,28 $\pm$ 1,8 ^a	88,37 $\pm$ 3,2a	80,34 $\pm$ 3,9a	74,48 $\pm$ 3,9a
Mombuca (Cordeirópolis)	1°	44,32 $\pm$ 2,5b	82,72 $\pm$ 2,6a	31,6 $\pm$ 1,9c	12,15 $\pm$ 4,2b	35,38 $\pm$ 2,9b	72,71 $\pm$ 2,5a	29,36 $\pm$ 2,9c
	2°	52,29 $\pm$ 1,9b	50,83 $\pm$ 2,3c	45,59 $\pm$ 2,8b	10,84 $\pm$ 5,1b	32,21 $\pm$ 2,5b	63,63 $\pm$ 2,1ab	49,96 $\pm$ 2,5a
	3°	81,28 $\pm$ 2,8a	69,67 $\pm$ 2,1b	58,95 $\pm$ 2,5a	22,29 $\pm$ 3,9 ^a	53,80 $\pm$ 4,2a	46,59 $\pm$ 2,2b	43,49 $\pm$ 2,2b
Mombuca (S. B. Sapucaí)	1°	40,83 $\pm$ 3,6c	84,79 $\pm$ 1,9a	44,78 $\pm$ 2,5c	9,48 $\pm$ 4,2b	25,60 $\pm$ 4,9c	57,84 $\pm$ 1,9b	14,86 $\pm$ 3,1c
	2°	53,06 $\pm$ 3,8b	92,82 $\pm$ 2,5a	57,52 $\pm$ 2,6b	11,17 $\pm$ 4,8b	43,58 $\pm$ 5,2b	78,87 $\pm$ 3,2a	24,69 $\pm$ 3,3b
	3°	95,13 $\pm$ 2,9a	83,83 $\pm$ 3,8a	80,83 $\pm$ 2,4a	21,01 $\pm$ 3,4 ^a	73,00 $\pm$ 3,9a	87,57 $\pm$ 3,1a	70,60 $\pm$ 2,7a
Mombuca (Mogi Mirim)	1°	73,86 $\pm$ 1,5b	47,67 $\pm$ 3,7c	74,88 $\pm$ 1,8a	12,80 $\pm$ 3,1b	41,44 $\pm$ 3,3c	106,07 $\pm$ 2,7a	56,87 $\pm$ 3,1a
	2°	75,89 $\pm$ 1,9b	69,04 $\pm$ 2,9b	70,19 $\pm$ 1,5a	15,90 $\pm$ 3,2ab	54,80 $\pm$ 2,9b	103,35 $\pm$ 2,4a	59,18 $\pm$ 3,7a
	3°	87,08 $\pm$ 2,4a	89,78 $\pm$ 2,7a	68,43 $\pm$ 1,9a	16,79 $\pm$ 2,6 ^a	72,33 $\pm$ 2,2a	112,77 $\pm$ 2,2a	65,05 $\pm$ 2,2a
Baía Cara Cara	1°	28,55 $\pm$ 2,5b	67,03 $\pm$ 1,8ab	65,25 $\pm$ 3,3b	8,48 $\pm$ 2,8a	11,18 $\pm$ 3,1b	12,75 $\pm$ 4,1c	8,47 $\pm$ 2,9b
	2°	29,77 $\pm$ 2,8b	69,94 $\pm$ 1,9a	72,51 $\pm$ 3,2a	8,66 $\pm$ 2,5a	14,35 $\pm$ 2,8b	22,04 $\pm$ 3,9b	10,00 $\pm$ 1,8b
	3°	37,91 $\pm$ 1,5a	60,43 $\pm$ 1,9b	69,36 $\pm$ 2,8ab	11,70 $\pm$ 2,2 ^a	23,10 $\pm$ 2,2a	41,45 $\pm$ 3,8a	22,97 $\pm$ 4,1a

Os valores representam média $\pm$ DP. Médias com letras iguais não diferem significativamente ($p \leq 0,05$) entre si pelo teste de Tukey.
nd: não detectado

Tabela 4: Conteúdo dos principais carotenóides (µg/L) encontrados nas variedades de laranjas estudadas, colhidas no ano de 2009.

		β-caroteno	licopeno	β-criptoxantina	α-criptoxantina	Zeaxantina	lutena	Violaxantina
	Lotes- 2009							
Laranja Pêra (controle)	1°	3,47±2,7c	nd	44,56±3,1a	9,88±4,1c	40,37±3,3c	49,78±2,8b	43,15±3,1c
	2°	6,95±3,1a	nd	57,32±3,4a	12,79±5,2b	62,05±3,7b	54,28±2,5b	57,70±3,2b
	3°	5,42±2,9b	nd	62,08±2,7a	15,23±3,9 ^a	85,45±3,1a	81,68±3,1a	70,33±3,3a
Mombuca (Cordeirópolis)	1°	40,68±3,1b	79,76±2,6a	32,28±2,7b	10,41±3,5b	35,38±2,9a	69,74±3,3a	27,94±1,9b
	2°	46,73±3,3b	54,14±2,9c	41,53±3,3b	11,68±2,7b	37,54±2,2a	65,53±3,2a	27,94±1,8b
	3°	86,35±3,6a	65,21±3,7b	58,64±3,1a	21,28±5,3 ^a	43,95±1,8a	60,11±3,3a	34,76±2,2b
Mombuca (S. B. Sapucaí)	1°	42,87±4,1b	77,92±3,3ab	37,87±4,1c	11,40±2,7b	23,94±1,9c	50,46±2,8b	12,08±5,1c
	2°	45,36±3,9b	79,84±3,1a	57,00±3,9b	13,42±2,4b	41,41±1,8b	80,59±1,9a	24,52±3,8b
	3°	45,36±2,8b	74,74±2,9b	76,03±3,1a	23,43±3,9 ^a	77,53±3,2a	83,57±3,0a	77,38±4,2a
Mombuca (Mogi Mirim)	1°	68,33±3,1b	44,25±2,0b	69,57±2,6b	14,46±5,1b	35,21±4,1c	104,73±3,1a	52,07±3,3b
	2°	67,14±3,3b	75,24±1,9a	67,85±2,8c	13,71±4,8b	53,28±3,7b	90,68±2,7b	52,96±2,7b
	3°	92,14±4,1a	88,09±1,8a	67,85±2,1c	18,57±2,7 ^a	75,73±3,1a	103,06±2,2a	61,45±2,2a
Baía Cara Cara	1°	25,73±5,1a	65,55±3,4a	64,52±2,2ab	6,62±2,8a	5,13±2,8c	10,27±1,7c	2,79±1,6b
	2°	25,97±4,9a	53,94±4,2b	61,46±3,1b	6,59±2,4a	11,59±2,2b	24,04±1,3b	7,86±1,9b
	3°	33,36±4,6a	36,68±3,8c	75,51±3,7a	10,68±3,1 ^a	23,17±3,1a	46,87±2,6a	29,08±2,6a

Os valores representam média±DP. Médias com letras iguais não diferem significativamente (p≤0,05) entre si pelo teste de Tukey.
nd: não detectado

Conteúdo de flavanonas glicosídicas (FGs)

Quatro diferentes tipos de flavanonas glicosídicas (eriocitrina, naringina, hesperidina e narirutina) foram analisados nas variedades de frutas cítricas (Tabelas 5 e 6). Apenas as flavanonas hesperidina e a narirutina foram encontradas nas frutas cítricas em questão, sendo essas as principais flavanonas encontradas em laranjas doces.

Tabela 5: Conteúdo de flavanonas glicosídicas (mg/L) nas variedades de frutas vermelhas e controle nos três lotes de 2008.

2008	Hesperidina			Narirutina		
	Lote 1	Lote 2	Lote 3	Lote 1	Lote 2	Lote 3
Pêra Rio (controle)	98,26eC	100,52eB	108,16dA	10,00eA	10,61cA	12,38dA
Mombuca (S. B. Sapucaí)	115,82dC	120,65dB	126,75cA	24,38bC	27,38aB	29,82bA
Mombuca (Mogi Mirim)	124,50bB	132,96bA	136,40bA	18,86cC	19,20bB	20,98cA
Mombuca (Cordeirópolis)	118,19cC	125,34cB	128,06cA	28,93aC	31,00aB	36,03aB
Baía Cara Cara	141,06aB	147,21aAB	153,85aA	25,65bB	27,89aAB	29,61bA

Médias com letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem significativamente ($p \leq 0,05$) entre si (variedade) pelo teste de Tukey e médias com letras maiúsculas iguais na mesma linha não diferem significativamente ($p \leq 0,05$) entre si (lotes) pelo teste de Tukey.

Tabela 6: Conteúdo de flavanonas glicosídicas (mg/L) nas variedades de frutas vermelhas e controle nos três lotes de 2009.

	Hesperidina			Narirutina		
	Lote 1	Lote 2	Lote 3	Lote 1	Lote 2	Lote 3
Pêra Rio (controle)	117,21dB	125,72dA	128,26eA	11,79cC	15,33cB	18,87cA
Mombuca (S. B. Sapucaí)	153,56bC	167,15aB	178,66aA	28,45aC	35,32aB	40,76aA
Mombuca (Mogi Mirim)	141,04cC	155,88cB	161,35dA	21,56bC	28,85bB	30,93bA
Mombuca (Cordeirópolis)	153,66bB	162,39bAB	169,69cA	30,49aC	35,32aB	40,42aA
Baía Cara Cara	164,86aB	169,05aB	173,89bA	24,15bA	28,78bA	32,27bA

Médias com letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem significativamente ($p \leq 0,05$) entre si (variedade) pelo teste de Tukey e médias com letras maiúsculas iguais na mesma linha não diferem significativamente ($p \leq 0,05$) entre si (lotes) pelo teste de Tukey.

O teor de hesperidina encontrado nas frutas cítricas analisadas variou de 98,26 a 178,66 mg/L. A variedade Baía Cara Cara no ano de 2008 e a Mombuca de São Bento

do Sapucaí no ano de 2009 apresentaram o maior teor deste constituinte ($p \leq 0,05$) no final da safra (3º lote) diferindo das demais variedades.

Se observarmos entre lotes nos anos de 2008 e 2009, as variedades apresentaram diferenças significativas ($p \leq 0,05$) tanto para a flavanona hesperidina como para a flavanona narirutina. A média da flavanona hesperidina encontrada variou de 102,31mg/L a 123,73mg/L para o controle em 2008 e 2009, respectivamente e para as laranjas vermelhas variou de 147,37mg/L e 169,27 para a variedade Baía Cara Cara em 2008 e 2009, respectivamente.

Segundo Xu et al., (2008) as principais flavanonas glicosídicas presentes no suco de laranjas e tangerinas cultivadas na China foram a hesperidina e a narirutina, sendo que a naringina e a neohesperidina não foram detectadas. Em seus estudos, o teor de hesperidina nas frutas variou entre 304,46 a 533,64 mg/L, valores estes bem acima do encontrado em nossos estudos. No entanto, Sánchez-Moreno et al., (2003) encontraram na variedade valência um teor de hesperidina igual a 76.61 mg/L.

Análise de Componentes Principais (ACP)

A análise multivariada dos parâmetros físico-químicos (ácido ascórbico, fenólicos totais, flavonóides totais, carotenóides totais e atividade antioxidante DPPH• e ABTS•) estudados e apresentados no capítulo anterior; parâmetros de cor representados por L*, a* e b* das variedades Pêra Rio, Mombuca (três locais de cultivo) e Baía Cara Cara foi realizada usando Análise de Componentes Principais (ACP) (Figura 1).

As laranjas analisadas foram submetidas à Análise de Componentes Principais (ACP). A localização de cada laranja no gráfico sugere qual dos parâmetros se apresenta

em maior conteúdo naquela amostra, pois as laranjas situam-se próximas aos parâmetros que as caracterizam. As amostras que se encontram próximas entre si, apresentam similaridades em relação aos parâmetros avaliados (ácido ascórbico, flavonóides totais, carotenóides totais, compostos fenólicos totais atividade antioxidante e parâmetros de cor L, a e b). O primeiro componente principal explicou 52,77% e o segundo componente principal, 21,77% da variação observada. Juntos, os dois primeiros componentes explicaram 74,54% das variações.

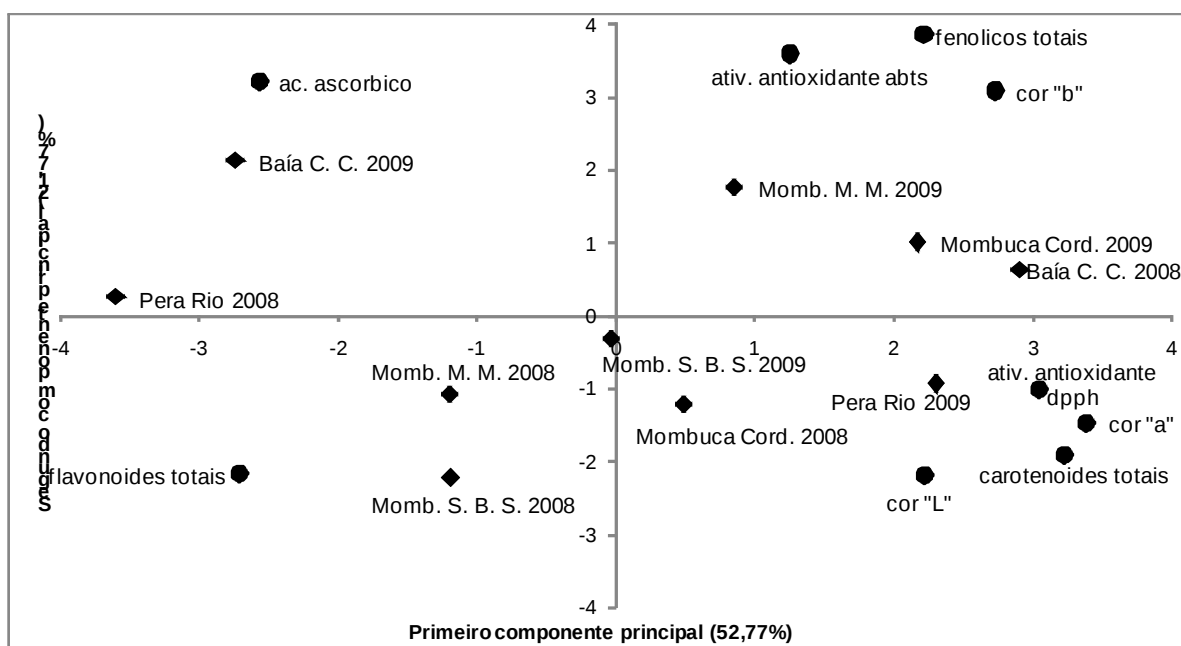


Figura 1. Configuração das amostras obtida pela Análise de Componentes Principais, a partir dos dados de composição de compostos bioativos, capacidade anti-radical livre e cor das variedades cítricas estudadas.

As laranjas Baía Cara Cara safra 2009 e Pera Rio safra 2008 se encontram próximas do parâmetro ácido ascórbico. As laranjas Mombuca de Mogi Mirim e Mombuca de São Bento Sapucaí, ambas da safra de 2008, foram caracterizadas pelo parâmetro flavonóides totais. Os parâmetros de atividade antioxidante (método ABTS•), compostos fenólicos totais e o parâmetro de cor “b” caracterizaram as laranjas

Mombuca de Mogi Mirim e Mombuca Cordeirópolis da safra 2008 e a Laranja Baía Cara Cara da safra 2008. A laranja Mombuca de Cordeirópolis safra 2008 e as laranjas Mombuca de São Bento do Sapucaí e Pera Rio da safra 2009 apresentaram similaridades entre si, sendo caracterizadas pelos parâmetros atividade antioxidante (método DPPH•), carotenóides totais e pelos parâmetros de cor “a” e “L”. Esses resultados foram confirmados pela análise de variância.

Os teores de ácido ascórbico apresentaram correlação negativa (Tabela 7) com os parâmetros de cor “a” e com os teores de carotenóides totais e atividade antioxidante (método DPPH•). O parâmetro de cor “L” apresentou correlação positiva com os teores de carotenóides totais e atividade antioxidante (método DPPH•). O teor de carotenóides totais apresentou correlação positiva com os valores de atividade antioxidante (método DPPH•). O teor de compostos fenólicos totais apresentou correlação negativa com os teores de flavonóides totais. Os demais parâmetros físico-químicos não apresentaram correlação significativa entre si.

Tabela 7: Coeficientes de correlação de Pearson (r) e valor de (p) dos parâmetros físico-químicos para os sucos estudados.

	Ácido ascórbico	Cor "L"	Cor "a"	Cor "b"	Carotenóides totais	Fenólicos totais	Atividade antioxidante (DPPH)	Atividade antioxidante (ABTS)	Flavonóides totais
Ácido ascórbico	1,0000								
Cor "L"	-0,3553 0,3136	1,0000							
Cor "a"	-0,7972 0,0057	0,6130 0,0594	1,0000						
Cor "b"	-0,2505 0,4852	0,2024 0,5749	0,5700 0,0853	1,0000					
Carotenóides totais	-0,7593 0,0108	0,6938 0,0260	0,9177 0,0002	0,3717 0,2901	1,0000				
Fenólicos totais	0,0095 0,9792	0,2348 0,5138	0,4414 0,2015	0,7918 0,0063	0,3464 0,3276	1,0000			
Atividade antioxidante (DPPH)	-0,7038 0,0231	0,4692 0,1712	0,7610 0,0105	0,5095 0,1325	0,7311 0,0162	0,2025 0,5747	1,0000		
Atividade antioxidante (ABTS)	0,1492 0,6808	-0,0935 0,7971	0,1418 0,6961	0,4064 0,2437	0,2024 0,5749	0,5076 0,1342	0,4016 0,2500	1,0000	
Flavonóides totais	0,3862 0,2703	-0,2605 0,4673	-0,4813 0,1589	-0,8118 0,0043	-0,4606 0,1803	-0,6596 0,0379	-0,4791 0,1611	-0,2571 0,4733	1,0000

Valores representando os coeficientes “r” e valores de p de significância.

Conclusões

Com os resultados obtidos das análises das variedades cítricas, pode-se concluir que o licopeno foi o carotenóide exclusivamente presente nas variedades de polpa vermelha. Para os parâmetros de cor, percebeu-se que todas as variedades de frutas cítricas avaliadas apresentaram parâmetros significativamente diferentes. A flavanona hesperidina foi encontrada em maior quantidade e que o parâmetro de cor “L” apresentou correlação positiva com os teores de carotenóides totais e atividade antioxidante (método DPPH•).

Referências

- ARIAS, R.; LEE, T.C.; LOGENDRA, L.; JANES, H. Correlation of lycopene measured by HPLC with the L*, a*, b* color readings of hidroponic tomato and the relationship of maturity with color and lycopene content. **J Agric Food Chem**, v.48, p.1697-1702, 2000.
- BITTERS, W.P. Physical characters and chemical composition as affected by scions and rootstocks. In: SINCLAIR, W.B. (Ed.) **The orange: Its Biochemistry and Physiology**, The University of California, Riverside, p. 56-95, 1961.
- 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.
- FNP. Agrianual 2007: anuário de agricultura brasileira. FNP consultoria & agroinformativos, São Paulo, p.257-270, 2007.
- HADLEY, C. W.; MILLER, E. C.; SCHWARTZ, S. J.; CLINTON, S. K. Tomatoes, lycopene, and prostate cancer: Progress and promise. **Experim Biol and Med**, v.227, p.869-880, 2002.
- 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. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 85, p. 894-901, 2005.
- NEVES, M. F.; LOPES, F. Estratégias para a laranja no Brasil. São Paulo, SP, Editora Atlas, 2005. 225p.

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. *Brazilian Journal of Food Technology*, v.6, n. 2, p. 191-196, 2003.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. A guide for carotenoid analysis in foods. Washington, DC: International Life Sciences Institute Press, 1999, 59p.

SÁNCHEZ-MORENO, C.; BEGOÑA DE ANCOS, L. P.; CANO, M. P. Effect of high-pressure processing on health-promoting attributes of freshly squeezed orange juice (*Citrus sinensis* L.) during chilled storage. **Eur. Food Res. Technol.**, v.216, p.18-22, 2003.

STACEWICZ-SAPUNTZAKIS, M.; BOWEN, P. E. Role of lycopene and tomato products in prostate health. **Biochim et Biophys Acta**, v.1740, p.202-205, 2005.

WERTZ, K.; SILER, U.; GORALCZYK, R. Lycopene: modes of action to promote prostate health. **Archives Biochem and Biophys**, v.430, p. 127-134, 2004.

XU, J.; TAO, N.; LIU, Q; DENG, X. Presence de diverse ratios of Lycopene/B-carotene in five pink and red-fleshed citrus variedades. **Scientia Horticult**, v.108, p.181-184, 2006.

CAPÍTULO 6

**EFEITO DO PROCESSO DE OBTENÇÃO DE SUCO
PASTEURIZADO DE LARANJA SOBRE SEUS
COMPOSTOS ANTIOXIDANTES, CAPACIDADE
SEQUESTRANTE DOS RADICAIS DPPH• E ABTS• E
PARÂMETROS DE COR**

RESUMO

A laranja é uma fruta cítrica muito consumida mundialmente e conhecida por seus constituintes fitoquímicos presentes no suco e na casca. Duas variedades de laranja apresentando cada uma dois tipos de suco foram avaliadas quanto à coloração, o teor de carotenóides, o teor de flavanonas e o efeito do processo de obtenção do suco. Também foi avaliada a capacidade antioxidante via radical DPPH• e ABTS• dos sucos expressos como TEAC (Trolox Equivalent Activity Capacity). Os parâmetros de cor b^* e Chroma nos sucos aqui estudados apresentaram valores diretamente proporcionais. Os dois sucos tanto da variedade Pera como da Mombuca apresentaram valores de carotenóides totais significativamente ($p \leq 0,05$) superiores antes do processo de pasteurização. Das flavanonas avaliadas neste estudo (narirutina, eriocitrina, hesperidina e naringina), apenas as flavanonas narirutina e hesperidina estiveram presentes em todos os sucos estudados. Aplicando a Análise de Componentes Principais (ACP), verifica-se que o primeiro componente principal explicou 57,39% e o segundo componente principal, 31,08% da variação observada. Juntos, os dois primeiros componentes explicaram 88,47% das variações, considerando que a análise teve uma forte explicação quando o ACP está acima de 50%. O suco fresco de laranja Pera foi fortemente caracterizado pelo parâmetro de atividade antioxidante e os sucos fresco e pasteurizado da Mombuca, apresentaram similaridade por se encontrarem próximos dos parâmetros de carotenóides totais e cor L^* , a^* e b^* .

Palavras-chave: laranja Mombuca, laranja Pera, carotenóides, compostos fenólicos, atividade anti-radical livre, Análise de Componentes Principais.

INTRODUÇÃO

As frutas cítricas são cultivadas em todo o mundo e o suco de laranja é o suco de fruta mais popular e mais consumido mundialmente. O Brasil e os Estados Unidos são os maiores produtores mundiais. Desde os anos 80, o Brasil é o maior produtor de laranjas e de suco de laranja concentrado congelado. O estado de São Paulo, principal estado que abriga o maior parque citrícola do país e do mundo deverá somar 352,57 milhões de caixas na safra de 2009/10. Do total previsto para a nova temporada, aproximadamente 81% será destinado às indústrias fabricantes de suco de laranja (IEA, 2010; CATI, 2010).

Apesar de a citricultura brasileira deter a liderança mundial na produção de laranjas, de suco de laranja concentrado congelado (SLCC) e de suco de laranja NFC (*Not from concentrated*), observa-se um baixo consumo no mercado interno e diante disso, há um grande interesse no desenvolvimento de produtos, específicos para o cultivo de variedades cítricas, como por exemplo, para a produção de suco industrializado, tais com o suco de laranja pasteurizado e o suco concentrado congelado.

O alto consumo de frutas tem sido associado com baixa incidência de doenças degenerativas (FESKANICH et al., 2000; MICHELS et al., 2000). Este efeito está associado não somente à presença de antioxidantes como as vitaminas, mas também, a outras substâncias naturais que mostram atividade anti-radical livre como os carotenóides, flavonóides e outros compostos fenólicos.

É conhecido que naturalmente acontecem perdas de antioxidantes como consequência de processo e armazenamento do produto. Operações como descascar, cortar e fatiar tem sido apontadas por induzir a rápida ação enzimática que acontece naturalmente em compostos antioxidantes diminuindo a vida de prateleira do produto.

Tratamentos em alimentos, logo após a colheita, como atmosfera modificada, processamento mínimo e cozimento doméstico são estudados para avaliar sua importância nutricional após esses procedimentos (DEL CARO et al., 2004; GIL et al., 1999; KAUR et al., 2001).

Como as frutas cítricas são importantes por apresentarem propriedades nutricionais e antioxidantes como ácido ascórbico, carotenóides e flavanonas glicosídicas, é importante avaliar o efeito do processo de obtenção do suco nesses compostos. Desta forma, o estudo do efeito do processamento térmico de frutas cítricas sobre a composição dos carotenóides, flavonóides e ácido ascórbico, e sobre a atividade antioxidante torna-se importantes.

Os alimentos geralmente contêm uma diversidade de compostos com atividade anti-radical livre, que são hidrofílicos, por exemplo, ácido ascórbico, e outros que são lipofílicos, como os carotenóides, portanto é interessante utilizar métodos capazes de avaliar a capacidade antioxidante de compostos com diferentes polaridades. Um grande número de métodos tem sido usado para determinar atividade anti-radical livre, entre eles, os métodos DPPH• e ABTS•, que podem ser aplicados no estudo de compostos antioxidantes hidrofílicos e lipofílicos, tanto puros ou como extratos (ROGINSKY e LISSI, 2005; RE et al., 1999).

Este trabalho teve como objetivo estudar o efeito do processamento para obtenção de suco pasteurizado sobre os compostos bioativos presentes e a capacidade antioxidante do suco, e comparar o suco da laranja clara variedade Pera com o suco da laranja vermelha variedade Mombuca.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras

As amostras de suco das duas variedades (Mombuca (CV93) e Pera (CV 154) foram fornecidas por uma indústria produtora de suco cítrico. As laranjas foram cultivadas na cidade de Cordeirópolis/SP.

Métodos

Determinação 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 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 absorbância a 510 nm. A rutina foi utilizada como padrão para a obtenção da curva de calibração. Os resultados foram expressos em mg equivalente de rutina/mL.

Extração dos 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 éter etílico 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 dos carotenóides por CLAE

Os pigmentos carotenóides foram analisados por RP-HPLC usando gradiente ternário de eluição e uma coluna Symmetry C₁₈ (4.6 x 150 mm I.D., 3.5µm) da Waters. O sistema cromatográfico era equipado com detector por arranjo de fotodiodos (DAD) e a fase móvel consistia de acetonitrila: metanol: acetato de etila contendo 0.05% de trietilamina com vazão de 0.6 mL/min. Um gradiente foi aplicado a partir de 99:1:0 para

64:1:35 em 30 minutos e 99:1:0 em 60 min. O volume de injeção foi de 20 µL. Detecção realizada de 350 a 550 nm. As amostras e as soluções foram filtradas em membrana de 0.22 µm antes da injeção.

Os carotenóides isolados individualmente em amostras foram identificados por comparação de seu tempo de retenção no HPLC e pelas características dos espectros do arranjo de diodos com padrões e também valores na literatura.

Deteminação do teor das flavanonas glicosídicas (FGs) por CLAE

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-maria à 50°C sob fluxo de nitrogênio, sendo levados a um volume final de 10mL 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.

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 narirutina) entre 200 e 450nm. Os resultados foram expressos como mg/L.

Análise estatística

A análise estatística dos resultados foi realizada através de análise de variância (ANOVA), 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. Os dados dos constituintes químicos e atividade anti-radical em frutas foram avaliados pela análise de Componentes Principais do programa computacional SAS (Statistical Analysis System)/STAT.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Sólidos Solúveis Totais (SST), Acidez Total Titulável (ATT), ratio, Fenólicos Totais, Flavonóides Totais e Carotenóides Totais.

Os teores de ácido ascórbico, sólidos solúveis totais (SST), acidez total titulável (ATT), *ratio*, fenólicos totais, flavonóides totais, carotenóides totais das amostras estudadas estão apresentados na Tabela 1.

Em relação ao suco fresco, os resultados mostraram que a laranja clara Pera apresentou maior acidez e teor de ácido ascórbico que a laranja vermelha Mombuca. As duas variedades apresentaram concentrações semelhantes de fenólicos totais, e o suco da Mombuca quantidades significativamente maiores ($p < 0,05$) de flavonóides e carotenóides totais (Tabela 1) que o suco da variedade Pera.

O processo de pasteurização da Mombuca apresentou a maior concentração de fenólicos totais, flavonóides totais e ácido ascórbico, enquanto que o maior conteúdo de carotenóides totais foi detectado no mesmo suco sem a pasteurização (Tabela 1). Em diversas 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).

Tabela 1: Valores de sólidos solúveis totais, acidez total titulável, *ratio*, ácido ascórbico, fenólicos totais, flavonóides totais e carotenóides totais presentes nos sucos fresco e pasteurizado das duas variedades de laranja estudadas*.

	<i>Pera</i> suco fresco	<i>Pera</i> suco pasteurizado	<i>Mombuca</i> suco fresco	<i>Mombuca</i> suco pasteurizado
Sólidos solúveis totais (%)	12,0	11,5	11,2	9,6
Acidez total titulável (%)	0,99±0,01b	1,01±0,01a	0,47±0,01d	0,50±0,01c
<i>Ratio</i> (SST/ATT)	12,12a	11,39a	23,83b	19,2c
Ácido ascórbico (mg/100mL)	26,72±0,37b	26,93±0,37b	23,48±0,37c	28,22±0,37a
Fenólicos totais (GAE,mg/100mL)	1,61±0,04c	1,66±0,07b	1,60±0,02d	1,80±0,05a
Flavonóides totais (mg Rutina, /mL)	17,61±0,03d	31,59±0,27b	25,75±0,02c	36,91±0,11a
Carotenóides totais (mg β-caroteno/mL)	3,62±0,47b	2,00±0,08c	4,94±0,07a	3,99±0,05b

* Médias com letras iguais na mesma linha não diferem significativamente ($p \leq 0,05$) entre si pelo teste de Tukey.

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

O suco fresco de Mombuca apresentou o maior *ratio* (23,83) devido ao seu baixo teor de acidez (0,47 mg/100mL). O *ratio* das amostras de suco das variedades e processamento estudados esteve fortemente correlacionado com o teor de carotenóides totais, pois quanto maior o *ratio* maior o teor de carotenóides totais na mesma.

Atividade antioxidante dos sucos pelos métodos DPPH• e ABTS•

Para os valores obtidos para os sucos pelos métodos DPPH• e ABTS•, observou-se que o método ABTS• é o método que melhor demonstrou a capacidade antioxidante para essas amostras de sucos, variando entre $2,84 \pm 0,02$ a $4,68 \pm 0,44 \mu\text{Mol Trolox/g}$. Dentre os suco estudados Pera sem pasteurização e pasteurizado e Mombuca sem pasteurização e pasteurizado, nos dois casos os sucos antes da pasteurização, mostraram-se com maior capacidade antioxidante tanto para o método ABTS• como para o DPPH•, perdendo um pouco após passar pelo processo da pasteurização.

Se observarmos os sucos, avalia-se que todos eles apresentaram diferença significativa entre os métodos (vide letra minúscula na Figura 1). Mas se observarmos pela variedade a análise mostra que apenas o suco Mombuca não pasteurizado pasteurizado não apresentou diferença significativa para o método ABTS• ($3,76 \pm 0,15$ e $3,99 \pm 0,07 \mu\text{Mol Trolox/g}$, respectivamente)

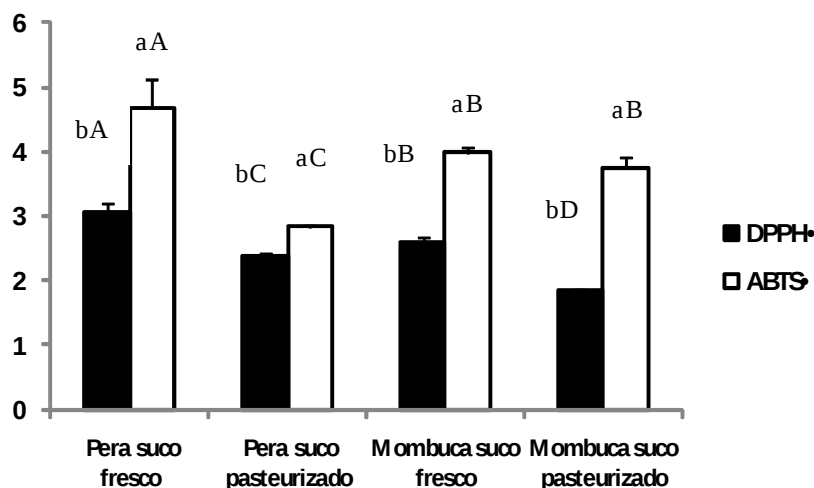


Figura 1. Valores da atividade antioxidante expressa em $\mu\text{Mol Trolox/g}$ do suco das frutas. Os valores representam médias $\pm$ DP. Médias com letras minúsculas não diferem estatisticamente entre métodos. Médias com letras maiúsculas não diferem estatisticamente entre as variedades de suco. Colunas com diferentes letras são significativamente diferentes no teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Medida da cor

Com os resultados da cor dos sucos pasteurizados e não pasteurizados 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 Hue ou/e C^* e Hue foram inversamente proporcionais.

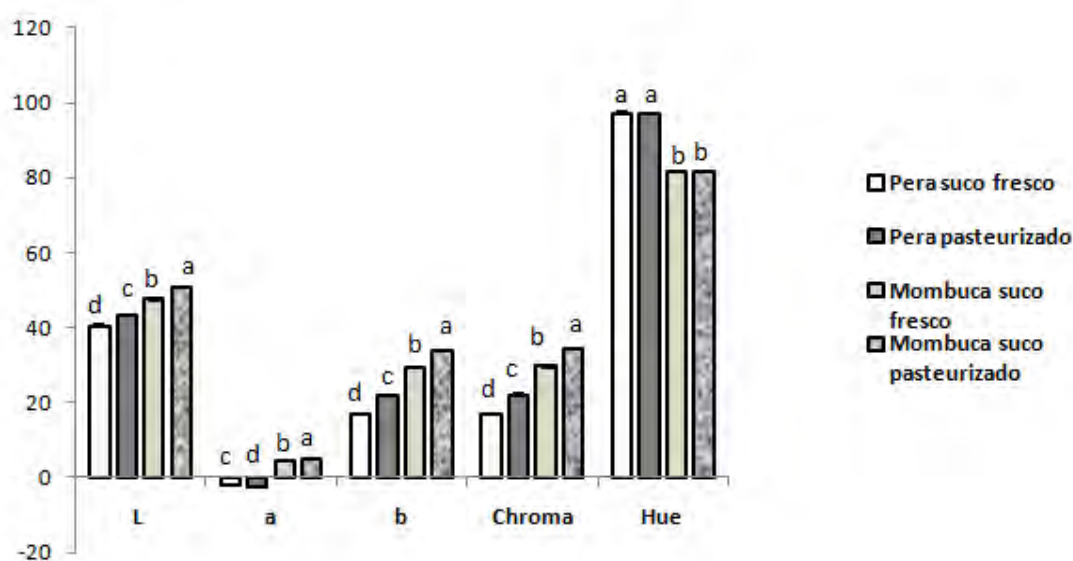


Figura 2: Valores de cor do sistema CIELAB para os quatro tipos de sucos cítricos. Os valores representam médias±DP. Médias com letras iguais não diferem significativamente ($p \leq 0,05$) entre si pelo teste de Tukey.

Na Figura 2 estão representados os valores de L^* (luminosidade), a^* (vermelho-verde), b^* (amarelo-azul), C^* (Chroma) e o *Hue*, valores estes que representam os parâmetros de cor CIELab. Todos os quatro sucos avaliados apresentaram valores de L^* (Luminosidade) entre 40 e o 50 com diferença estatística entre todos ($p \leq 0,05$). O parâmetro a^* forneceu valor negativo para os dois sucos de Pera, tanto o suco fresco (sem NFC) como o pasteurizado (com NFC), indicando que o suco desta variedade apresentou uma coloração mais esverdeada, enquanto que os outros sucos de Mombuca (com NFC e sem NFC) apresentaram valores positivos de a^* , indicando uma coloração avermelhada. Os valores referentes ao parâmetro b^* foram positivos para todos os sucos, no entanto os valores dos sucos da Mombuca se destacaram o que indica a presença da coloração mais amarelada destes sucos. O parâmetro *Hue* mostra a localização da cor em um diagrama, onde o ângulo 0° representa vermelho puro; o 90° , o amarelo puro; o 180° , o verde puro e o 270° , o azul puro. Os sucos da Mombuca apresentaram ângulo próximo a 80° (tonalidade levemente amarelada), e os sucos da

variedade Pêra próximo a 98° (tonalidade amarelada). O Chroma é definido pela distância de Hue ao centro do diagrama tridimensional, sendo o 0 no centro e aumentando de acordo com a distância (CLYDESDALE, 1984; OLIVEIRA, 2002). Das duas frutas estudadas em suco, a variedade Pêra apresentou no suco, tanto pasteurizado como o fresco valores mais próximos de zero.

Análise de Componentes Principais (ACP)

A análise multivariada dos parâmetros físico-químicos (ácido ascórbico, fenólicos totais, flavonóides totais e carotenóides totais), parâmetros de cor representados por L*, a* e b* e atividade antioxidante DPPH• e ABTS• dos sucos da laranja Pera (sem NFC e com NFC) e de Mombuca (sem NFC e com NFC) foi realizada usando Análise de Componentes Principais (ACP) (Figura 3).

O primeiro componente principal explicou 57,39% da variação observada, e o segundo componente principal, 31,08%. A localização de cada suco sugere qual parâmetro apresentou maior conteúdo naquele suco, pois os sucos situam-se próximos dos vetores (parâmetros) que os caracterizam. Juntos, os dois primeiros componentes explicaram 88,47% das variações. As amostras que se encontram próximas entre si, apresentam similaridades em relação aos parâmetros avaliados (ácido ascórbico, flavonóides totais, carotenóides totais, compostos fenólicos totais atividade antioxidante e parâmetros de cor L*, a* e b*).

O suco de laranja Mombuca Cordeirópolis sem NFC foi caracterizado pelos parâmetros carotenóides totais e pelos parâmetros de cor L*, a* e b*. Já o suco de laranja Mombuca Cordeirópolis com NFC foi caracterizado por conter maiores teores de compostos fenólicos totais e flavonóides totais. O suco de laranja Pera Rio sem NFC

foi fortemente caracterizado pelos parâmetros de atividade antioxidante. O suco de laranja Pera Rio com NFC não foi fortemente caracterizado por nenhum parâmetro analisado. Esses resultados foram confirmados pela análise de variância.

O parâmetro de cor “L” foi positivamente correlacionado com o parâmetro de cor “b”. Os teores de flavonóides totais apresentaram correlação negativa (Tabela 2) com os valores de atividade antioxidante (pelo método DPPH•). Os demais parâmetros analisados não apresentaram correlação significativa entre si.

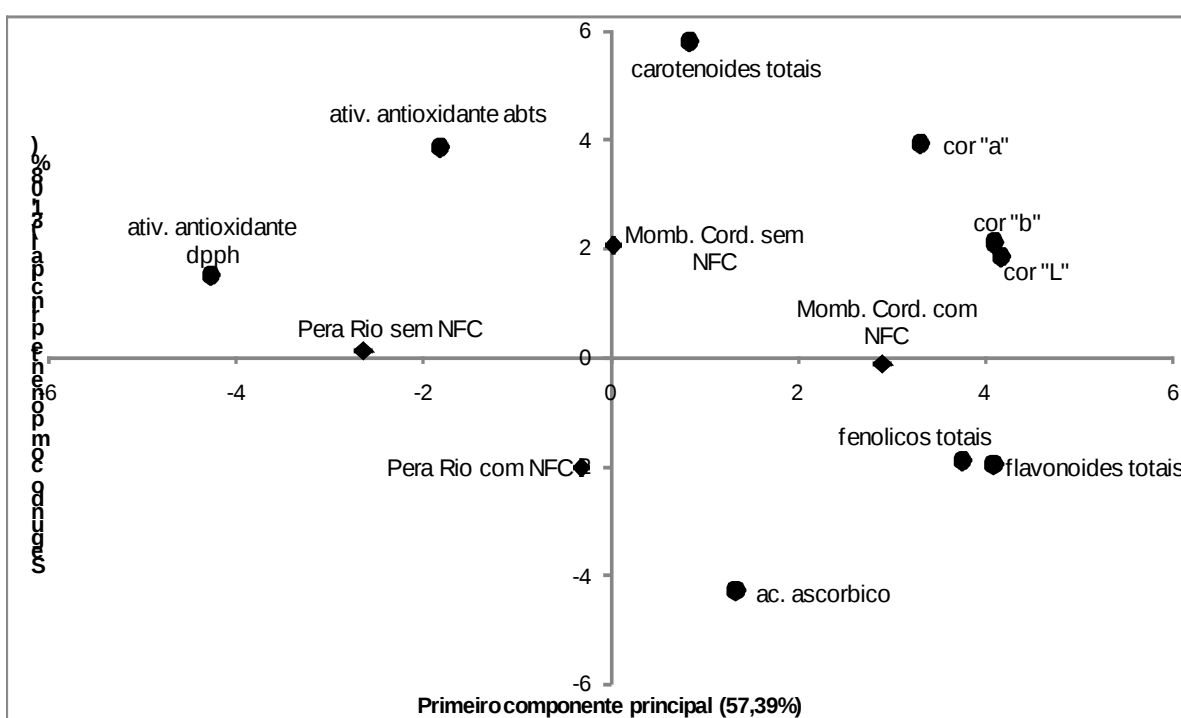


Figura 3. Configuração das amostras obtida pela Análise de Componentes Principais, a partir dos dados de composição de compostos bioativos, capacidade anti-radical livre e cor dos sucos Pera sem e com NFC e de Mombuca de Cordeirópolis sem e com NFC.

Tabela 2: Coeficientes de correlação de Pearson (r) e valor de (p) dos parâmetros físico-químicos para os sucos estudados.

	Ácido ascórbico	Cor "L"	Cor "a"	Cor "b"	Carotenóides totais	Fenólicos totais	Atividade antioxidante (DPPH)	Atividade antioxidante (ABTS)	Flavonóides totais
Ácido ascórbico	1,0000								
Cor "L"	0,0212 -0,9788	1,0000							
Cor "a"	-0,2312 -0,7688	0,916 0,0840	1,0000						
Cor "b"	-0,019 0,9810	0,999 < 0,0001	0,932 0,0680	1,0000					
Carotenóides totais	-0,5443 (0,4557	0,4731 0,5269	0,7868 0,2131	0,5099 0,4900	1,0000				
Fenólicos totais	0,7458 0,2542	0,6818 0,3181	0,4415 0,5585	0,6518 0,3482	-0,0825 0,9175	1,0000			
Atividade antioxidante (DPPH)	-0,4569 0,5430	-0,8417 0,1582	-0,5625 0,4375	-0,8163 0,1837	0,0603 0,9397	-0,8949 0,1050	1,0000		
Atividade antioxidante (ABTS)	-0,1849 0,8151	-0,2376 0,7623	0,1265 0,8735	-0,2091 0,7909	0,6409 0,3591	-0,2929 0,7071	0,5788 0,4212	1,0000	
Flavonóides totais	0,4164 0,5836	0,7911 0,2089	0,4793 0,5206	0,764 0,2359	-0,1644 0,8356	0,8314 0,1685	-0,9868 0,0132	-0,7019 0,2980	1,0000

Valores representando os coeficientes "r" e valores de p de significância.

Ao tentar correlacionar o teor de carotenóides totais com os valores dos parâmetros a^* , b^* e L^* , os sucos das Mombucas de Cordeirópolis pasteurizado (com NFC) e fresco (sem NFC) mostraram-se, pela configuração obtida pela Análise de Componentes Principais (Figura 3), com mais afinidade de correlacionar-se, ou seja, se correlacionaram positivamente que os sucos da variedade Pera. Tal fato pode-se confirmar também pela Figura 2 dos valores de cor.

Conteúdo de flavanonas glicosídicas (FGs)

Quatro diferentes tipos de flavanonas (naringina, hesperidina, naringina e eriocitrina) foram analisados nos sucos cítricos com NFC e sem NFC. Naringina e eriocitrina não foram detectadas em nenhum suco em questão, sendo que a hesperidina e naringina estiveram presentes em todos os sucos estudados.

O teor de hesperidina encontrado nos sucos cítricos variou de $103,30 \pm 2,23 \text{ mg/L}$ no suco Pera sem NFC a $159,21 \pm 7,88 \text{ mg/L}$ no suco Mombuca sem NFC. Os dois sucos sem NFC apresentaram os maiores teores deste constituinte ($p \leq 0.05$), diferindo entre eles e os demais sucos pasteurizados (Tabela 3). Os cromatogramas dos sucos estão apresentados em anexo. Todos os resultados foram obtidos como médias $\pm$ desvio padrão.

Tabela 3: Conteúdo de flavanonas glicosídicas (mg/L) nas variedades de suco não pasteurizado (sem NFC) e pasteurizado (com NFC).

	Pera Suco Fresco	Pera Suco Pasteurizado	Mombuca Suco Fresco	Mombuca Suco Pasteurizado
Eriocitrina	nd	nd	nd	nd
Naringina	nd	nd	nd	nd
Hesperidina	120,06±1,94c	103,30±2,23b	159,21±7,88a	135,31±4,11b
Narirutina	20,54±2,21c	15,06±1,89d	34,66±2,97a	26,42±5,54b

Os valores representam médias de três lotes±DP. Linhas com diferentes letras são significativamente diferentes no teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

nd - não determinado

Gil-Izquierdo et al.(2002) observaram uma diminuição de 28 e de 19% no teor de narirutina e de hesperidina respectivamente, em relação aos teores iniciais, em polpa de laranja Navel pasteurizada a 95°C por 30 segundos. Já em amostras de sucos da mesma variedade, pasteurizadas a 75 e a 95°C por 30 segundo, não foram verificadas diferenças significativas na composição das flavanonas.

Um acréscimo médio de 12,5 e de 28% nas concentrações de narirutina e de hesperidina, foi verificado em amostras de sucos de laranja Valência pasteurizadas a 350 MPa/30°C/2,5 minutos e a 400 MPa/40°C/1 minuto, respectivamente (SÁNCHEZ-MORENO et al., 2003).

Alguns trabalhos relatam um aumento na extratibilidade de flavanonas em suco pasteurizado, ou seja, o teor é maior no suco pasteurizado (DEL CARO et al., 2004; GIL-IZQUIERDO et al., 2002; SÁNCHEZ-MORENO et al., 2003). Todavia, os autores não indicam se fizeram alguma correção no teor de sólidos solúveis do suco pasteurizado nem quais os respectivos valores encontrados no suco fresco e processado. Desta forma, entendemos que o acréscimo relatado se deva, provavelmente, à

evaporação de água que ocorre durante o processamento de sucos e não à maior extratibilidade das flavanonas.

No processo industrial de extração do suco, a pressão mecânica é maior, e parte das flavanonas que estão presentes no albedo, na casca e nas membranas dos frutos são extraídas junto com o suco. Este fato não ocorre no suco extraído manualmente e também foi relatado em outros trabalhos (OOGHE et al., 1994; GIL-IZQUIERDO et al., 2002).

Analisando todos os sucos quanto ao efeito sobre a composição de flavanonas, verificamos um comportamento distinto. Houve perdas de Narirutina e Hesperidina durante o processo de pasteurização do suco (Tabela 3). Os respectivos cromatogramas estão apresentados na figura 4.

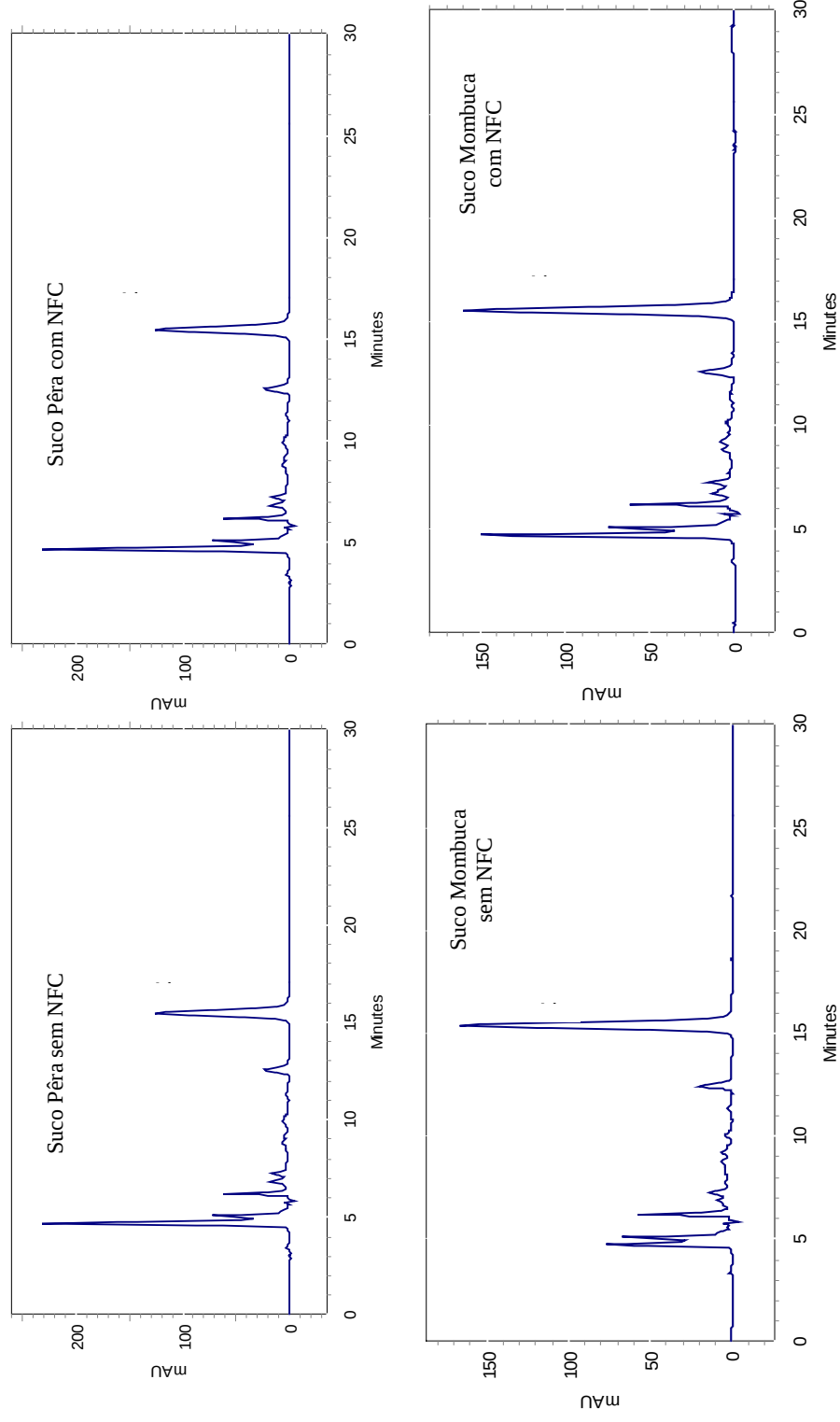


Figura 4. Cromatogramas característicos obtidos por CLAE das flavanonas dos sucos das variedades Pêra e Mombuca. Identificação dos picos:
1- Narirutina; 2- Hesperidina.

Conteúdo de Carotenóides por CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência)

Os principais carotenóides identificados nas amostras de suco não-pasteurizados e pasteurizados das variedades Pera e Mombuca do presente estudo são reportados como típicos dentre os demais encontrados em outros na literatura (ROUSEFF, RALEY e HOF SOMMER, 1996; MOULY, GAYDOU e CORSETTI, 1999; MOULY et al., 1999), no entanto, vale ressaltar que, apenas a variedade Mombuca apresentou o carotenóide Licopeno 82,90µg/L (suco não pasteurizado) e 107,60µg/L (suco pasteurizado) (Tabela 4) não presente na outra variedade.

Enquanto o tomate e seus produtos constituem a única fonte de licopeno em muitos países, o Brasil pode se vangloriar de possuir outras fontes desse composto. A composição de carotenóides também pode ser influenciada pelas práticas agrícolas, por isso o interesse de desenvolver produtos ricos em compostos benéficos à saúde.

A Tabela 4 apresenta as composições, em µg/L, dos carotenóides β-caroteno, licopeno, β-criptoxantina, α-criptoxantina, zeaxantina, luteína e violaxantina, quantificados nas amostras de suco.

Tabela 4: Conteúdo de carotenóides (µg/L) nos sucos não pasteurizados e pasteurizados das variedades Pera e Mombuca cultivados em Cordeirópolis.

	PERA SUCO FRESCO	PERA SUCO PASTEURIZADO	MOMBUCA SUCO FRESCO	MOMBUCA SUCO PASTEURIZADO
β-caroteno	12,88±1,8c	14,61±1,07c	67,91±2,33b	72,82±2,14a
Licopeno	-*	-	82,90±3,72b	107,60±2,47a
β-criptoxantina	55,48±4,2c	38,51±2,2d	81,27±2,13b	86,62±2,09a
α-criptoxantina	19,31±1,02c	15,93±1,12d	30,13±1,27b	33,83±2,17a
Zeaxantina	99,60±2,08b	81,72±3,03c	106,11±1,51a	97,92±1,7b
Luteína	77,83±2,12c	72,38±2,09d	101,85±2,14a	92,72±2,73b
Violaxantina	49,70±2,31d	63,70±2,43b	54,95±2,08c	69,78±2,09a

Os valores representam médias de três lotes±DP, Linhas com diferentes letras são significativamente diferentes no teste de Tukey ($p \leq 0,05$),

- *não determinado,

Os resultados obtidos foram expressos como médias ± desvio padrão. As diferenças significativas entre as médias dos resultados foram calculadas através do teste de Tukey, considerando um nível de 95% de confiança. Os cromatogramas dos sucos estão apresentados na figura 5.

Com exceção do β-caroteno dos sucos de Pera, todos os outros carotenóides apresentaram diferença significativa durante o processamento para as duas variedades.

O aumento do conteúdo da maioria dos carotenóides nos sucos, provavelmente se favorece pelos processamentos térmicos utilizados, visto que o teor de Sólidos Solúveis Totais foi corrigido ao teor do suco fresco correspondente antes da análise.

Dentre os carotenóides identificados encontram-se os pró-vitâmicos A (β-caroteno e β-criptoxantina) e os carotenóides ativos contra degeneração macular relacionada à idade e cataratas (luteína e zeaxantina).

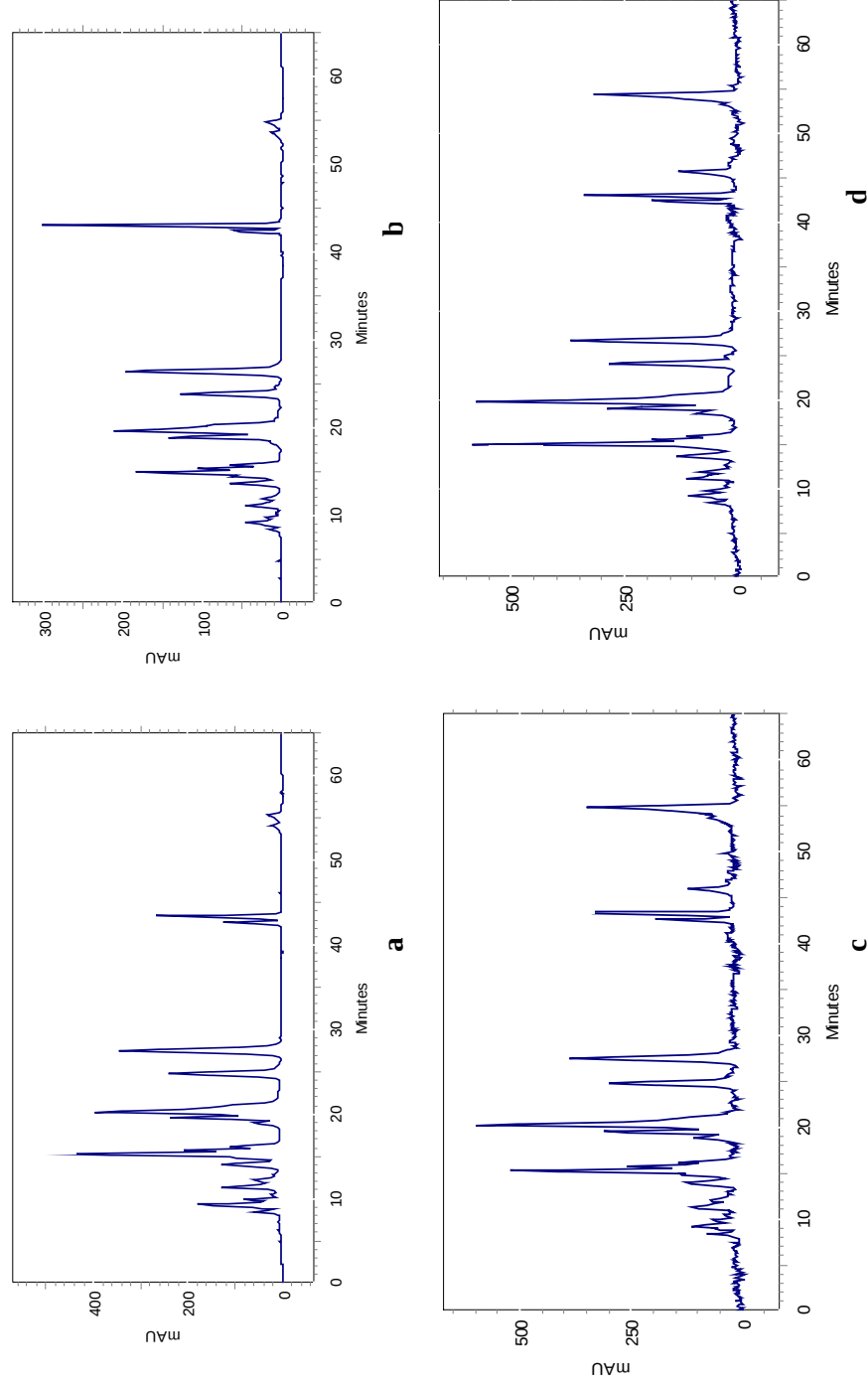


Figura 5. Cromatogramas característicos obtidos por CLAE dos carotenóides dos sucos frescos e pasteurizados das variedades Pêra (a e b) e Mombuca (c e d), nas condições descritas no texto. Identificação dos picos: 1- Violaxantina, 2- β -caroteno, 3- Luteína, 4- α -criptoxantina, 5- β -criptoxantina, 6- Zeaxantina, 7-Licopeno.

Conclusão

Este estudo confirmou a alta correlação positiva entre os parâmetros avaliados (ácido ascórbico, flavonóides totais, fenólicos totais, carotenóides totais, atividade antioxidante e parâmetros de cor L*, a* e b*). O efeito da pasteurização nos sucos estudados demonstrou ser eficaz para o aumento da maioria dos carotenóides, já para as flavanonas, o teor após o processo foi menor que o inicial.

Referências

- ARIAS, R.; LEE, T.C.; LOGENDRA, L.; JANES, H. Correlation of lycopene measured by HPLC with the L*, a*, b* color readings of hidroponic tomato and the relationship of maturity with color and lycopene content, **J Agric Food Chem**, v.48, p.1697-1702, 2000.
- 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.
- CATI- Coordenadoria de Assistência Técnica Integral. Acessado em mai/2010.
- 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.
- DEL CARO, A.; PIGA, A.; VACCA, V.; AGABBIO, M., Changes of flavonoids, vit C and antioxidant capacity in minimally processed citrus segments and juices during storage. **Food Chem.**, v.84, p. 99-105, 2004.

IEA- Instituto de Economia Agrícola. www.iea.sp.gov.br. Acessado em mai/2010.

KAUR, C.; KAPOOR, H. C. Antioxidants in fruits and vegetables - the millennium's health. *Intern. J. Food Scien & Technol.*, v. 36, n. 7, p. 703-725, 2001.

FESKANICH, D.; ZIEGLER, R. G.; MICHAUD, D.S.; GIOVANNUCCI, E. L.; SPEIZER, F. E.; WILLETT, W.C.; COLDITZ, G. A. Prospective study of fruit and vegetable consumption and risk of lung cancer among men and women. *J. Nat. Cancer Instit.*, v.92, p.1812-1823, 2000.

GIL-IZQUIERDO, A.; GIL, M. I.; FERRERES, F. Effect of post harvest storage and processing on the antioxidant constituents (flavonoids and vitamin C) of fresh CUT spinach. *J. Agric. Food Chem.*, v. 47, p.2213-2217, 1999.

GIL-IZQUIERDO, A.; GIL, M. I.; FERRERES, F. Effect of processing techniques at industrial scale on orange juice antioxidant and beneficial health compounds. *J. Agric. Food Chem.*, v.50, p. 5107-5114, 2002.

MICHELS, K. B.; GIOVANNUCCI, E.; JOSHIPURA, K. J.; ROSNER, B. A.; STAMPFER, M. J.; FUCHS, C.S.; COLDITZ, G.A.; SPEIZER, F. E.; WILLETT, W. C. Prospective study of fruit and vegetable consumption and incidence of colon and rectal cancers, *J. Nat. Cancer Instit.*, v.92, p.1740-1752, 2000.

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.

OOGHE, W, C.; OOGHE, S. J.; DETAVERNIER, C. M.; HUYGHEBAERT, A. Characterization of orange juice (*Citrus sinensis*) by flavanone glycosides. *J. Agric. Food Chem.*, v.42, p. 2183-2190, 1994.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying na improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Rad Biol & Medic**, v.26, p. 1231-1237, 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 in food. **Food Chem**, v.92, p. 235-254, 2005.

SÁNCHEZ-MORENO, C.; BEGOÑA DE ANCOS, L. P.; CANO, M. P. Effect of high-pressure processing on health-promoting attributes of freshly squeezed orange juice (*Citrus sinensis L*) during chilled storage. **Eur. Food Res. Technol.**, v.216, p.18-22, 2003.

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.

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.

Conclusões Gerais

- o limão Siciliano e a *Grapefruit*, contiveram os maiores teores de flavonóides totais e a laranja Hamlin o menor teor;
- A *Grapefruit* além de apresentar o maior teor de flavonóides totais, também apresentou o maior teor de fenólicos totais e carotenóides totais;
- o método DPPH• se mostrou melhor em duas das quatro frutas (lima da Pérsia e Hamlin), ou seja, a atividade antioxidante de uma fruta não está relacionada apenas aos teores dos principais bioativos e sim com a estrutura química desses constituintes e, para isso, é necessário que se extraia e quantifique o maior número possível de constituintes presentes;
- Os carotenóides encontrados nas frutas cítricas foram: luteína, violaxantina, β -criptoxantina, zeaxantina, β -caroteno e α -criptoxantina e a fruta *Grapefruit* foi a fruta que apresentou todos os carotenóides analisados em seu suco.
- As flavanonas encontradas nas frutas cítricas do presente estudo foram: eriocitrina, naringina, hesperidina e narirutina. A maior quantidade de hesperidina encontrada foi na laranja hamlin e o limão Siciliano foi o único que apresentou a flavanona eriocitrina em seu suco.
- As Mombucas e a Baía Cara Cara apresentaram o carotenóide licopeno e também, mais carotenóides, mais flavonóides e vitamina C em relação a laranja Pêra.
- A Mombuca cultivada em São Bento do Sapucaí, apresentou pelo método DPPH•, maior atividade antioxidante.
- O parâmetro de cor “L*” apresentou correlação positiva com os teores de carotenóides totais e atividade antioxidante (método DPPH•) nas laranjas de polpa vermelha.

- A análise de Componentes Principais mostrou alta correlação positiva entre os parâmetros avaliados (ácido ascórbico, flavonóides totais, fenólicos totais, carotenóides totais, atividade antioxidante e parâmetros de cor L*, a* e b*) para os sucos frescos e pasteurizados estudados.