

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

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS E
CAPACIDADE ANTIOXIDANTE EM SUCOS FRESCOS E
PASTEURIZADOS DE LARANJA**

Mestranda: Gabriela Fabiana Soares Alegre
Orientadora: Profa. Dra. Célia Maria de Sylos

Araraquara - 2015

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

**DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS E
CAPACIDADE ANTIOXIDANTE EM SUCOS FRESCOS E
PASTEURIZADOS DE LARANJA**

Mestranda: Gabriela Fabiana Soares Alegre

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Alimentos e Nutrição da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” – UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Alimentos e Nutrição, com área de concentração em Ciências Nutricionais.

Araraquara – 2015

Ficha Catalográfica

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

- A366d** Alegre, Gabriela Fabiana Soares
Determinação de compostos bioativos e capacidade antioxidante em sucos frescos e pasteurizados de laranja: compostos bioativos e capacidade antioxidante em sucos de laranja / Gabriela Fabiana Soares Alegre. – Araraquara, 2015
70 f.
- Dissertação (Mestrado) – 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. Suco de laranja. 2. Capacidade antioxidante. 3. Compostos bioativos. I. Sylos, Célia Maria de, orient. II. Título.

CAPES: 50700006

Dedico este trabalho,

*À minha mãe Sandra, por me conceder a oportunidade desta vida e seu
amor;*

*Ao meu pai Célio, que mesmo não estando presente fisicamente, tenho a
certeza que de onde estiver estará muito contente e orgulhoso;*

*Ao meu segundo pai Reinaldo que nunca mediu esforços para me ajudar em
que fosse preciso;*

E aos meus irmãos pelo carinho de sempre.

Agradeço,

a Deus pela vida, pelos conhecimentos adquiridos, pelas oportunidades que sempre estão a mim disponíveis, e pela provisão infinita de tudo que preciso.

A meus pais pelo exemplo, dedicação, apoio e carinho.

A meus irmãos pela lembrança da doçura e leveza da infância, esquecida pelas responsabilidades que me vieram com o passar dos anos.

À professora Dr^a. Célia Maria de Sylos, por aceitar em me orientar e auxiliar durante o mestrado.

À professora Dr^a. Eliana Aparecida Varanda, por permitir a utilização de um equipamento tão imprescindível para o desenvolvimento desse trabalho.

À técnica Juliana Rodrigues, pela disponibilidade e paciência em me ajudar durante o uso de equipamento do laboratório Nubbe, no Instituto de Química.

Ao Prof. Dr. Elizeu Antonio Rossi e Prof^a. Dr^a. Daniela Cardoso Umbelino Cavallini pela oportunidade e acompanhamento do estágio docência.

A todos os professores por compartilharem seus conhecimentos e experiências valiosas, contribuindo para minha formação.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara pela oportunidade de trabalhar durante esses dois anos em suas instalações.

Ao Programa de Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição, por me proporcionar esse aprendizado profissional e de vida durante o curso de mestrado.

Aos colegas e amigos que pude conhecer e dividir os anseios dessa vida de pós-graduanda.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de mestrado.

E a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito obrigada!

“Deus inspirei-me boas idéias, que me permitam servir ao maior número possível de pessoas, através de trabalhos compatíveis com a minha vocação, e dai-me força para realizá-las.”

LISTA DE ABREVIATURAS

AAPH	2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride
ABTS	2,2'-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid
AUC	Area under the curve
CUPRAC	Cupric ion reducing Antioxidant Capacity
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPPH	1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl
FG	Flavanonas glicosiladas
FPM	Flavonas polimetoxiladas
FRAP	Ferric reducing ability of plasma
HES	Hesperidina
HPLC	High performance liquid chromatography
MTT	3-(4,5- dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
NAR	Naringina
NAT	Narirutina
NOB	Nobiletina
ORAC	Oxygen radical absorbance capacity
ROS	Reactive oxygen species
SF	Suco fresco
SIN	Sinensetina
SP	Suco pasteurizado
TAN	Tangeritina
TEAC	Trolox equivalent antioxidant capacity
TRAP	Total radical-trapping

LISTA DE FIGURAS

Capítulo I

Figura 1. Esquematização da conversão reversível do ácido ascórbico a desidroascórbico	16
Figura 2. Estrutura química comum dos flavonóides.....	18
Figura 3. Estrutura química dos principais flavonóides identificados em suco de laranja	19
Figura 4. Estrutura química de carotenóides comuns em suco de laranja	21
Figura 5. Espectros de absorção de licopeno, γ -caroteno, α -caroteno, e β -caroteno em éter de petróleo	22
Figura 6. Redução do MTT a Formazan	27
Figura 7. Reação de redução em ensaio FRAP	28

Capítulo II

Figura 1. Separação cromatográfica dos padrões de flavanonas glicosiladas (FG) e flavonas polimetoxiladas (FPM): 40 μ g de narirutina (NAT), 50 μ g de naringina (NAR), 50 μ g de hesperidina (HES), 10 μ g de sinensetina (SIN), 10 μ g de nobiletina (NOB) e 10 μ g de tangeritina (TAN), a 280 e 330 nm	50
Figura 2. Curva de decaimento do percentual de fluorescência medido por ORAC em sucos frescos (SF) e pasteurizados (SP) de laranja, em paralelo com um branco, no decorrer do tempo em minutos	53

LISTA DE TABELAS

Capítulo II

Tabela 1. Caracterização físico-química em sucos frescos e pasteurizados de laranjas	46
Tabela 2. Conteúdos de vitamina C, fenólicos e carotenóides totais, em sucos frescos e pasteurizados de laranjas	47
Tabela 3. Características cromatográficas e concentração de flavanonas glicosiladas e flavonas polimetoxiladas presentes em sucos frescos (SF) e pasteurizados (SP) de laranja	51
Tabela 4. Determinação da capacidade antioxidante por MTT (eq. μM ác. ascórbico/mL de suco), FRAP (μM ác. ascórbico e Trolox/mL de suco), e ORAC (valores ORAC eq. μM ác. ascórbico e Trolox), em sucos frescos e pasteurizados de laranjas	52

RESUMO

Suco de laranja é fonte de compostos benéficos à saúde, como vitamina C, flavonóides e carotenóides, que lhe conferem também propriedade antioxidante. Apesar de muito ser investigado sobre seus compostos bioativos e consequente capacidade antioxidante, há poucos trabalhos que relatem estimação do potencial antioxidante em sucos fresco e pasteurizado de laranja, que são as principais formas disponíveis para consumo no Brasil. Sendo assim o objetivo desse trabalho foi verificar se há diferença no potencial antioxidante nesses dois tipos de sucos. Para isso teores de vitamina C, fenólicos, carotenóides, e flavonóides (flavanonas glicosiladas narirutina, naringina, hesperidina, e flavonas polimetoxiladas sinensetina, nobiletina e tangeritina) foram medidos, e a capacidade antioxidante determinada por três diferentes ensaios, FRAP, ORAC e MTT, sendo este último utilizado pela primeira vez com suco de laranja. Dos três ensaios utilizados, o ORAC foi o que mostrou maiores resultados (cerca 700 vezes maior que MTT e 50 vezes maior que FRAP) e que podem apresentar maior relevância biológica por envolver a geração de radicais livres (peróxilas) de significância patológica, apesar disso o método MTT demonstrou ser uma alternativa viável para medir a capacidade antioxidante de suco de laranja, já que as amostras reduziram o reagente, comprovando seu caráter redutor. O processo de pasteurização pareceu influenciar os conteúdos de fenólicos e carotenóides totais, tendo os sucos pasteurizados menor concentração em relação aos sucos frescos. Em relação ao teor de vitamina C, que variou de 325 a 530 mg/L, não houve diferença significativa entre os sucos frescos e pasteurizados. Quanto aos flavonóides os sucos frescos tiveram maiores concentrações de flavanonas glicosiladas, sendo a hesperidina a predominante (2637-3558 mg/L), enquanto os sucos pasteurizados tiveram maiores níveis de flavonas polimetoxiladas, tendo a nobiletina as maiores concentrações (10,86-16 mg/L). Os sucos demonstraram respostas semelhantes dentre os ensaios antioxidantes, indicando que suco de laranja, fresco ou processado, tem uma importante contribuição antioxidante para a dieta.

ABSTRACT

Orange juice is source of beneficial compounds to health, such as vitamin C, flavonoids and carotenoids, which give also antioxidant properties. Although much be investigated on their bioactive compounds and antioxidant capacity resulting, there are few studies that report estimating the antioxidant potential in fresh and pasteurized juices of orange, which are the main forms available for consumption in Brazil. Thus the aim of this study was to observe the differences in the antioxidant potential in these two types of juices. For this vitamin C content, phenolics, carotenoids and flavonoids (flavanones glycosides narirutin, naringin, hesperidin and flavones polymethoxylated sinensetin, nobiletin and tangeritin) were measured, and the antioxidant capacity determined by three different assays, FRAP, ORAC, and MTT the latter being used for the first time with orange juice. Of the three trials used the ORAC was what showed better results (up to 700 times greater than MTT and 50 times greater than FRAP) and that may have greater biological relevance because it involves the generation of free radicals (peroxyl) of pathological significance, yet the MTT method proved to be a viable alternative to measure the antioxidant capacity of orange juice, with the samples reduced the reagent, demonstrating its reducing character. Pasteurization seem to influence the phenolic content and total carotenoids, with the pasteurized juice lower concentration compared to the fresh juice. Regarding the content of vitamin C, ranging 325-530 mg / L, was no significant difference between fresh and pasteurized juices. With regard to the fresh juice flavonoids had higher concentrations of flavanones glycosides, hesperidin is the predominant (2637-3558 mg/L), while the pasteurized juice had higher levels of flavones polymethoxylated, nobiletin having the highest concentration (10.86 to 16 mg/L). The juices showed similar responses from the antioxidant assays, indicating that orange juice, fresh or processed, has an important contribution to the antioxidant diet.

SUMÁRIO

Capítulo I - Revisão Bibliográfica	13
1. INTRODUÇÃO	14
2. OBJETIVOS	14
2.1. Objetivo Geral	14
2.2. Objetivos Específicos	14
3. REVISÃO DA LITERATURA	15
3.1. Suco de Laranja	15
3.2. Compostos bioativos presentes no suco de laranja	16
3.2.1. Vitamina C	16
3.2.2. Compostos fenólicos	17
3.2.3. Flavonóides	18
3.2.4. Carotenóides	20
3.3. Capacidade antioxidante	23
3.4. Determinação da capacidade antioxidante	25
3.4.1. Ensaio MTT	26
3.4.2. Ensaio FRAP	27
3.4.3. Ensaio ORAC	28
4. REFERÊNCIAS	29

Capítulo II - Compostos bioativos e capacidade antioxidante em sucos frescos e comerciais pasteurizados de laranja	37
RESUMO	38
ABSTRACT	39
1. INTRODUÇÃO	40
2. MATERIAIS E MÉTODOS	41
2.1. Amostras	41
2.2. Reagentes e padrões	41
2.3. Determinações físico-químicas	42
2.4. Determinação de compostos bioativos	42
2.4.1. Determinação Vitamina C	42
2.4.2. Determinação de fenólicos totais	42
2.4.3. Determinação de carotenóides totais	42

2.4.4. Identificação e quantificação de flavonóides	43
2.5. Determinação da capacidade antioxidante	43
2.5.1. MTT	43
2.5.2. FRAP	44
2.5.3. ORAC	44
2.6. Análise estatística	45
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
4. CONCLUSÃO	54
5. REFERÊNCIAS	54
 ANEXOS	 61
Anexo 1. Curva de calibração padrão ácido ferúlico para determinação de fenólicos totais	61
Anexo 2. Curva de calibração padrão ácido gálico para determinação de fenólicos totais.....	61
Anexo 3. Curva de calibração padrão narirutina	62
Anexo 4. Curva de calibração padrão naringina	62
Anexo 5. Curva de calibração padrão hesperidina	63
Anexo 6. Curva de calibração padrão sinensetina	63
Anexo 7. Curva de calibração padrão nobiletina	64
Anexo 8. Curva de calibração padrão tangeritina	64
Anexo 9. Cromatograma dos flavonóides principais em suco fresco de laranja Pêra, a 280 e 330 nm	65
Anexo 10. Cromatograma dos flavonóides principais em suco fresco de laranja Lima, a 280 e 330 nm	66
Anexo 11. Cromatograma dos flavonóides principais em suco pasteurizado marca A, a 280 e 330 nm	67
Anexo 12. Cromatograma dos flavonóides principais em suco pasteurizado marca B, a 280 e 330 nm	68
Anexo 13. Curva de calibração padrão ácido ascórbico para ensaio MTT	69
Anexo 14. Curva de calibração padrão ácido ascórbico para ensaio FRAP	69
Anexo 15. Curva de calibração padrão Trolox para ensaio FRAP	70

CAPÍTULO I: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. INTRODUÇÃO

O suco de laranja, o sabor de suco pronto de frutas mais consumido no mundo (CITRUS BR, 2014), é fonte de compostos benéficos à saúde, como vitamina C, flavonóides e carotenóides (LIU, 2013; FRANKE *et al.*, 2005).

A sua forma de consumo mais comum no Brasil é o fresco, extraído em espremedores manuais, muito freqüente em restaurantes e bares, porém, a tecnologia de produção permitiu vantagens na comercialização e consumo do suco, destacando-se o suco integral pasteurizado, que por permitir uma maior praticidade de aquisição e consumo, tem tido um aumento considerável em sua demanda nos últimos anos (NEVES, TROMBIN & KALAKI, 2013).

Muito vem sendo investigado sobre os compostos bioativos presentes no suco de laranja e o seu potencial antioxidante (ESCOBEDO-AVELLANEDA *et al.*, 2014; VELÁZQUEZ-ESTRADA *et al.*, 2013; KELEBEK *et al.*, 2009; XU *et al.*, 2008; SÁNCHEZ-MORENO *et al.*, 2003), e para isso tem sido cada vez mais freqüente a determinação desse potencial baseada em vários ensaios como ABTS, DPPH, FRAP e ORAC (BARRECA *et al.*, 2013; BARROS, FERREIRA & GENOVESE, 2012; FLOEGEL *et al.*, 2011; ZULUETA, ESTEVE & FRÍGOLA, 2009; FIORE *et al.*, 2005), para uma melhor compreensão dos princípios dos antioxidantes da amostra.

Entretanto estimação do potencial antioxidante em sucos fresco e pasteurizado de laranja, disponíveis para consumo no Brasil, pouco foi relatada, além do uso do ensaio MTT para essa finalidade em suco de laranja não ter sido descrito. Sendo assim, os objetivos desse trabalho foram os citados a seguir.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

- Verificar se há diferença no potencial antioxidante e no conteúdo dos compostos bioativos em sucos frescos e pasteurizados de laranja.

2.2. Objetivos específicos

- Determinar conteúdos de vitamina C, fenólicos totais, carotenóides totais e flavonóides (flavanonas glicosiladas e flavonas polimetoxiladas);

- Medir capacidade antioxidante dos sucos através de três diferentes métodos, FRAP, ORAC e MTT;

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. Suco de Laranja

A laranjeira é a árvore frutífera mais conhecida e cultivada no mundo, e seus pomares mais produtivos estão geograficamente localizados em regiões de clima tropical e subtropical, destacando-se o Brasil, Estados Unidos, China, México, Espanha e África do Sul (QUEIROZ & MENEZES, 2005).

Aproximadamente 69 milhões de toneladas de laranja foram produzidas mundialmente em 2012, e destas 26% foi proveniente do Brasil, o maior produtor mundial (FAO, 2014). Segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), a produção de laranja em 2013 no Brasil foi de aproximadamente 17 milhões de toneladas e se aproximou ao produzido no ano anterior, sendo a região Sudeste responsável por 79% de toda a produção, com 92% da região concentrada no estado de São Paulo, o maior produtor nacional, contribuindo com 73%.

Em 2011 no Brasil, 33 mil toneladas de laranja *in natura* e 440 mil toneladas de suco concentrado foram destinadas à exportação (FAO, 2014). Ocorrendo dessa maneira a comercialização internacional do suco concentrado, e maior demanda da fruta *in natura* e suco fresco ao mercado interno, preparado regularmente em casas, bares e restaurantes (NEVES, TROMBIN & KALAKI, 2013), devido à grande disponibilidade da fruta em território nacional a preços acessíveis (PUPIN, DENIS & TOLEDO, 1998).

Porém, o avanço da tecnologia de produção permitiu vantagens na comercialização e consumo do suco de laranja, destacando-se o suco integral pasteurizado, que é submetido a um tratamento térmico para inativação de enzimas e controle microbiológico, garantindo a esse produto maior estabilidade e vida-de-prateleira. A pasteurização é realizada através de troca térmica entre o suco e o vapor d'água, em trocadores tipo placas ou tubulares, a temperatura de 90-95 °C durante 30-60 segundos, após resfriado pode ser embalado em diferentes tipos de embalagem, sendo as mais utilizadas atualmente a cartonada asséptica e garrafas plásticas (QUEIROZ & MENEZES, 2005), que permitem maior praticidade de aquisição, por ter

Assim como ocorre com o suco fresco, a demanda de consumo do suco pasteurizado também vem aumentando (NEVES, TROMBIN & KALAKI, 2013). Em 2013 foram consumidos 200 milhões de litros de suco integral de frutas no Brasil, e destes 60 milhões foram de laranja, com aumento do seu consumo no país nos últimos anos, o sabor laranja é um dos sucos mais consumidos no mundo, com 45% do total de sucos de frutas prontos para beber (CITRUS BR, 2014).

3.2. Compostos bioativos presentes no suco de laranja

Vitamina C em suco de laranja é composta pelo L-ácido ascórbico, forma predominante e biologicamente ativa, e L-desidroascórbico que é inferior a 10% na composição da vitamina (RAPISARDA *et al.*, 2008). Quando oxidado o ácido ascórbico é reversivelmente convertido a desidroascórbico (Figura 1), que também exibe atividade biológica (HERNÁNDEZ, LOBO & GONZÁLEZ, 2006).

L-Ácido ascórbico
 L-Desidroascórbico

A principal fonte de vitamina C na dieta humana são frutas e vegetais, e sua quantidade varia entre cultivares e tecidos, geralmente estando em maior concentração nos tecidos das cascas para proteger o fruto de stress externo causado pela luz e oxidação (LEE & KADER, 2000).

Estudos demonstraram o papel protetor do ácido ascórbico na peroxidação lipídica (FREI *et al.*, 1991; FREI, ENGLAND & AMES, 1989), oxidação do DNA (FRAGA *et al.*, 1991) e na prevenção de complicações cardiovasculares (ASHOR *et al.*, 2014; KOTI *et al.*, 2011; SALONEN *et al.*, 2003), possivelmente por ser um efetivo redutor encerrando reações oxidativas em cadeia (GULÇIN, 2011), diminuindo assim os danos oxidativos causados por radicais livres.

Segundo Tabart *et al.* (2010), o ácido ascórbico foi o composto predominante e responsável por 50% da capacidade antioxidante medida pelo método DPPH em suco de laranja. O mesmo foi constatado por Xu *et al.* (2008), em que o ácido ascórbico foi o principal contribuinte para a capacidade antioxidante total de sucos de Citrus, medida pelo ensaio DPPH e FRAP, tendo o suco de laranja maior atividade antioxidante devido ao seu maior teor de ácido ascórbico. Sánchez-Moreno *et al.* (2003), também avaliaram o conteúdo de compostos bioativos e sua contribuição à atividade antioxidante em sucos de laranja, e perceberam que a vitamina C teve capacidade antioxidante superior a 99%, presente em uma concentração média de 450 mg/L de suco, se assemelhando ao teor encontrado por Xu *et al.* (2008).

3.2.2. Compostos Fenólicos

Os compostos fenólicos são um dos mais importantes e numerosos grupos de metabólitos secundários do reino vegetal, sendo sintetizados pelas plantas durante o desenvolvimento normal e em resposta a diferentes situações de estresse e radiação UV (LIU, 2013). Estas substâncias são obtidas a partir de hidratos de carbono e possuem uma característica estrutural comum: um anel aromático com um ou mais substituintes hidroxilas, e é possível classificá-los com base no número de átomos de carbono constituintes, em conjunto com a estrutura do esqueleto de base fenólica, incluindo, por exemplo, fenóis simples como ácidos fenólicos, cumarinas, e polifenóis como flavonóides e taninos (FERNÁNDEZ *et al.*, 2010).

A ocorrência mais comum de compostos fenólicos em frutas cítricas inclui ácidos fenólicos e flavonóides (STINCO *et al.*, 2013; KELEBEK & SELLI, 2011;

KELEBEK *et al.*, 2009; XU *et al.*, 2008). Os principais ácidos fenólicos são os ácidos hidroxicinâmicos (ácidos ferúlico, caféico, clorogênico, p-cumárico e sinápico), e os hidroxibenzóicos (ácidos gálico, vanílico e p-hidroxibenzóico), totalizando uma concentração de aproximadamente 80 mg/L de suco (KELEBEK & SELLI, 2011). Quanto aos flavonóides ocorrem na forma de flavanonas agliconas e glicosiladas, flavonas polimetoxiladas e flavonóis glicosídeos (ESCOBEDO-AVELLANEDA *et al.*, 2014).

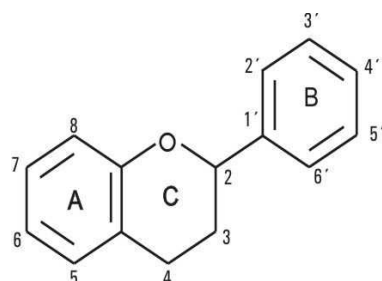
Propriedades benéficas de compostos fenólicos têm sido relatadas, incluindo proteção cancerígena (LIU, 2013; BIRT, HENDRICH & WANG, 2001; KNEKT *et al.*, 1997; SO *et al.*, 1996) e coronária (LIU, 2013), possivelmente conseqüentes de seu potencial antioxidante, devido à presença de hidroxilas ligadas ao anel aromático presente em sua estrutura química (GULÇIN, 2011; HOLLMAN, 2001).

Stella *et al.* (2011) ao avaliarem os compostos fenólicos totais em sucos de laranja industrializados, encontraram um teor de 18 a 54 mg equivalentes em ácido gálico/100 mL, e quanto maior a concentração desses compostos, maior atividade antioxidante foi observada nos sucos.

3.2.3. Flavonóides

Os flavonóides são metabólitos secundários de plantas, definidos quimicamente como substâncias compostas por um núcleo 1,3-difenilpropano, estrutura base dos flavonóides, que consiste de dois anéis aromáticos ligados por uma estrutura de três carbonos (Figura 2), e substituintes em uma ou mais hidroxilas (BIRT, HENDRICH & WANG, 2001).

Figura 2. Estrutura química comum dos flavonóides.



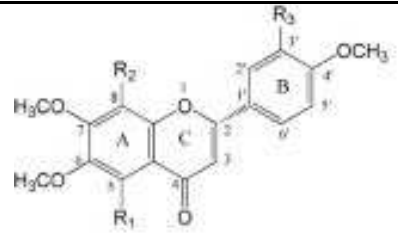
O número e posição dos substituintes hidroxila e metoxila no anel B influenciam a capacidade do flavonóide em doar elétrons, e consequentemente eliminar radicais livres (BARRECA *et al.*, 2013).

Além de atuarem como pigmentos, os flavonóides cítricos possuem propriedades antioxidante (BARRECA *et al.*, 2013; BARROS, FERREIRA, GENOVESE, 2012; YE *et al.*, 2011), anti-inflamatória (WANG; ZHOU; LIN, 2011), anticarcinogênica (ZHANG *et al.*, 2014; WANG; ZHOU; LIN, 2011; PRASAD *et al.*, 2010; WALLE, 2007; MANTHEY & GUTHRIE, 2002), antiúlcera (BIGONIYA & SINGH, 2014), hipolipemiante (KUROWSKA & MANTHEY, 2004), antiaterogênica (MULVIHILL & HUFF, 2012; PARMAR & KAR, 2007), antimicrobiana (BARRECA *et al.*, 2013; ORTUNO *et al.*, 2006), e vêm despertando interesse em várias investigações científicas (GREEN *et al.*, 2013; AVIOR *et al.*, 2013; CHEN *et al.*, 2012; MORAND *et al.*, 2011; KANNAPPAN & ANURADHA, 2010).

Principais flavonóides identificados em suco de laranja são as flavanonas glicosiladas hesperidina, narirutina, naringina e as flavonas polimetoxiladas nobiletina, sinensetina e tangeritina (BAI *et al.*, 2013; STINCO *et al.*, 2013; VELÁZQUEZ-ESTRADA *et al.*, 2013; KELEBEK *et al.*, 2009; PUPIN, DENNIS & TOLEDO, 1998), que estão esquematizados quimicamente na figura 3.

Figura 3. Estrutura química dos principais flavonóides identificados em suco de laranja.

Estrutura química	Flavanonas	R1	R2	R3
	Glicosiladas			
	Hesperidina	Rutinose	OH	OCH3
	Narirutina	Rutinose	H	OH
	Naringina	Neohesperidose	H	OH

Estrutura química	Flavonas	R1	R2	R3
Polimetoxiladas				
	Nobiletina	OCH3	OCH3	OCH3
	Sinensetina	OCH3	H	OCH3
	Tangeritina	OCH3	OCH3	H

De acordo com Arabbi, Genovese e Lajolo (2004) a ingestão de flavonóides pela população brasileira é de em média 86 mg/dia para homens e 79 mg/dia para mulheres, tendo como principal fonte da dieta a laranja.

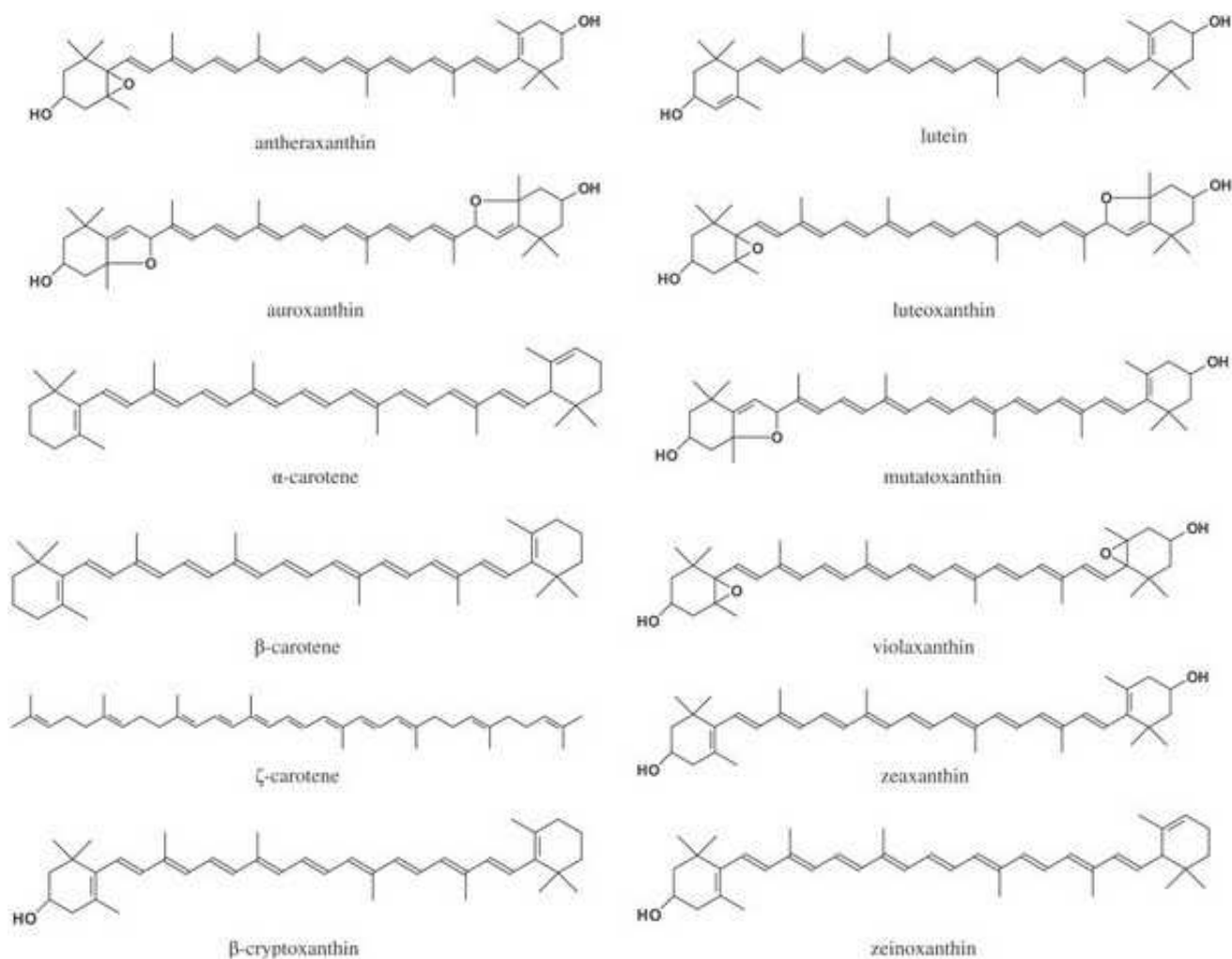
3.2.4. Carotenóides

Os carotenóides são uma classe de pigmentos amplamente distribuídos na natureza, e que conferem a coloração característica da casca e polpa da laranja (Gama e Sylos, 2005). A sua concentração em suco de laranja varia de acordo com a variedade da fruta, mas em geral os predominantes são luteína, β -criptoxantina, violaxantina, zeaxantina, anteraxantina e β -caroteno (WIBOWO *et al.*, 2015; GAMA & SYLOS, 2005; LEE & COATES, 2003; SÁNCHEZ-MORENO *et al.*, 2003).

Possuem grande diversidade estrutural e exercem efeitos benéficos à saúde, como atividade antioxidante, influência na comunicação celular por junções de hialô, efeito protetor na lesão hepática induzida por álcool, potencial fotoprotetor, atividade anticancerígena e prevenção de doenças cardiovasculares (NISHINO *et al.*, 2009; TAPIERO, TOWNSEND & TEW, 2004).

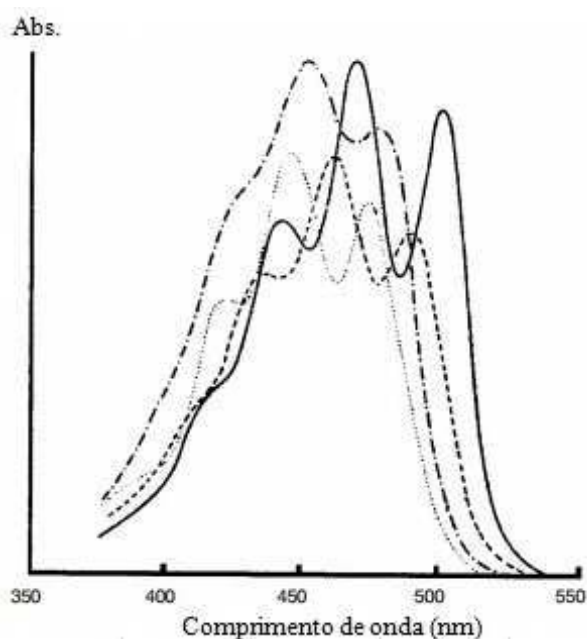
Alguns carotenóides como carotenos (α - β - γ - caroteno) e algumas xantofilas (β -criptoxantina), por possuírem um anel β -ionona em sua estrutura (Figura 4), exercem também a atividade de se converterem à vitamina A, muito necessária para manter a visão e o tecido superficial da pele saudáveis (MELÉNDEZ-MARTÍNEZ, VICARIO & HEREDIA, 2004).

Figura 4. Estrutura química de carotenóides comuns em suco de laranja (Mélendez-Martínez, Vicario & Heredia, 2007).



A série de ligações duplas conjugadas de carbono-carbono são também denominadas como cromóforos, por conferir aos carotenóides sua coloração característica e a propriedade de absorver luz (RODRIGUEZ-AMAYA, 1999). Quando a luz é absorvida, a molécula passa do seu estado normal, com pouca energia, para o estado excitado, rico em energia (SCHOEFS, 2002). Esses estados de energia correspondem às bandas de espectro de absorção, e nos carotenóides há 3 típicas bandas em função dos cromóforos (Figura 5), assim quanto maior o número de ligações duplas, maior o comprimento de onda máximo (RODRIGUEZ-AMAYA, 1999). Modificações nos circuitos dos elétrons nessas ligações duplas acarretam em mudanças nos seus espectros de absorção (Figura 5), o que permite identificar os diferentes carotenóides através de métodos espectrofotométricos (SCHOEFS, 2002).

Figura 5. Espectros de absorção de licopeno (—), γ -caroteno (- - -), α -caroteno (....), e β -caroteno (-.-.-) em éter de petróleo. (RODRIGUEZ-AMAYA, 1999).



Essas ligações duplas, características da estrutura dos carotenóides também contribuem para sua instabilidade, principalmente na presença de oxigênio, luz e calor, por isso autores vêm investigando o efeito do tratamento térmico no seu conteúdo em sucos de laranja pasteurizados. Gama e Sylos (2007) constataram uma composição de carotenóides semelhantes para suco fresco e pasteurizado, mas apesar dos teores individuais terem sido diferentes o conteúdo total entre os sucos não se diferiram significativamente. O contrário foi encontrado por Cortés *et al.* (2006), que observaram uma diminuição significativa de 12% no conteúdo total dos carotenóides, nos sucos pasteurizados, quando comparado ao suco não tratado termicamente.

Lee e Coates (2003) constataram uma perda significativa no teor dos carotenóides 5,6-epóxidos violaxantina e anteraxantina, que foram isomerizados a 5,8-epóxidos luteoxantina e mutatoxantina, tendo esses últimos seus conteúdos aumentados. O mesmo foi observado por Vervoort *et al.* (2011). Já os carotenos com pró-atividade de vitamina A, β -caroteno, α -caroteno e β -criptoxantina, não tiveram mudanças significativas em seus teores após a pasteurização (LEE & COATES, 2003).

3.3. Capacidade antioxidante

Radicais livres são espécies químicas, altamente reativas, que por possuírem um ou mais elétrons desemparelhados, capturam elétrons de outras moléculas, como ácidos nucleicos, proteínas e lipídeos, para estabilizar sua configuração eletrônica (GULÇIN, 2011). Quando presentes em altas concentrações no organismo podem provocar danos oxidativos (LITESCU, EREMIJA & RADU, 2011), resultando em morte celular, e consequente doenças degenerativas como câncer, complicações cardiovasculares, catarata entre outras (LIU & NAIR, 2010).

Para evitar que isso aconteça, os compostos antioxidantes desempenham um importante papel fisiológico de encerrar as reações de oxidação, através da remoção ou neutralização dos radicais livres intermediários, impedindo que reações de oxidação em cadeia aconteçam (LIU & NAIR, 2010).

Espécies reativas de oxigênio (ROS) radicalares, como hidroxila ($\text{HO}\bullet$), superóxido ($\text{O}_2\bullet^-$), peroxila ($\text{ROO}\bullet$), são um tipo de radicais livres, resultantes do metabolismo oxidativo normal do organismo, essencial para a sobrevivência das células (PASCU *et al.*, 2014; BARREIROS, DAVID & DAVID, 2006). Porém em condições de desequilíbrio, com baixos níveis de antioxidantes e elevados de ROS, denominado como stress oxidativo, pode haver danos no DNA e conduzir a mutações, câncer, dentre outras patologias (GULÇIN, 2011).

Quando a quantidade de antioxidantes endógenos não atinge um nível mínimo adequado para evitar essa condição, torna-se necessário a sua obtenção através da dieta. De acordo com Gulçin (2011) os principais antioxidantes da dieta são vitamina C, tocoferóis, carotenóides e flavonóides.

De quinze cultivares de Citrus, dentre eles laranja, toranja, tangerina e limão, investigados por Xu *et al.* (2008), as variedades de laranja foram as que apresentaram maior conteúdo de ácido ascórbico, compostos fenólicos totais, flavanonas glicosiladas e conseqüente capacidade antioxidante. Yang *et al.* (2013) demonstraram a importância do consumo do suco de laranja na promoção da saúde, contribuindo significativamente com o aumento da ingestão de antioxidantes, em relação aos indivíduos que não ingeriram o suco.

Na estimativa da capacidade antioxidante total, feita por Yang *et al.* (2011), suco de laranja foi o terceiro principal contribuinte da dieta, perdendo apenas para chás e suplementos de vitamina C, com resultado de 27 mg equivalentes em vitamina C,

medido pelo ensaio ABTS. Stella *et al.* (2011) também encontraram resultados semelhantes, ao medirem a capacidade antioxidante de sucos de laranja prontos para consumo, que variaram de 7-40 mg/mL equivalente em vitamina C, medido pelo mesmo ensaio.

Pellegrini *et al.* (2003) avaliaram a capacidade antioxidante de diversos vegetais, frutas, óleos e bebidas. De um total de 34 bebidas, dentre elas alcoólicas e não alcoólicas, o suco de laranja foi o que demonstrou maior potencial antioxidante através do método de redução do ferro (FRAP).

Ao investigarem a capacidade antioxidante de polpas e cascas de citrus brasileiros, Barros, Ferreira e Genovese (2012) constataram que o método FRAP demonstrou maior capacidade antioxidante em polpas de laranjas, quando comparado com o método DPPH, além de a capacidade antioxidante observada não ser resultante de um único composto fitoquímico, mas sim de uma correlação tanto com ácido ascórbico quanto com os compostos fenólicos. O que se assemelha ao encontrado por Tounsi *et al.* (2011) em que ácidos fenólicos e vitamina C desempenharam papel importante na capacidade antioxidante de sucos de citrus, dentre eles, limão, tangerina, laranja sanguínea e amarga.

Diferentemente, Seeram *et al.* (2008) que ao medirem o poder antioxidante de suco de laranja, atribuíram essa capacidade somente ao teor de polifenóis.

Em seu estudo, Zulueta, Esteve e Frígola (2009) demonstraram maiores valores de capacidade antioxidante para suco de laranja, medido pelo método ORAC, quando comparado ao ensaio TEAC, que utiliza como radical o ABTS^{•+}. Já Barreca *et al.* (2013), constataram que suco de tangelo, um híbrido de tangerina e toranja, demonstrou maior atividade pelo ensaio de FRAP, seguido pelo ensaio de seqüestro de radicais hidroxilas, ABTS e por último DPPH, tendo a fração de flavonóides grande contribuição nessa atividade antioxidante, sendo a principal responsável no ensaio de eliminação de radicais hidroxilas e ABTS.

Floegel *et al.* (2011) ao investigarem frutas, bebidas e vegetais, observaram uma capacidade antioxidante maior medida pelo método ABTS em relação ao ensaio DPPH. O que corrobora ao encontrado por Fiore *et al.* (2005), ao avaliarem a capacidade antioxidante de sucos de laranja pasteurizado e esterilizado, o ensaio ABTS demonstrou maior resultado em relação ao DPPH.

Considerando que o ensaio ABTS é baseado na formação de um radical aplicável a antioxidantes hidrofílicos e lipofílicos, diferentemente do radical DPPH que é dissolvido em solventes orgânicos, sendo mais aplicáveis em sistemas hidrofóbicos, poderia se justificar essa baixa estimativa antioxidante observada na maioria dos trabalhos que fazem comparação entre os métodos existentes (BARROS, FERREIRA & GENOVESE, 2012; FLOEGEL *et al.*, 2011; FIORE *et al.*, 2005).

As divergências encontradas quanto ao composto bioativo responsável pela capacidade antioxidante do suco de laranja, pode ser devida à diversidade estrutural desses fitoquímicos, sua concentração, e outros fatores como temperatura, luz, tipo de substrato da reação e outros componentes que atuam como pró-oxidantes ou agentes sinérgicos (GULÇIN, 2011), além dos diferentes mecanismos de ação exercidos por eles, como eliminação dos radicais livres, capacidade quelante, neutralização de oxigênio singlete e decomposição de peróxido de hidrogênio (CIZ *et al.*, 2010).

3.4. Determinação da capacidade antioxidante

O método ideal para determinar a capacidade antioxidante deve avaliar os efeitos de um determinado composto em controlar, reduzir ou impedir a oxidação, em condições de reação que mimetizem as encontradas em stress oxidativo (GULÇIN, 2011).

Para isso um processo de oxidação é induzido, submetendo um substrato a um oxidante e um iniciador, e a medição dos produtos intermediários e/ou finais dessa reação é utilizada para determinar a possível atividade antioxidante exercida pelo composto. Como iniciadores pode-se empregar o aumento da temperatura, exposição à luz, agitação para aumentar o contato entre reagentes e fontes de radicais livres, e adição de catalisadores como cobre e ferro, sendo estes metais de transição os iniciadores mais comuns em sistemas biológicos e alimentares (ANTOLOVICH *et al.*, 2002).

Gulçin (2011) descreveu os principais métodos comumente usados, sendo aqueles que medem o poder de redução do antioxidante, como acontece com o FRAP e CUPRAC, que determinam a capacidade de reduzir íons de ferro e cobre, respectivamente, os que medem o consumo de oxigênio durante a reação, como ocorre com ORAC e TRAP, os que eliminam radicais, como ABTS e DPPH, os que medem a capacidade antioxidante total como o Folin-Ciocalteu e o de Tiocianato, tendo ainda os

eliminadores de radicais aniônicos superóxido, óxido nítrico, peróxido de hidrogênio, oxigênio singlete e por fim quelantes de metais.

A ausência de substrato na reação, como ocorre em ensaios com ABTS, são considerados artificiais e não simulam/imitam de forma adequada os processos em sistemas fisiológicos (ANTOLOVICH *et al.*, 2002). O método ABTS é baseado na geração de um radical ABTS $\cdot$ + (ácido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico), com coloração azul-verde e que pode ser reduzido por antioxidantes, e o ensaio de DPPH baseia-se na redução do DPPH (1,1-difenil-2-picril hidrazila), roxo. Ambos os testes são convenientes na sua aplicação e amplamente empregados, no entanto, são limitados por utilizarem radicais não fisiológicos, não podendo dessa maneira, extrapolar os resultados para o sistema biológico (FLOEGEL *et al.*, 2011).

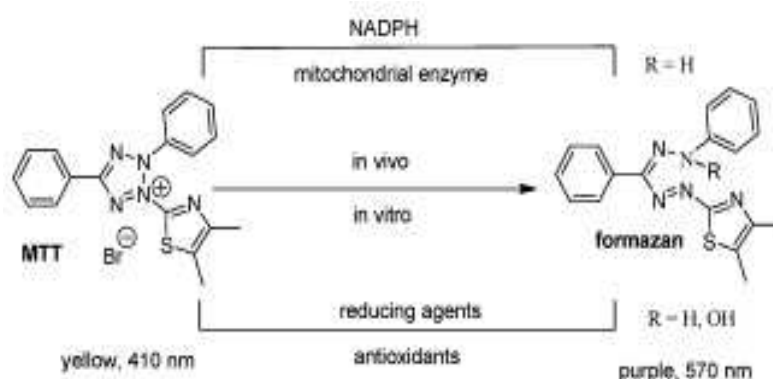
Os métodos podem ser classificados de acordo com o mecanismo de reação: os que são baseados na transferência de elétrons, que medem a capacidade de um antioxidante reduzir um oxidante, o que acontece, por exemplo, no método FRAP; e aqueles baseados na transferência de átomos de hidrogênio, em que há uma competição entre o antioxidante e o substrato por peróxilas gerados termicamente através da decomposição de compostos azos, com a quantificação feita a partir de uma curva cinética, como é o caso do ORAC (HUANG, OU & PRIOR, 2005).

Os ensaios existentes se diferem em relação ao mecanismo e condições das reações, as espécies oxidantes/radicais utilizados e a forma de expressar os resultados (GULÇIN, 2011). Dessa maneira não é recomendado medir a capacidade antioxidante através de um único método, e vem sendo cada vez mais freqüente a determinação baseada em vários ensaios (ALAM, BRISTI & RAFIQUZZAMAN, 2013), para uma melhor compreensão dos princípios dos antioxidantes da amostra (CIZ *et al.*, 2010).

3.4.1. Ensaio MTT

O MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio] é um ensaio colorimétrico estabelecido para medir a atividade de enzimas mitocondriais, com monitoramento da formação de Formazan, de coloração púrpura a 570 nm, formado como produto de redução enzimática do MTT (Figura 6) com coloração amarela a 410 nm (LIU & NAIR, 2010).

Figura 6. Redução do MTT a Formazan (Liu e Nair, 2010).



Este método é amplamente utilizado para determinar a toxicidade celular de compostos naturais e sintéticos (HÜBSCH *et al.*, 2014; AHMADIAN *et al.*, 2009; MAHMOUDI *et al.*, 2009; CETIN & BULLERMAN, 2005), e também foi relatado para avaliar qualitativamente o potencial antioxidante de extratos de plantas (MURAINA, SULEIMAN & ELOFF, 2009). Sendo assim, Liu e Nair (2010) utilizaram estas informações preliminares e refinaram o uso do MTT como uma ferramenta para medir quantitativamente o potencial antioxidante de uma variedade de extratos de produtos naturais e compostos puros.

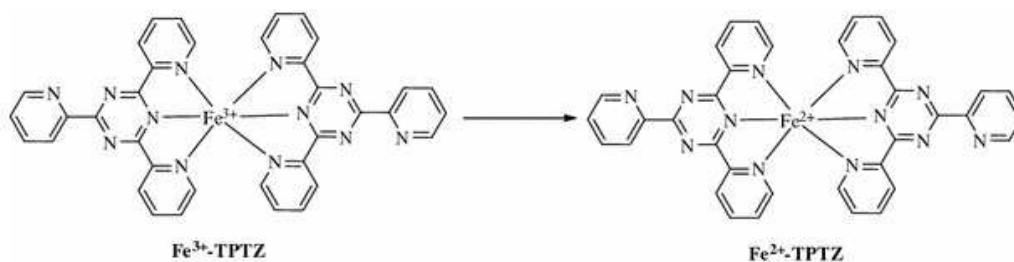
Possui como vantagens ser rápido e pouco dispendioso, pois requer apenas um reagente (MTT) e solventes como água e DMSO (dimetilsulfóxido). O tempo de reação é relativamente curto e a absorbância pode ser lida usando um leitor de placas ou um espectrofotômetro UV-VIS, permitindo a determinação do potencial antioxidante de um grande número de amostras (LIU & NAIR, 2010). Além de poder mimetizar o sistema biológico, por ser reduzido por enzimas.

3.4.2. Ensaio FRAP

O ensaio “Habilidade do plasma em reduzir o ferro” (FRAP) foi desenvolvido por Benzie e Strain (1996) para determinar o poder antioxidante do plasma de humanos através do mecanismo de redução do ferro, já que importantes espécies reativas biológicas (oxidantes) são inativadas por agentes redutores, que é o que ocorre nas denominadas reações de oxirredução.

Os antioxidantes presentes na amostra reduzem o complexo $[\text{Fe}^{3+}-(\text{TPTZ})_2]^{3+}$ a $[\text{Fe}^{2+}-(\text{TPTZ})_2]^{2+}$ (Figura 7), causando alteração de cor na reação. Essa alteração é determinada pelo aumento da absorbância e é proporcional à concentração de antioxidantes obtendo-se uma curva linear, quando a mudança de cor pára é atingido o ponto final da reação (HUANG, OU & PRIOR, 2005).

Figura 7. Reação de redução para ensaio FRAP (GULÇIN, 2011).



Resultados tem sido expressos em μmol equivalentes de ferro (SEERAM *et al.*, 2008; PELLEGRINI *et al.*, 2003) ou trolox (BARROS, FERREIRA & GENOVESE, 2012).

3.4.3. Ensaio ORAC

Ensaio ORAC (Capacidade de Absorção de Radical Oxigênio) mede a diminuição da fluorescência, de uma sonda fluorescente, como resultado da perda de sua conformação quando sofre danos oxidativos, causados por uma fonte de radicais peroxilas (ZULUETA, ESTEVE & FRÍGOLA, 2009).

A reação é baseada na transferência de átomos de hidrogênio, e para que ela aconteça são necessários um iniciador de radical azo, normalmente AAPH (2,2'- Azobis (2-metilpropionamidin) dihidroclorido), uma sonda molecular de UV ou fluorescência, como β -ficoeritrina e fluoresceína, para monitoração do progresso da reação, o antioxidante, e parâmetros cinéticos de reação para quantificar a capacidade antioxidante (HUANG, OU & PRIOR, 2005).

Fluoresceína (FL) (3', 6'-dihydroxyspiro [isobenzofurano-1 [3 H], 9 '[9 H]-xanten]-3-ona) uma sonda sintética não protéica, proposta por Ou, Hampsch-Woodill, e Prior (2001), supera as limitações de inconstância entre lotes, instabilidade à luz e interações com polifenóis da β -ficoeritrina (B-PE), uma proteína fluorescente que era utilizada na primeira versão do método desenvolvido por Cao, Alessio e Cutler (1993).

4. REFERÊNCIAS

- AHMADIAN, S.; BARAR, J.; SAEI, A. A.; FAKHREE, M. A. A.; OMIDI, Y. Cellular Toxicity of Nanogenomedicine in MCF-7 Cell Line: MTT assay. **Journal of Visualized Experiments**, v. 26, p. 1191, 2009.
- ALAM, M. N.; BRISTI, N. J.; RAFIQUZZAMAN, M. Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 21, n. 2, p. 143–152, 2013.
- ANTOLOVICH, M.; PRENZLER, P. D.; PATSALIDES, E.; MCDONALD, S.; ROBARDS, K.; Methods for testing antioxidant activity. **The Analyst**, v.127, n. 1, p.183-198, 2002.
- ARABBI, P. R.; GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. Flavonoids in Vegetable Foods Commonly Consumed in Brazil and Estimated Ingestion by the Brazilian Population. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 5, p. 1124–1131, 2004.
- ASHOR, A. W.; LARA, J.; MATHERS, J. C.; SIERVO, M. Effect of vitamin C on endothelial function in health and disease: A systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. **Atherosclerosis**, v. 235, n. 1, p. 9–20, 2014.
- AVIOR, Y.; BOMZE, D.; RAMON, O.; NAHMIAS, Y. Flavonoids as dietary regulators of nuclear receptor activity. **Food Functional**, v. 4, p. 831–844, 2013.
- BAI, J.; MANTHEY, J. A.; FORD, B. L.; LUZIO, G.; CAMERON, R. G.; NARCISO, J.; BALDWIN, E. A. Effect of extraction, pasteurization and cold storage on flavonoids and other secondary metabolites in fresh orange juice. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 93, n. 11, p. 2771–2781, 2013.
- BARRECA, D.; BISIGNANO, C.; GINESTRA, G.; BISIGNANO, G.; BELLOCCO, E.; LEUZZI, U.; GATTUSO, G. Polymethoxylated, C- and O-glycosyl flavonoids in tangelo (*Citrus reticulata* × *Citrus paradisi*) juice and their influence on antioxidant properties. **Food chemistry**, v. 141, n. 2, p. 1481 -1488, 2013.
- BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Oxidative stress: relations between the formation of reactive species and the organism's defense. **Química Nova**, vol. 29, n.1, p. 113-123, 2006.
- BARROS, H. R. M.; FERREIRA, T. A. P. C.; GENOVESE, M. I. Antioxidant capacity and mineral content of pulp and peel from commercial cultivars of citrus from Brazil. **Food Chemistry**, v. 134, n. 4, p. 1892–1898, 2012.
- BENZI, I. F. F.; STRAIN, J. J. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. **Analytical Biochemistry**, v. 239, p. 70–76, 1996.

BIGONIYA, P.; SINGH, K. Ulcer protective potential of standardized hesperidin, a citrus flavonoid isolated from *Citrus sinensis*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 24, n. 3, p. 330–340, 2014.

BIRT, D. F.; HENDRICH, S.; WANG, W. Dietary agents in cancer prevention: flavonoids and isoflavonoids. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 90, p. 157-177, 2001.

CAO, G.; ALESSIO, H. M.; CUTLER, R. G. Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants. **Free Radical and Biology Medicine**, v. 14, p. 303–31, 1993.

CETIN, Y.; BULLERMAN, L. B. Evaluation of Reduced Toxicity of Zearalenone by Extrusion Processing As Measured by the MTT Cell Proliferation Assay. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 16, p. 6558–6563, 2005.

CHEN, Z. T.; CHU, H. L.; CHYAU, C. C.; CHUD, C. C.; DUH, P. D. Protective effects of sweet orange (*Citrus sinensis*) peel and their bioactive compounds on oxidative stress. **Food Chemistry**, v. 135, n. 4, p. 2119–2127, 2012.

CITRUS BR. Associação Nacional dos Exportadores de sucos cítricos. [Internet], Brasil. Disponível em: < <http://www.citrusbr.com.br> >. Acessado em: 05/08/2014.

CIZ, M.; CIZOVA, H.; DENEVE, P.; KRATCHANOVA, M.; SLAVOV, A.; LOJEK, A. Different methods for control and comparison of the antioxidant properties of vegetables. **Food Control**, v. 21, n. 4, p.518-523, 2010.

CORTÉS, C.; TORREGROSA, F.; ESTEVE, M. J.; FRÍGOLA, A. Carotenoid Profile Modification during Refrigerated Storage in Untreated and Pasteurized Orange Juice and Orange Juice Treated with High-Intensity Pulsed Electric Fields. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 17, p. 6247–6254, 2006.

ESCOBEDO-AVELLANEDA, Z.; GUTIÉRREZ-URIBE, J.; VALDEZ-FRAGOSO, A.; TORRES, J. A.; WELTI-CHANGES, J. Phytochemicals and antioxidant activity of juice, flavedo, albedo and comminuted orange. **Journal of Functional Foods**, v. 6, n. 1, p. 470–481, 2014.

FAO-FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. Statistics Divisions Disponível em: <<http://faostat3.fao.org/faostat-gateway/go/to/download/T/TP/E>>. Acessado em: 22/07/2014.

FERNANDEZ, H. E.; ROMERO, M. G.; PANCORBO, A. C.; GUTIERREZ, A. F. Application and potential of capillary electroseparation methods to determine antioxidant phenolic compounds from plant food material. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 53, n. 5, p.1130-1160, 2010.

IORE, A.; FAUCI, L. L.; CERVELLATI, R.; GUERRA, M. C.; SPERONI, E.; COSTA, S.; GALVANO, G.; LORENZO, A. D.; BACCHELLI, V.; FOGLIANO, V.; GALVANO, F. Antioxidant activity of pasteurized and sterilized commercial red

orange juices. **Molecular Nutrition & Food Research**, vol.49, n. 12, p.1129-1135, 2005.

FLOEGEL, A.; KIM, D. O.; CHUNG, S. J.; KOO, S. I.; CHUN, O. K. Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.24, n.7, p.1043-1048, 2011

FRAGA, C. G.; MOTCHNIK, P. A.; SHIGENAGA, M. K.; HELBOCK, H. J.; JACOB, R. A.; AMES, B. N. Ascorbic acid protects against endogenous oxidative DNA damage in human sperm. **Proceedings of the National Academy Sciences of USA**, v. 88, p. 11003-11006, 1991.

FRANKE, A. A.; COONEY, R. V.; HENNING, S. M. CUSTER, L. J. Bioavailability and antioxidant effects of orange juice components in humans. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53, n.13, p.5170-5178, 2005.

FREI, B.; ENGLAND, L.; AMES, B. N. Ascorbate is an outstanding antioxidant in human blood plasma. **Proceedings of the National Academy Sciences of USA**, v. 86, p. 6377–6381, 1989.

FREI, B.; FORTE, T. M.; AMES, B. N.; CROSS, C. E. Gas phase oxidants of cigarette smoke induce lipid peroxidation and changes in lipoprotein properties in human blood plasma. **Biochemical Journal**, v. 277, p. 133-138, 1991.

GAMA, J. J. T.; SYLOS, C. M. Effect of thermal pasteurization and concentration on carotenoid composition of Brazilian Valencia orange juice. **Food Chemistry**, v. 100, n. 4, p. 1686–1690, 2007.

GAMA, J. J. T.; SYLOS, C. M. Major carotenoid composition of Brazilian Valencia orange juice: Identification and quantification by HPLC. **Food Research International**, v. 38, n. 8-9, p.899-903, 2005.

GREEN, C. O.; WHEATLEY, A. O.; MCGROWDER, D. A.; DILWORTH, L. L.; ASEMOTA, H. N. Citrus peel polymethoxylated flavones extract modulates liver and heart function parameters in diet induced hypercholesterolemic rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 51, p. 306–309, 2013.

GULÇIN, I. Antioxidant activity of food constituents: an overview. **Archives of Toxicology**, v. 86, n. 3, p.345-391, 2011.

HERNÁNDEZ, Y.; LOBO, M. G.; GONZÁLEZ, M. Determination of vitamin C in tropical fruits: A comparative evaluation of methods. **Food Chemistry**, v. 96, n. 4, p. 654–664, 2006.

HOLLMAN, P. C. H. Evidence for health benefits of plant phenols: local or systemic effects?. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 81, n. 9, p. 842–852, 2001.

HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R. L. The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 6, p. 1841-1856, 2005.

HÜBSCH, Z.; VAN ZIL, R. L.; COCK, I. E.; VAN VUUREN, S. F. Interactive antimicrobial and toxicity profiles of conventional antimicrobials with Southern African medicinal plants. **South African Journal of Botany**, v. 93, p. 185–197, 2014.

IBGE-INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Estatística da produção agrícola. Disponível em: <[ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Agricola/Levantamento_Sistematico_da_Producao_Agricola_\[mensal\]/Fasciculo/lspa_201405.pdf](ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Agricola/Levantamento_Sistematico_da_Producao_Agricola_[mensal]/Fasciculo/lspa_201405.pdf)>. Acessado em: 22/07/2014.

KANNAPPAN, S.; ANURADHA, C. V. Naringenin enhances insulin-stimulated tyrosine phosphorylation and improves the cellular actions of insulin in a dietary model of metabolic syndrome. **European Journal of Nutrition**, v. 49, n. 2, p. 101 -109, 2010.

KELEBEK, H.; SELLI, S. Determination of volatile, phenolic, organic acid and sugar components in a Turkish cv. Dortyol (Citrus sinensis L. Osbeck) orange juice. **Journal of the science of food and agriculture**, v. 91, n. 10, p.1855-62, 2011.

KELEBEK, H.; SELLI, S.; CANBAS, A.; CABAROGLU, T. HPLC determination of organic acids, sugars, phenolic compositions and antioxidant capacity of orange juice and orange wine made from a Turkish cv. Kozan. **Microchemical Journal**, v. 91, n. 2, p. 187–192, 2009.

KNEKT, P.; JÄRVINEN, R.; SEPPÄNEN, R.; HELIÖVAARA, M.; TEPPÖ, L.; PUKKALA, E.; AROMAA, A. Dietary flavonoids and the risk of lung cancer and other malignant neoplasms. **American Journal of Epidemiology**, v. 146, n. 3, p. 223-230, 1997.

KOTI, B.; MANJULA, D.; RONAD, P. M.; SWAMY, A. H. M. V.; THIPPESWAMY, A. H. M.; WANGIKAR, U. Cardioprotective effect of ascorbic acid on doxorubicin-induced myocardial toxicity in rats. **Indian Journal of Pharmacology**, v. 43, n. 5, p. 507, 2011.

KUROWSKA, E. M.; MANTHEY, J. A. Hypolipidemic Effects and Absorption of Citrus Polymethoxylated Flavones in Hamsters with Diet-Induced Hypercholesterolemia. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 10, p. 2879–2886, 2004.

LEE, H. S.; COATES, G. A. Effect of thermal pasteurization on Valencia orange juice color and pigments. **LWT - Food Science and Technology**, v. 36, n. 1, p. 153–156, 2003.

LEE, S. K.; KADER, A. A. Preharvest and postharvest factors influencing vitamin C content of horticultural crops. **Postharvest Biology and Technology**, v. 20, p. 207–220, 2000.

LITESCU, S. C.; EREMIA, S.; RADU, G. L. Methods for the Determination of Antioxidant Capacity in Food and Raw Materials. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 698, p. 241-249, 2011.

LIU, R. H. Dietary Bioactive Compounds and Their Health Implications. **Journal of Food Science**, v. 78, n. s1, p. A18–A25, 2013.

LIU, Y.; NAIR, M. G. An Efficient and Economical MTT Assay for Determining the Antioxidant Activity of Plant Natural Product Extracts and Pure Compounds. **Journal of Natural Products**, v.73, p. 1193–1195, 2010.

MAHMOUDI, M.; SIMCHI, A.; MILANI, A. S.; STROEVE, P. Cell toxicity of superparamagnetic iron oxide nanoparticles. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 336, n. 2, p. 510–518, 2009.

MANTHEY, J. A.; GUTHRIE, N. Antiproliferative Activities of Citrus Flavonoids against Six Human Cancer Cell Lines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 21, p. 5837–5843, 2002.

MELÉNDEZ-MARTÍNEZ, A. J.; VICARIO, I. M.; HEREDIA, F. J. Importancia nutricional de los pigmentos carotenoides. **Archivos latinoamericanos de nutrición**, v. 54, n. 2, p. 149 -54, 2004.

MELÉNDEZ-MARTÍNEZ, A. J.; VICARIO, I. M.; HEREDIA, F. J. Review: Analysis of carotenoids in orange juice. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 20, n. 7, p. 638–649, 2007.

MORAND, C.; DUBRAY, C.; MILENKOVIC, D.; LIOGER, D.; MARTIN, J. F.; SCALBERT, A.; MAZUR, A. Hesperidin contributes to the vascular protective effects of orange juice: a randomized crossover study in healthy volunteers. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 93, n. 1, p. 73-80, 2011.

MURAINA, I. A.; SULEIMAN, M. M.; ELOFF, J. N. Can MTT be used to quantify the antioxidant activity of plant extracts?. **Phytomedicine**, v. 16, n. 6–7, p. 665–668, 2009.

MULVIHILL, E. E.; HUFF, M. W. Protection from Metabolic Dysregulation, Obesity, and Atherosclerosis by Citrus Flavonoids: Activation of Hepatic PGC1 α -Mediated Fatty Acid Oxidation. **PPAR Res.**, v. 2012, 2012.

NEVES, M. F.; TROMBIN, V. G.; KALAKI, R. B. Competitiveness of the Orange Juice Chain in Brazil. **International Food and Agribusiness Management Review**, v. 16, Special Issue 4, 2013.

NISHINO, H.; MURAKOSHI, M.; TOKUDA, H.; SATOMI, Y. Cancer prevention by carotenoids. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 483, n. 2, p. 165–168, 2009.

ORTUNO et al. *Citrus paradisi* and *Citrus sinensis* flavonoids: Their influence in the defence mechanism against *Penicillium digitatum*. **Food Chemistry**, v. 98, p. 351–358, 2006.

OU, B.; HAMPSCH-WOODILL, M.; PRIOR, R. L. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 4619–4626, 2001.

PARMAR, H. S.; KAR, A. Protective role of *Citrus sinensis*, *Musa paradisiaca*, and *Punica granatum* peels against diet-induced atherosclerosis and thyroid dysfunctions in rats. **Nutrition Research**, v. 27, n. 11, p. 710–718, 2007.

PASCU, M.; PASCU, D. E.; TRAISTARU, G. A.; NECHIFOR, A. C.; BUNACIU, A. A.; ABOUL-ENEIN, H. Y. Different spectrophotometric methods for antioxidant activity assay of four Romanian herbs. **Journal of the Iranian Chemical Society**, v. 11, n. 2, p.315-321, 2014.

PRASAD, S.; PHROMNOI, K.; YADAV, V. R.; CHATURVEDI, M. M.; AGGARWAL, B. B. Targeting Inflammatory Pathways by Flavonoids for Prevention and Treatment of Cancer. **Planta Medica**, v. 76, n. 11, p. 1044-1063, 2010.

PELLEGRINI, N.; SERAFINI, M.; COLOMBI, B.; DEL RIO, D.; SALVATORE, S.; BIANCHI, M.; BRIGHENTI, F. Total Antioxidant Capacity of Plant Foods, Beverages and Oils Consumed in Italy Assessed by Three Different In Vitro Assays. **The Journal of Nutrition**, v. 133, n. 9 2812-2819, 2003.

PUPIN, A. M.; DENNIS, M. J.; TOLEDO, M. C. F. Polymethoxylated flavones in Brazilian orange juice. **Food Chemistry**, v. 63, n. 4, p. 513–518, 1998.

QUEIROZ, E.C.; MENEZES, H. C. **Suco de laranja**. In: FILHO, W. G. V. (Coord.). **Tecnologia de bebidas**. Botucatu: Edgar Blucher, 2005, p. 221-254.

RAPISARDA, P.; BIANCO, M. L.; PANNUZZO, P.; TIMPANARO, N. Effect of cold storage on vitamin C, phenolics and antioxidant activity of five orange genotypes [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck]. **Postharvest Biology and Technology**, v. 49, p. 348–354, 2008.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. **A guide to carotenoid analysis in foods**. Washington, ILSI Press: 1999, 64 p.

SALONEN, R.M.; NYSSÖNEN, K.; KAIKKONEN, J.; PORKKALA-SARATAHO, E.; VOUTILAINEN, S.; RISSANEN, T. H.; TUOMAINEN, T. P.; VALKONEN, V. P.; RISTONMAA, U.; LAKKA, H.M.; VANHARANTA, M.; SALONEN, J. T.; POULSEN, H. E. Six-year effect of combined vitamin C and E supplementation on atherosclerotic progression: The Antioxidant Supplementation in Atherosclerosis Prevention (ASAP) study. **Circulation**, v. 107, p. 947–953, 2003.

SÁNCHEZ-MORENO, C.; PLAZA, L.; DE ANCOS, B.; CANO, M. P. Quantitative bioactive compounds assessment and their relative contribution to the antioxidant capacity of commercial orange juices. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 83, n. 5, p.430-439, 2003.

SCHOEFS, B. Chlorophyll and carotenoid analysis in food products. Properties of the pigments and methods of analysis. **Trends in Food Science & Technology**, v. 13, n. 11, p. 361–371, 2002.

SEERAM, N., P.; AVIRAM, M.; ZHANG, Y.; HENNING, S. M.; FENG, L.; DREHER, M.; HEBER, D. Comparison of antioxidant potency of commonly consumed polyphenol-rich beverages in the United States. **Journal of agricultural and food chemistry**, vol.56, n. 4, p.1415-22, 2008.

SO, F. V.; GUTHRIE, N.; CHAMBERS, A. F.; MOUSSA, M.; CARROLL, K. K. Inhibition of human breast cancer cell proliferation and delay of mammary tumorigenesis by flavonoids and citrus juices. **Nutrition and Cancer**, v. 26, p. 167-181, 1996.

STELLA, S. P.; FERRAREZI, A. C.; SANTOS, K. O.; MONTEIRO, M. Antioxidant activity of commercial ready-to-drink orange juice and nectar. **Journal of Food Science**, v. 76, n. 3, p.C392-C397, 2011.

STINCO, C. M.; FERNÁNDEZ-VÁZQUEZ, R.; HERNANZ, D.; HEREDIA, F. J.; MELÉNDEZ-MARTÍNEZ, A. J.; VICARIO, I. M. Industrial orange juice debittering: Impact on bioactive compounds and nutritional value. **Journal of Food Engineering**, v. 116, n. 1, p.155-161, 2013.

TABART, J.; KEVERS, C.; PINCEMAIL, J.; DEFRAIGNE, J. O.; DOMMES, J. Evaluation of spectrophotometric methods for antioxidant compound measurement in relation to total antioxidant capacity in beverages. **Food Chemistry**, v. 120, n. 2, p. 607–614, 2010.

TAPIERO, H.; TOWNSEND, D. M.; TEW, K. D. The role of carotenoids in the prevention of human pathologies. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 58, p. 100–110, 2004.

TOUNSI, M. S.; WANNES, W. A.; OUERGHEMMI, I.; JEGHAM, S.; NJIMA, Y. B.; HAMDAOUI, G.; ZEMNI, H.; MARZOUK, B. Juice components and antioxidant capacity of four Tunisian Citrus varieties. **Journal Of The Science Of Food And Agriculture**, vol. 91, n. 1, p.142-151, 2011.

VELÁZQUEZ-ESTRADA, R. M.; HERNÁNDEZ-HERRERO, M. M.; RUFER, C. E.; GUAMIS-LÓPEZ, B.; ROIG-SAGUÉS, A. X. Influence of ultra high pressure homogenization processing on bioactive compounds and antioxidant activity of orange juice. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 18, p. 89–94, 2013.

VERVOORT, L.; VAN DER PLANCKEN, I.; GRAUWET, T.; TIMMERMANS, R. A. H.; MASTWIJK, H. C.; MATSER, A. M.; HENDRICKX, M. E.; VAN LOEY, A. Comparing equivalent thermal, high pressure and pulsed electric field processes for mild pasteurization of orange juice: Part II: Impact on specific chemical and biochemical quality parameters. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 12, n. 4, p. 466–477, 2011.

WALLE, T. Methoxylated flavones, a superior cancer chemopreventive flavonoid subclass?. **Seminars in Cancer Biology**, v. 17, n. 5, p. 354–362, 2007.

WANG, A. Y.; ZHOU, M. Y.; LIN, W. C. Antioxidative and anti-inflammatory properties of *Citrus sulcata* extracts. **Food Chemistry**, v. 124, n. 3, p. 958–963, 2011.

WIBOWO, S.; VERVOORT, L.; TOMIC, J.; SANTIAGO, J. S.; LEMMENS, L.; PANOZZO, A.; GRAUWET, T.; HENDRICKX, M.; LOEY, A. V. Colour and carotenoid changes of pasteurised orange juice during storage. **Food Chemistry**, v. 171, p. 330–340, 2015.

XU, G.; LIU, D.; CHEN, J.; YE, X.; MA, Y.; SHI, J. Juice components and antioxidant capacity of citrus varieties cultivated in China. **Food Chemistry**, v.106, n.2, p.545-551, 2008.

YANG, M.; CHUNG, S. J.; CHUNG, C. E.; KIM, D. O.; SONG, W. O.; KOO, S. I.; CHUN, O. K. Estimation of total antioxidant capacity from diet and supplements in US adults. **British Journal of Nutrition**, v. 106, n. 2, p. 254-263, 2011.

YANG, M.; LEE, S. G.; WANG, Y.; LLOYD, B.; CHUNG, S. J.; SONG, W. O.; CHUN, O. K. Orange Juice, a Marker of Diet Quality, Contributes to Essential Micronutrient and Antioxidant Intakes in the United States Population. **Journal of Nutrition Education and Behavior**, v. 45, n. 4, p.340-348, 2013.

YE, X. Q.; CHEN, J. C.; LIU, D. H.; JIANG, P.; SHI, J.; XUE, S.; WU, D.; XU, J. G.; KAKUDA, Y. Identification of bioactive composition and antioxidant activity in young mandarin fruits. **Food Chemistry**, v. 124, n. 4, p. 1561–1566, 2011.

ZHANG, J.; WU, Y.; ZHAO, X.; LUO, F.; LI, X.; ZHU, H.; SUN, C.; CHEN, K. Chemopreventive effect of flavonoids from Ougan (*Citrus reticulata* cv. Suavissima) fruit against cancer cell proliferation and migration. **Journal of Functional Foods**, v. 10, p. 511–519, 2014.

ZULUETA, A.; ESTEVE, M. J.; FRÍGOLA, A. ORAC and TEAC assays comparison to measure the antioxidant capacity of food products. **Food Chemistry**, vol.114, n. 1, p.310-316, 2009.

**CAPÍTULO II: COMPOSTOS BIOATIVOS E CAPACIDADE
ANTIOXIDANTE EM SUCOS FRESCOS E COMERCIAIS
PASTEURIZADOS DE LARANJA**

RESUMO

Sucos frescos e pasteurizados de laranja foram analisados para verificar se seus compostos bioativos e potencial antioxidante se diferenciavam. Foram determinados seus teores de vitamina C, compostos fenólicos totais, carotenóides totais, flavanonas glicosiladas (narirutina, naringina e hesperidina), flavonas polimetoxiladas (sinensetina, nobiletina e tangeritina), e capacidade antioxidante por três diferentes ensaios, FRAP, ORAC e MTT. Sucos frescos tiveram concentração significativamente maior de fenólicos e carotenóides totais, indicando que o processo de pasteurização pode ter influenciado em seus conteúdos. Quanto ao teor de vitamina C não houve diferença significativa entre os sucos frescos e pasteurizados, variando de 325 a 530 mg/L. Quanto aos flavonóides os sucos frescos tiveram maiores concentrações de flavanonas glicosiladas, sendo a hesperidina a predominante (2637-3558 mg/L), enquanto os sucos pasteurizados tiveram maiores níveis de flavonas polimetoxiladas, tendo a nobiletina as maiores concentrações (10,86-16 mg/L). Os sucos demonstraram respostas semelhantes dentre os ensaios antioxidantes, e com maior potencial quando comparado ao suco de outras frutas, indicando que suco de laranja, fresco ou processado, tem uma importante contribuição antioxidante para a dieta.

ABSTRACT

Fresh juices and orange pasteurized were analyzed to see if their bioactive compounds and antioxidant potential differed. Were determined their vitamin C content, total phenolic compounds, total carotenoids, flavanones glycosides (narirutin, naringin and hesperidin), flavones polymethoxylated (sinensetin, nobiletin and tangeritin), and antioxidant capacity of three different tests, FRAP, ORAC and MTT. Fresh juice had significantly higher concentrations of phenolics and carotenoids, indicating that pasteurization may have influenced its content. As for the vitamin C content was no significant difference between fresh and pasteurized juices, ranging 325-530 mg/L. With regard to the fresh juice flavonoids had higher concentrations of flavanones glycosides, hesperidin is the predominant (2637-3558 mg/L), while the pasteurized juice had higher levels of flavones polymethoxylated, nobiletin having the highest concentration (10.86 to 16 mg/L). The juices showed similar responses from the antioxidant assays and greater potential compared to other fruit juice, indicating that orange juice, fresh or processed, has an important contribution antioxidant to the diet.

1. INTRODUÇÃO

O stress oxidativo, causado pelo desequilíbrio entre os níveis endógenos de antioxidantes e radicais livres, desencadeia um processo inflamatório crônico no organismo, que por sua vez acarreta em várias patologias, dentre elas asma (ZANATTA, MICHELOTTO JUNIOR & NISHIYAMA, 2012), diabetes, doenças cardiovasculares e câncer (MARNETT, 2012).

O Brasil é um dos principais produtores mundiais de suco de laranja, que tem demonstrado relevante capacidade antioxidante devido aos seus compostos bioativos como vitamina C, ácidos fenólicos, flavonóides e carotenóides, que isoladamente também demonstraram efeitos benéficos como proteção na oxidação do DNA, na carcinogênese, na degeneração macular relacionada à idade, na peroxidação lipídica, prevenção de complicações cardiovasculares, ação anti-inflamatória, anti-úlceras e hipolipemiante (FRAGA *et al.*, 1991; ZHANG, 2014; SANGIOVANNI *et al.*, 2007; FREI *et al.*, 1991; MULVIHILL & HUFF, 2012; WANG, ZHOU & LIN, 2011; BIGONIYA & SINGH, 2014; KUROWSKA & MANTHEY, 2004).

A importância do consumo de suco de laranja na promoção da saúde (FOROUDI *et al.*, 2014; APTEKMANN & CESAR, 2013; YANG *et al.*, 2013; O'NEIL *et al.*, 2012; MORAND *et al.*, 2011; GHANIM *et al.*, 2010) e seu papel antioxidante (FOROUDI *et al.*, 2014; YANG *et al.*, 2011; NASSER *et al.*, 2011; PELLEGRINI *et al.*, 2003; SÁNCHEZ-MORENO *et al.*, 2003a) vêm sendo relatada na literatura, mas há poucos estudos sobre estimativa do potencial antioxidante em sucos frescos e pasteurizados de laranja, que são as principais formas disponíveis para consumo no Brasil.

A capacidade antioxidante de suco de laranja tem sido determinada por mais de um ensaio (BARRECA *et al.*, 2013; VELÁZQUEZ-ESTRADA *et al.*, 2013; BARROS, FERREIRA & GENOVESE, 2012; KLIMCZAK *et al.*, 2007; FIORE *et al.*, 2005), para uma melhor compreensão dos princípios dos antioxidantes presentes no suco. Recentemente foi relatada a possibilidade do uso do método colorimétrico MTT, amplamente aplicado em ensaios de toxicidade celular, para se determinar atividade antioxidante de compostos puros e extratos de plantas (LUI & NAIR, 2010).

Sendo assim, o objetivo desse trabalho foi verificar se há diferença no conteúdo dos compostos bioativos e capacidade antioxidante em dois tipos de sucos de laranja,

fresco e pasteurizado, determinando essa capacidade antioxidante por três diferentes métodos, FRAP, ORAC e MTT.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Amostras

As amostras consistiram de sucos integrais de laranja, sem adição de água, açúcares e conservantes. Para isso sucos comerciais pasteurizados de duas diferentes marcas, e laranjas das principais variedades (Pera e Lima) disponíveis no varejo do município de Araraquara (SP, Brasil), foram adquiridos. Para obtenção dos sucos frescos, as laranjas com as sementes retiradas foram espremidas manualmente em extrator Skymssen® (Brusque, SC, Brasil). Três lotes de cada tipo de suco foram analisados.

Imediatamente após a extração dos sucos frescos, e abertura da embalagem dos sucos pasteurizados, foram determinados o conteúdo de vitamina C e características físico-químicas. Os sucos foram mantidos a temperatura -20 °C, até o término das demais análises.

2.2. Reagentes e padrões

Acetonitrila e metanol grau-HPLC foram adquiridos de J. T. Baker (México); ácido ferúlico, [3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] (MTT), 6-hidroxi-2-ácido carboxílico-2 ,5,7,8-tetrametilcromano (Trolox), 2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ), 2,2-Azobis(2-metilpropionamidina) dihidroclorida (AAPH), naringina e hesperidina foram da Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, Missouri, EUA); narirutina, sinensetina, nobiletina e tangeritina foram de Chromadex (Irvine, CA, EUA); ácido ascórbico, ácido oxálico, acetato de sódio, carbonato de sódio, dimetilsulfóxido (DMSO), dimetilformamida (DMF), éter de petróleo e metanol foram da Synth (Diadema, SP, Brasil); diclorofenol-2,6-indofenol, cloreto de ferro III, hidróxido de sódio e ácido acético foram obtidos da Vetec (RJ, Brasil); ácido clorídrico e fosfato de potássio foram da Qhemis (SP, Brasil); reagente Folin-Ciocalteu de Dinâmica (SP, Brasil); ácido gálico foi obtido de Mallinckrodt Chemicals (Phillipsburg, NJ, EUA); e fluoresceína de Acros Organics (Nova Jersey, EUA).

2.3. Determinações físico-químicas

A fim de caracterizar as amostras, sólidos solúveis, acidez total titulável, ratio e pH foram determinados. Sólidos solúveis e acidez total titulável foram determinados de acordo com AOAC (1990), Ratio foi calculado através da relação entre °Brix/acidez e valor de pH medido por pHmetro Marconi®, modelo PA 200.

2.4. Determinação de compostos bioativos

2.4.1. Determinação de vitamina C

O conteúdo de ácido ascórbico foi determinado através de titulometria, que se baseia na redução do 2,6-diclorofenol indofenol pelo ácido ascórbico, segundo AOAC (1990), com substituição do solvente extrator ácido metafosfórico por ácido oxálico, de acordo com Benassi e Antunes (1988).

2.4.2. Determinação fenólicos totais

Fenólicos totais foram determinados de acordo com Singleton e Rossi (1965). Para isso, extratos das amostras foram obtidos da seguinte maneira: 2 mL de suco e 10 mL de mistura metanol:água (30:70, v/v) foram mantidos em banho ultrassom por 15 minutos. Em seguida, centrifugou-se a 10.000 rpm durante 15 minutos. Alíquotas de 0,5 mL do sobrenadante e 2,5 mL do reagente Folin-Ciocalteu 10% foram misturados e deixados em repouso por 5 minutos. Decorrido esse tempo, 2 mL de Na₂CO₃ 7,5% foram adicionados, seguido de aquecimento em banho-maria durante 5 minutos a 50 °C. Depois de resfriado, absorbância foi medida a 760 nm em espectrofotômetro Beckman (DU® 640).

Os resultados expressos em mg/100 mL de suco foram calculados através de curvas de calibração de soluções aquosas de ácido ferúlico (20 a 100 µg/mL) e ácido gálico (20 a 70 µg/mL), vide anexo 1 e 2, respectivamente.

2.4.3. Determinação de carotenóides totais

O conteúdo de carotenóides totais foi medido espectrofotometricamente como procedeu Lima *et al.* (2005). A extração dos carotenóides foi realizada centrifugando as amostras com metanol a 10.000 rpm a 20 °C durante 10 minutos, repetindo esse

procedimento até que o precipitado ficasse incolor. Os extratos metanólicos foram misturados e separados por partição em funil de separação contendo éter de petróleo.

A fração etérica obtida contendo os pigmentos foi lavada exaustivamente com água até a retirada total do metanol, e levada a um volume em balão volumétrico. A absorbância foi medida em espectrofotômetro Beckman (DU® 640) a 450 nm, os resultados foram expressos em (mg/L) equivalentes β -caroteno, usando o coeficiente de absortividade em éter de petróleo de 2592 (RODRIGUEZ-AMAYA, 1999).

2.4.4. Identificação e quantificação de flavonóides

A identificação e quantificação dos flavonóides foi realizada usando HPLC Shimadzu (Kyoto, Japão) modelo Prominence, acoplado com detector de arranjo fotodiodo (SPD-20A), injetor automático (SIL-20A), e coluna C18 (250 x 4,6 mm, 5 μ m) Thermo Scientific (Waltham, MA, EUA) a 30 °C. As condições cromatográficas consistiram de gradiente com água (A) e acetonitrila (B) como se segue: 5-25% de B (0-25 min), 25-100% de B (25-35 min), 100% de B (35-40 min), 100-5% de B (40-45 min), permanecendo 5% de B (45-55 min) como feito por Barreca *et al.* (2013). O volume de injeção foi 20 μ L a um fluxo de 1 mL/min. A detecção das flavanonas glicosiladas (FGs) foi a 280 nm e das flavonas polimetoxiladas (FPMs) a 330 nm.

Os sucos foram extraídos com DMF (1,25:1) e submetidos a aquecimento em banho-maria por 10 min a 90 °C. Depois de resfriadas, as soluções foram centrifugadas a 5.000 rpm por 10 min, e as alíquotas do sobrenadante filtradas em membrana 0,20 μ e injetadas no cromatógrafo.

FGs e FPMs contidos nos sucos foram identificados por comparação do seu tempo de retenção e o espectro UV com os dos padrões. A quantificação foi feita através de curva de calibração (vide anexo 3 a 8) de soluções padrões preparadas de acordo com Mouly, Gaydou e Auffray (1998), com faixas de concentração de: narirutina (5-80 μ g), naringina (0,5-4 μ g), hesperidina (100-1000 μ g), sinensetina (0,05-1,25 μ g), nobiletina (0,25-1,25 μ g) e tangeritina (0,03-0,25 μ g).

2.5. Determinação atividade antioxidante

2.5.1. MTT

O ensaio MTT foi realizado como descrito por Liu e Nair (2010), em que 190 μ L de MTT (1 mg/mL) dissolvido em água, juntamente com 50 μ L de suco ou padrão

ácido ascórbico e 1 mL de DMSO, foram misturados em vórtex e incubados a 37 °C durante 6 horas. Decorrido esse tempo, 200 µL da mistura de reação foi pipetada para microplaca de 96 poços, e a formação de coloração púrpura em comparação com um branco (sem amostra) foi medida a 570 nm, em espectrofotômetro leitor de placas BioTek® (Sinergy H1).

Os resultados foram expressos em µM equivalentes de ácido ascórbico/mL de suco, e calculados através de uma curva de calibração (vide anexo 13) de ácido ascórbico diluído em DMSO com concentração de 2 a 28 µM.

2.5.2. FRAP

A determinação antioxidante por FRAP foi feita segundo Benzie e Strain (1996), com algumas modificações. Uma alíquota de 150 µL solução de reagente FRAP, recentemente preparada, foi incubada em microplaca de 96 poços, a 37 °C por 30 minutos. Em seguida, foram adicionados 10 µL de suco, diluído em água (1:10 v/v), e 30 µL de água, a leitura da absorbância foi feita a 593 nm em espectrofotômetro leitor de placas BioTek® (Sinergy H1), a cada 4 minutos até a estabilização da reação/absorbância. A diferença da absorbância entre a última leitura e o branco, somente com o reagente FRAP, foi calculada para cada amostra e os resultados foram expressos em µM equivalentes de ácido ascórbico e Trolox por mL de suco, obtidos através de curva de calibração com concentração de 0,9 a 1,25 µM e 0,2 a 0,7 µM, de soluções aquosas de ácido ascórbico e Trolox (vide anexo 14 e 15), respectivamente.

2.5.3. ORAC

Em microplaca de 96 poços foram adicionados 50 µL de fluoresceína (78nM) e 50 µL de amostra diluída em água (1:500 v/v), seguido de incubação a 37 °C durante 30 minutos, 25 µL de AAPH (221mM) foram adicionados, e imediatamente após a adição do radical, o decaimento da fluorescência foi medido a cada 5 minutos até a perda de 95% da fluorescência inicial (ZULUETA, ESTEVE & FRÍGOLA, 2009). Reações com soluções de ácido ascórbico e Trolox em tampão fosfato, ambos de concentração 20 µM, e um branco com tampão fosfato de potássio, também foram feitas.

A leitura da fluorescência foi realizada em espectrofotômetro leitor de placas BioTek® (Synergy H1), com filtros de fluorescência para comprimento de onda de excitação 480 nm e emissão 520 nm.

Os valores ORAC, expressos como μM equivalentes de ácido ascórbico ou Trolox, foram calculados através da seguinte fórmula:

$$\text{ORAC} = \frac{20 * (\text{AUC amostra} - \text{AUC branco}) * k}{(\text{AUC padrão} - \text{AUC branco})}$$

Onde: 20 é a concentração dos padrões ácido ascórbico e Trolox utilizados (20 μM), e k o fator de diluição da amostra. AUC é a área abaixo da curva de decaimento da fluorescência da amostra, padrão e do branco, calculada pela seguinte fórmula:

$$\text{AUC} = (0,5 + f_5/f_0 + f_{10}/f_0 + \dots + f_n/f_0) * 5$$

Onde, f_0 é a fluorescência inicial no tempo 0 e f_n é a fluorescência no tempo n.

2.6. Análise estatística

Todas as determinações foram feitas em triplicata, e as médias foram comparadas através da análise de variância ANOVA complementada com pós-teste Tukey, pelo programa BioEstat 5.3 (Ayres et al., 2007). Diferenças significativas foram determinadas ao nível de 5% de significância.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Determinações físico-químicas

O teor de sólidos solúveis das amostras variou de 10,65 a 12,00 °Brix, sendo o suco pasteurizado marca B o que apresentou o maior valor, diferindo significativamente dos demais sucos (Tabela 1).

Quanto à acidez, o suco fresco de laranja Lima teve significativamente menor valor (0,25g de ácido cítrico/100 mL) em relação às demais amostras, o que era esperado, uma vez que é uma variedade de laranja com sabor mais doce. Já o suco fresco de laranja Pera apresentou significativamente o maior valor (1,19g de ácido cítrico/100 mL), o que consequentemente acarretou em menor valor de ratio. Apesar dos sucos frescos terem se diferido significativamente em quase todas as características

físico-químicas, os parâmetros se assemelharam aos encontrados por Barros, Ferreira e Genovese, (2012).

Tabela 1. Caracterização físico-química em sucos frescos (SF) e pasteurizados (SP) de laranjas.

	SF Pera	SF Lima	SP A	SP B
Sólidos Solúveis (°Brix)	10,65 ± 0,17 ^b	11,09 ± 0,12 ^b	10,99 ± 0,23 ^b	12,00 ± 0,20 ^a
Acidez titulável (g ácido cítrico/100 mL)	1,19 ± 0,03 ^a	0,25 ± 0,03 ^c	0,68 ± 0,03 ^b	0,70 ± 0,00 ^b
Ratio (relação °Brix e acidez)	8,94 ± 0,38 ^b	44,37 ± 6,19 ^a	16,35 ± 0,87 ^b	17,14 ± 0,29 ^b
pH	3,32 ± 0,01 ^d	5,86 ± 0,01 ^a	3,86 ± 0,01 ^b	3,79 ± 0,01 ^c

Média ± desvio-padrão de três repetições. Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa para $p < 0,05$.

Já entre os sucos industrializados, houve diferença significativa apenas no teor de sólidos solúveis e pH, o que ressalta a padronização da indústria para os parâmetros de acidez e ratio, que vão influenciar diretamente na aceitação sensorial do sabor ácido do suco.

3.2. Determinação compostos bioativos

3.2.1. Vitamina C, Fenólicos e Carotenóides Totais

Quanto ao conteúdo de vitamina C (Tabela 2), resultados semelhantes foram encontrados para os sucos frescos (SANCHÉZ-MORENO *et al.*, 2003b; RAPISARDA *et al.*, 2008) e pasteurizados (VELÁZQUEZ-ESTRADA *et al.*, 2013) também todos medidos por HPLC. O suco fresco Pera apresentou teor significativamente maior em relação aos demais, com exceção do pasteurizado marca B, tendo o pasteurizado marca A o menor conteúdo, que poderia ser devido ao tratamento térmico submetido, como constatou Velázquez-Estrada *et al.*, (2013) e Leizeron e Shimoni, (2005), mas controverso ao achado por Tiwari *et al.*, (2009); Cortés, Esteve e Frígola (2008); Gil-Izquierdo, Gil e Ferreres (2002) e Yeom *et al.*, (2000). Assim, essa diferença também poderia ser explicada pelo fato dos sucos serem obtidos de laranjas de variedade, genótipo, estágio de maturação, condições climáticas de plantio e colheita diferentes, já

que esses fatores influenciam o teor de ácido ascórbico na fruta (LEE & KADER, 2000).

Tabela 2. Conteúdos de vitamina C, fenólicos e carotenóides totais, em sucos frescos e pasteurizados de laranja.

	Vitamina C	Fenólicos Totais		Carotenóides
	(mg/L) ¹	(eq. ácido ferúlico)	(eq. ácido gálico)	Totais
	(mg/L) ¹	(mg/100 mL) ¹		(mg/L) ¹
SF Pera	529,92 ± 29,61 ^a	121,33 ± 2,38 ^b	79,06 ± 1,39 ^b	8,04 ± 1,08 ^a
SF Lima	361,45 ± 60,24 ^b	134,17 ± 0,73 ^a	96,77 ± 0,46 ^a	1,45 ± 0,27 ^c
SP A	324,79 ± 29,61 ^b	100,05 ± 1,53 ^c	66,74 ± 0,89 ^c	4,91 ± 1,08 ^b
SP B	461,85 ± 34,78 ^{ab}	94,63 ± 2,15 ^c	71,54 ± 1,37 ^c	4,61 ± 0,44 ^b

¹Média ± desvio-padrão de três repetições. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa para p<0,05.

Sabendo-se que o reagente Folin-Ciocalteu não reage apenas com fenólicos, mas também com outros compostos como aminoácidos e ácido ascórbico (KLIMCZAK *et al.*, 2007; ESCARPA & GONZÁLES, 2001), e que o suco de laranja possui relevante quantidade de ácido ascórbico, a concentração de fenólicos totais foi corrigida descontando a contribuição do ácido ascórbico na reação, considerando a quantidade de vitamina C presente nos sucos.

A concentração de fenólicos totais entre os sucos se diferiu significativamente, sendo maior nos sucos frescos, já os sucos pasteurizados não se diferiram entre si (Tabela 2). Velázquez-Estrada *et al.*, (2013) também constataram teor significativamente menor de fenólicos totais no suco pasteurizado em relação ao suco fresco, em contrário, Gil-Izquierdo, Gil e Ferreres (2002) encontraram maior teor no suco pasteurizado.

A contribuição do ácido ascórbico na redução do Folin-Ciocalteu foi semelhante entre os sucos, com 11% e 9,74% para suco fresco de laranja Pera e Lima respectivamente, e 12% e 13% para os sucos pasteurizados da marca A e B, respectivamente.

Pelo fato do ácido ferúlico ser o ácido fenólico mais predominante em suco de laranja (KELEBEK *et al.*, 2009; KELEBEK & SELLI, 2011; STINCO *et al.*, 2013), fez com que os resultados expressos nele fossem maiores, podendo torná-los até mais relevantes. Há divergências na literatura quanto ao fenólico em que os resultados são expressos, o que dificulta a comparação dos dados, Barros, Ferreira e Genovese (2012) e Rapisarda *et al.*, (2008) expressaram em mg equivalentes de catequina; Klimczak *et al.*, (2007) em mg equivalentes de ácido caféico; Stella *et al.*, (2011) e Tounsi *et al.*, (2011) em mg equivalentes de ácido gálico, todos com concentrações inferiores ao constatado nesse trabalho. Entretanto, a concentração de fenólicos totais dos sucos pasteurizados se assemelhou ao encontrado por Gil-Izquierdo, Gil e Ferreres (2002), medido por HPLC, de aproximadamente 92 mg/100 mL de suco.

Com exceção do suco de laranja Lima, suco fresco teve uma concentração significativamente maior de carotenóides, em relação aos sucos pasteurizados (Tabela 2), o que provavelmente foi devido ao tratamento térmico por esses últimos submetidos, como constatado por Esteve *et al.*, (2009); Cortés *et al.* (2006); Lee e Coates (2003). O que difere ao achado por Sánchez-Moreno *et al.* (2003b) que constataram igual conteúdo total de carotenóides entre o sucos pasteurizados e fresco.

Dentre os sucos frescos o de laranja Pêra foi o que demonstrou maior concentração de carotenóides totais. Pupin, Dennis e Toledo (1999) também constataram teor de carotenóides menor em suco fresco de laranja Lima em relação ao suco fresco de laranja Pêra. O que é visivelmente explicado pelo fato de a laranja Lima possuir uma coloração amarelada mais clara, em relação à laranja da variedade Pêra. Já em relação aos sucos pasteurizados não houve diferença significativa entre os seus conteúdos, que se assemelharam aos encontrados por Sánchez-Moreno *et al.* (2003b).

3.2.2. Flavonóides

Flavanonas glicosiladas (FG) e flavonas polimetoxiladas (FPM) foram separadas e identificadas na mesma corrida (Figura 1) em dois diferentes comprimentos de onda, de acordo com suas características espectrais.

Com exceção de hesperidina, em que o suco de Lima teve maior concentração, os sucos frescos não se diferiram significativamente quanto ao perfil de flavonóides, dentre os pasteurizados, com exceção de naringina, os sucos foram significativamente diferentes, tendo o pasteurizado da marca A os maiores conteúdos (Tabela 3). Já ao

considerar o conteúdo total, obtido pela somatória de cada flavonóide quantificado, todos os sucos se diferiram significativamente, tendo o suco fresco de laranja Lima o maior teor, seguido pelo pasteurizado da marca A, com 3744,10 mg/L e 3063,98 mg/L, respectivamente (Tabela 3).

De maneira geral, os sucos frescos tiveram maiores concentrações das FG, enquanto os sucos pasteurizados tiveram maiores teores das FPM, o que leva a crer, que o processo de extração da indústria proporcionou maior remoção das FPM, que se localizam na casca da laranja, e que os flavonóides não são degradados pelo tratamento térmico, como também constatado por Velázquez-Estrada *et al.* (2013) e Gil-Izquierdo, Gil e Ferreres (2002). Já Bai *et al.* (2013) observaram maiores concentrações de FG e FPM no suco pasteurizado em relação ao suco fresco espremido manualmente, que justificaram ser devido ao aumento da solubilidade desses compostos, proporcionado pelo tratamento térmico. Em contrário Feng *et al.* (2012) ao avaliar sucos frescos espremidos manualmente e sucos comerciais de laranja, constataram que os sucos frescos tiveram maiores concentrações de FG e FPM analisados. Essas diferenças encontradas provavelmente se devem às diferentes variedades de laranja utilizadas e às diferentes técnicas de extrair o suco, que influenciam qualitativa e quantitativamente o conteúdo dos compostos bioativos.

Figura 1. Separação cromatográfica dos padrões de FG: 40 μg de naringina (NAR), 50 μg de naringina (NAR), 50 μg de hesperidina (HES), e FPM: 10 μg de sinensetina (SIN), 10 μg de nobiletina (NOB) e 10 μg de tangeritina (TAN), a 280 e 330 nm.

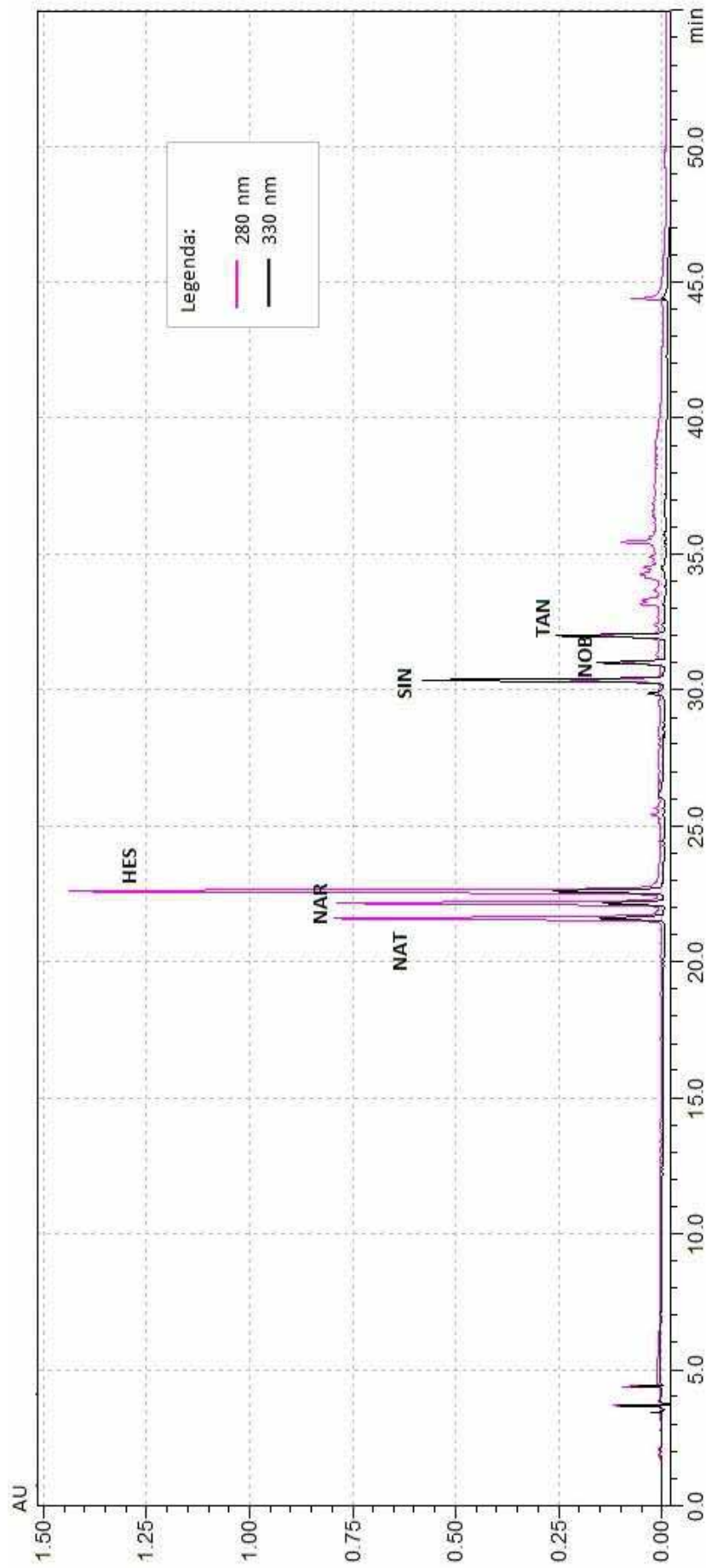


Tabela 3. Tempos de retenção, espectros UV e concentração de flavonóides principais presentes em sucos frescos (SF) e pasteurizados (SP) de laranja.

Pico	Composto	TR (min)	UV Máx. (nm)	SF Pera	SF Lima	mg/L ¹	
						SP A	SP B
1	Narirutina	21:61	282, 336	178,06 ± 0,69 ^a	176,98 ± 2,03 ^a	148,55 ± 0,34 ^b	72,49 ± 1,06 ^c
2	Naringina	22:17	282, 325	14,47 ± 2,58 ^a	nd*	9,76 ± 0,70 ^a	11,91 ± 1,77 ^a
3	Hesperidina	22:62	283, 325	2637 ± 22 ^c	3559 ± 14 ^a	2880 ± 28 ^b	2187 ± 20 ^d
4	Sinensetina	30:41	240, 329	3,14 ± 0,26 ^c	3,24 ± 0,10 ^c	8,33 ± 0,10 ^a	6,02 ± 0,05 ^b
5	Nobiletina	31:06	270, 331	3,99 ± 0,57 ^c	4,52 ± 0,02 ^c	16,01 ± 0,01 ^a	10,86 ± 0,02 ^b
6	Tangeritina	32:04	270, 321	0,46 ± 0,03 ^c	0,59 ± 0,09 ^c	1,73 ± 0,07 ^a	1,23 ± 0,08 ^b
Soma Total				2837,37 ± 25,70 ^c	3744,11 ± 16,59 ^a	3063,99 ± 28,94 ^b	2289,60 ± 22,70 ^d

¹Média ± desvio-padrão de três repetições. Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa para p<0,05.

*não detectado.

3.3. Determinação capacidade antioxidante

Em geral os sucos não tiveram capacidade antioxidante significativamente diferente, com exceção do suco fresco de laranja Pera que apresentou capacidade antioxidante significativamente maior apenas em relação ao suco pasteurizado da marca B, medida pelo ensaio FRAP (Tabela 4). Velázquez-Estrada *et al.*, (2013) também constatarem capacidade antioxidante menor para suco pasteurizado em relação ao suco fresco, medida pelo mesmo ensaio.

O contrário aconteceu pelo ensaio MTT, em que houve diferença significativa entre a capacidade antioxidante dos sucos, com exceção do suco fresco Pera e pasteurizado marca B que não se diferiram significativamente.

Tabela 4. Determinação da capacidade antioxidante por MTT (eq. μM ác. ascórbico/mL de suco), FRAP (μM ác. ascórbico e Trolox/mL de suco), e ORAC (valores ORAC eq. μM ác. ascórbico e Trolox), em sucos frescos (SF) e pasteurizados (SP) de laranjas.

	MTT	FRAP		ORAC	
	(eq. μM ác. asc.)	(eq. μM ác. asc.)	(eq. μM Trolox)	(eq. μM ác. asc.)	(eq. μM Trolox)
SF Pera	106 $\pm$ 5 ^c	925 $\pm$ 55 ^a	329 $\pm$ 68 ^a	42746 $\pm$ 7702 ^a	9303 $\pm$ 1182 ^a
SF Lima	710 $\pm$ 29 ^a	828 $\pm$ 35 ^{ab}	208 $\pm$ 44 ^{ab}	39850 $\pm$ 6979 ^a	8632 $\pm$ 1512 ^a
SP A	237 $\pm$ 6 ^b	834 $\pm$ 29 ^{ab}	216 $\pm$ 36 ^{ab}	39089 $\pm$ 6417 ^a	8467 $\pm$ 1390 ^a
SP B	56 $\pm$ 6 ^c	785 $\pm$ 1 ^b	154 $\pm$ 1 ^b	39418 $\pm$ 2867 ^a	8538 $\pm$ 621 ^a

Média $\pm$ desvio-padrão de três repetições. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa para $p < 0,05$.

Suco fresco de laranja Lima foi o que teve maior potencial antioxidante medido por MTT e também maior conteúdo de flavonóides e fenólicos, já medido por FRAP e ORAC foi o suco fresco de laranja Pera que demonstrou maior valor, e que teve também maiores teores de vitamina C e carotenóides, indicando que os compostos bioativos reagiram de maneira diferente em resposta aos diferentes ensaios, o que dificulta determinar o composto responsável pelo potencial antioxidante dos sucos.

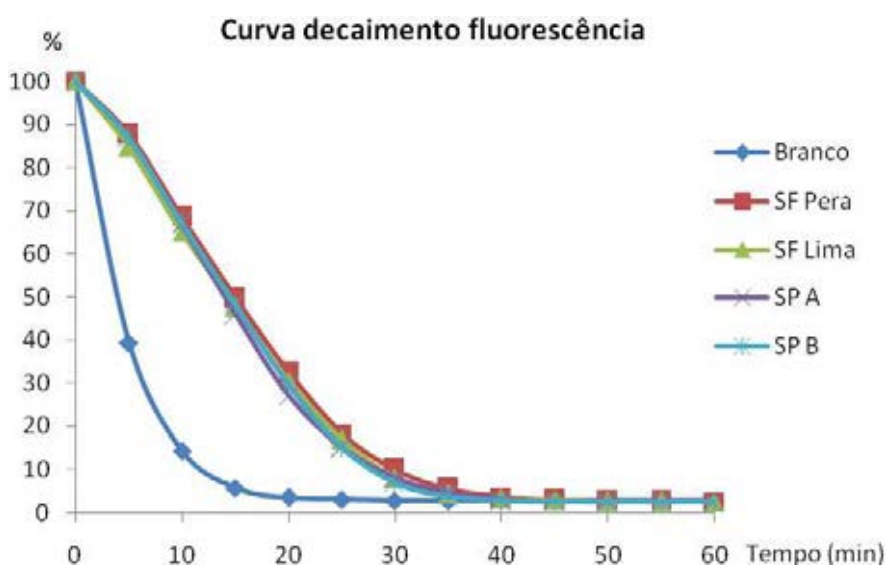
Os resultados foram expressos em μM equivalentes de ácido ascórbico e Trolox, com exceção do ensaio MTT pelo fato do padrão Trolox mesmo em altas concentrações

ter reduzido muito fracamente o reagente MTT, sendo os resultados expressos em ácido ascórbico maiores que os equivalentes em Trolox, tornando os resultados mais relevantes, já que o ácido ascórbico é um composto presente no suco.

Apesar de os resultados obtidos pelo ensaio MTT serem menores quando comparados com outros dois ensaios, esse método demonstrou ser uma alternativa viável para medir a capacidade antioxidante de suco de laranja, já que as amostras reduziram o reagente MTT, comprovando seu caráter redutor. Assim como ocorreu com MTT, o ensaio FRAP também determinou a capacidade de redução dos sucos, através da doação de elétrons, que seria o possível mecanismo para neutralizar os radicais e assim proteger o sistema biológico contra os danos oxidativos.

Os sucos de laranja demonstraram relevante proteção oxidativa pelo ensaio ORAC, uma vez que retardaram a deformação completa da fluoresceína caracterizada pela perda de sua fluorescência, comparados com a ausência de antioxidante (branco) (Figura 2). Os sucos tiveram comportamento muito semelhante quanto ao tempo de inibição da oxidação, o que caracterizou em capacidades antioxidantes estatisticamente iguais (Tabela 4).

Figura 2. Curva de decaimento do percentual de fluorescência medido por ORAC em sucos frescos (SF) e pasteurizados (SP) de laranja, em paralelo com um branco, no decorrer do tempo em minutos.



Os valores de capacidade antioxidante entre os métodos se diferiram apesar de serem expressos da mesma maneira, isso porque os ensaios se diferem quanto às condições e mecanismos de reação, radical empregado e maneira de calcular os resultados. Entretanto, demonstraram que suco de laranja, fresco ou processado, é uma importante fonte de antioxidantes entre os sucos de frutas, já que apresentou maiores resultados em relação aos encontrados para suco de cranberry (KRAUJALYTE *et al.*, 2013), medido por FRAP e ORAC, Shiikuwasha, uma espécie de *Citrus*, (ASIKIN *et al.*, 2014), cereja (OU *et al.*, 2012), e uva (DÁVALOS, BARTOLOMÉ & GÓMEZ-CORDOVÉS, 2005), medidos por ORAC.

4. CONCLUSÕES

O processo de pasteurização pareceu influenciar os conteúdos de fenólicos e carotenóides totais, tendo os sucos pasteurizados menor concentração em relação aos sucos frescos. O que não foi observado para vitamina C, flavonóides e capacidade antioxidante, indicando que suco de laranja, fresco ou processado, tem uma importante contribuição antioxidante para a dieta.

Dos três ensaios utilizados para medir a capacidade antioxidante, o ORAC foi o que mostrou maiores resultados e que podem apresentar maior relevância biológica por envolver a geração de radicais livres (peroxilas) de significância patológica.

5. REFERÊNCIAS

AOAC. **Official methods of analysis of the association of official analytical chemists**. Arlington, 15a ed., 1990.

APTEKMANN, N. P.; CESAR, T. B. Long-term orange juice consumption is associated with low LDL-cholesterol and apolipoprotein B in normal and moderately hypercholesterolemic subjects. **Lipids in Health and Disease**, p. 112-119, 2013.

ASIKIN, Y.; FUKUNAGA, H.; YAMANO, Y.; HOU, D.X.; MAEDA, G.; WADA, K. Effect of cultivation line and peeling on food composition, taste characteristic, aroma profile, and antioxidant activity of Shiikuwasha (*Citrus depressa* Hayata) juice. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 94, n. 12, p. 2384–2392, 2014.

AYRES, M.; AYRES JUNIOR, M.; AYRES, D. L.; SANTOS, A. A. S. **BioEstat 5.3: aplicações estatísticas nas áreas das ciências biomédicas**. Belém: Sociedade Civil

Mamirauá. Brasília: Ministério da Ciência e Tecnologia; Belém: Imprensa Oficial do Estado do Pará. 2007. 324p.

BAI, J.; MANTHEY, J. A.; FORD, B. L.; LUZIO, G.; CAMERON, R. G.; NARCISO, J.; BALDWIN, E. A. Effect of extraction, pasteurization and cold storage on flavonoids and other secondary metabolites in fresh orange juice. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 93, n. 11, p. 2771–2781, 2013.

BARRECA, D.; BISIGNANO, C.; GINESTRA, G.; BISIGNANO, G.; BELLOCCO, E.; LEUZZI, U.; GATTUSO, G. Polymethoxylated, C- and O-glycosyl flavonoids in tangelo (*Citrus reticulata* × *Citrus paradisi*) juice and their influence on antioxidant properties. **Food chemistry**, v. 141, n. 2, p. 1481 -1488, 2013.

BARROS, H. R. M.; FERREIRA, T. A. P. C.; GENOVESE, M. I. Antioxidant capacity and mineral content of pulp and peel from commercial cultivars of citrus from Brazil. **Food Chemistry**, v. 134, n. 4, p. 1892–1898, 2012.

BENASSI, M. T.; ANTUNES, A. J. A comparison of methaphosphoric and oxalic acides as extractant solutions for determination of vitamin C in selected vegetables. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, v. 31, n.4, p. 507-513, 1988.

BENZI, I. F. F.; STRAIN, J. J. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. **Analytical Biochemistry**, v. 239, p. 70–76, 1996.

BIGONIYA, P.; SINGH, K. Ulcer protective potential of standardized hesperidin, a citrus flavonoid isolated from *Citrus sinensis*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 24, n. 3, p. 330–340, 2014.

CORTÉS, C.; TORREGROSA, F.; ESTEVE, M. J.; FRÍGOLA, A. Carotenoid Profile Modification during Refrigerated Storage in Untreated and Pasteurized Orange Juice and Orange Juice Treated with High-Intensity Pulsed Electric Fields. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 17, p. 6247–6254, 2006.

CORTÉS, C.; ESTEVE, M. J.; FRÍGOLA, A. Effect of refrigerated storage on ascorbic acid content of orange juice treated by pulsed electric fields and thermal pasteurization. **European Food Research and Technology**, v.227, n. 2 p.629-635, 2008.

DÁVALOS, A.; BARTOLOMÉ, B.; GÓMEZ-CORDOVÉS, C. Antioxidant properties of commercial grape juices and vinegars. **Food Chemistry**, v. 93, n. 2, p. 325–330, 2005.

ESCARPA, A.; GONZÁLES, M. C. Approach to the content of total extractable phenolic compounds from different food samples by comparison of chromatographic and spectrophotometric methods. **Analytica Chimica Acta**, v. 427, n. 1, p. 119–127, 2001.

ESTEVE, M. I.; BARBA, F. J.; PALOP, S.; FRÍGOLA, A. The effects of non-thermal processing on carotenoids in orange juice. **Czech Journal of Food Sciences**, v. 27, p. S304-S306, 2009.

FENG, X.; ZHANG, Q.; CONG, P.; ZHU, Z. Simultaneous determination of flavonoids in different citrus fruit juices and beverages by high-performance liquid chromatography and analysis of their chromatographic profiles by chemometrics. **Analytical Methods**, v. 4, p. 3748, 2012.

FIGLIORE, A.; FAUCI, L. L.; CERVELLATI, R.; GUERRA, M. C.; SPERONI, E.; COSTA, S.; GALVANO, G.; LORENZO, A. D.; BACCHELLI, V.; FOGLIANO, V.; GALVANO, F. Antioxidant activity of pasteurized and sterilized commercial red orange juices. **Molecular Nutrition & Food Research**, vol.49, n. 12, p.1129-1135, 2005.

FOROUDI, S.; POTTER, A. S.; STAMATIKOS, A.; PATIL, B. S.; DEYHIM, F. Drinking Orange Juice Increases Total Antioxidant Status and Decreases Lipid Peroxidation in Adults. **Journal of Medicinal Food**, v.17, n. 5, p. 612-617, 2014.

FRAGA, C. G.; MOTCHNIK, P. A.; SHIGENAGA, M. K.; HELBOCK, H. J.; JACOB, R. A.; AMES, B. N. Ascorbic acid protects against endogenous oxidative DNA damage in human sperm. **Proceedings of the National Academy Sciences of USA**, v. 88, p. 11003-11006, 1991.

FREI, B.; FORTE, T. M.; AMES, B. N.; CROSS, C. E. Gas phase oxidants of cigarette smoke induce lipid peroxidation and changes in lipoprotein properties in human blood plasma. **Biochemical Journal**, v. 277, p. 133-138, 1991.

GHANIM, H.; SIA, C. L.; UPADHYAY, M.; KORZENIEWSKI, K.; VISWANATHAN, P.; ABUAYSHEH, S.; MOHANTY, P.; DANDONA, P. Orange juice neutralizes the proinflammatory effect of a high-fat, high-carbohydrate meal and prevents endotoxin increase and Toll-like receptor expression. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 91, n. 4, p. 940-949, 2010.

GIL-IZQUIERDO, A.; GIL, M. I.; FERRERES, F. Effect of Processing Techniques at Industrial Scale on Orange Juice Antioxidant and Beneficial Health Compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 18, p. 5107–5114, 2002.

KELEBEK, H.; SELLI, S. Determination of volatile, phenolic, organic acid and sugar components in a Turkish cv. Dört Yol (Citrus sinensis L. Osbeck) orange juice. **Journal of the science of food and agriculture**, v. 91, n. 10, p.1855-62, 2011.

KELEBEK, H.; SELLI, S.; CANBAS, A.; CABAROGLU, T. HPLC determination of organic acids, sugars, phenolic compositions and antioxidant capacity of orange juice and orange wine made from a Turkish cv. Kozan. **Microchemical Journal**, v. 91, n. 2, p. 187–192, 2009.

KLIMCZAK, I.; MALECKA, M.; SZLACHTA, M.; GLISZCZYNSKA-SWIGLO, A. Effect of storage on the content of polyphenols, vitamin C and the antioxidant activity

of orange juices. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.20, n.3–4, p. 313–322, 2007.

KRAUJALYTE, V.; VENSKUTONIS, P. R.; PUKALSKAS, A.; CESONIENE, L.; DAUBARAS, R. Antioxidant properties and polyphenolic compositions of fruits from different European cranberrybush (*Viburnum opulus* L.) genotypes. **Food Chemistry**, v. 141, n. 4, p.3695-3702, 2013.

KUROWSKA, E. M.; MANTHEY, J. A. Hypolipidemic Effects and Absorption of Citrus Polymethoxylated Flavones in Hamsters with Diet-Induced Hypercholesterolemia. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 10, p. 2879–2886, 2004.

LEE, H. S.; COATES, G. A. Effect of thermal pasteurization on Valencia orange juice color and pigments. **LWT - Food Science and Technology**, v. 36, n. 1, p. 153–156, 2003.

LEE, S. K.; KADER, A. A. Preharvest and postharvest factors influencing vitamin C content of horticultural crops. **Postharvest Biology and Technology**, v. 20, p. 207–220, 2000.

LEIZERSON, S.; SHIMONI, E. Effect of Ultrahigh-Temperature Continuous Ohmic Heating Treatment on Fresh Orange Juice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 9, p. 3519–3524, 2005.

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 Chemistry**, v. 90, n. 4, p. 565–568, 2005.

LIU, Y.; NAIR, M. G. An Efficient and Economical MTT Assay for Determining the Antioxidant Activity of Plant Natural Product Extracts and Pure Compounds. **Journal of Natural Products**, v.73, p. 1193–1195, 2010.

MARNETT, L. J. Inflammation and Cancer: Chemical Approaches to Mechanisms, Imaging, and Treatment. **Journal of Organic Chemistry**, v. 77, n. 2, p. 5224–5238, 2012.

MORAND, C.; DUBRAY, C.; MILENKOVIC, D.; LIOGER, D.; MARTIN, J. F.; SCALBERT, A.; MAZUR, A. Hesperidin contributes to the vascular protective effects of orange juice: a randomized crossover study in healthy volunteers. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 93, n. 1, p. 73-80, 2011.

MOULY, P.; GAYDOU, E. M.; AUFFRAY, A. Simultaneous separation of flavanone glycosides and polymethoxylated flavones in citrus juices using liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 800, n. 2 , p. 171-179, 1998.

MULVIHILL, E. E.; HUFF, M. W. Protection from Metabolic Dysregulation, Obesity, and Atherosclerosis by Citrus Flavonoids: Activation of Hepatic PGC1 α -Mediated Fatty Acid Oxidation. **PPAR Research**, v. 2012, 2012.

NASSER, A. L. M.; DOURADO, G. K.; MANJATE, D. A.; CARLOS, I. Z.; CÉSAR, T. B. Avaliação do estresse oxidativo no sangue de consumidores habituais de suco de laranja. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 32, n. 2, p. 275-279, 2011.

O'NEIL, C. E.; NICKLAS, T. A.; RAMPERSAUD, G. C.; FULGONI, V.L. III. 100% Orange juice consumption is associated with better diet quality, improved nutrient adequacy, decreased risk for obesity, and improved biomarkers of health in adults. **Nutrition Journal**, v.11, p. 107, 2012.

OU, B.; BOSAK, K. N.; BRICKNER, P. R.; IEZZONI, D. G.; SEYMOUR, E. M. Processed Tart Cherry Products—Comparative Phytochemical Content, in vitro Antioxidant Capacity and in vitro Anti-inflammatory Activity. **Journal of Food Science**, v. 77, n. 5, p. H105–H112, 2012.

PELLEGRINI, N.; SERAFINI, M.; COLOMBI, B.; DEL RIO, D.; SALVATORE, S.; BIANCHI, M.; BRIGHENTI, F. Total Antioxidant Capacity of Plant Foods, Beverages and Oils Consumed in Italy Assessed by Three Different In Vitro Assays. **The Journal of Nutrition**, v. 133, n. 9 2812-2819, 2003.

PUPIN, A. M.; DENNIS, M. J.; TOLEDO, M. C. F. HPLC analysis of carotenoids in orange juice. **Food Chemistry**, v. 64, n. 2, p. 269–275, 1999.

RAPISARDA, P.; BIANCO, M. L.; PANNUZZO, P.; TIMPANARO, N. Effect of cold storage on vitamin C, phenolics and antioxidant activity of five orange genotypes [Citrus sinensis (L.) Osbeck]. **Postharvest Biology and Technology**, v. 49, p. 348–354, 2008.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. **A guide to carotenoid analysis in foods**. Washington, ILSI Press: 1999, 64 p.

SÁNCHEZ-MORENO, C.; CANO, M. P.; ANCOS, B.; PLAZA, L.; OLMEDILLA, B.; GRANADO, F.; MARTÍN, A. Effect of orange juice intake on vitamin C concentrations and biomarkers of antioxidant status in humans. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 78, n. 3, p. 454-460, 2003a.

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. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 83, n. 5, p.430-439, 2003b.

SANGIOVANNI, J. P.; CHEW, E. Y.; CLEMONS, T. E.; FERRIS III, F. L.; GENSLER, G.; LINDBLAD, A. S.; MILTON, R. C.; SEDDON, J. M.; SPERDUTO, R. D. The relationship of dietary carotenoid and vitamin A, E, and C intake with age-related macular degeneration in a case-control study: AREDS report No. 22. **Archives of Ophthalmology**, v. 125, n. 9, p. 1225-1232, 2007.

SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. Colometry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 16, p. 144-153, 1965.

STELLA, S. P.; FERRAREZI, A. C.; SANTOS, K. O.; MONTEIRO, M. Antioxidant activity of commercial ready-to-drink orange juice and nectar. **Journal of Food Science**, v. 76, n. 3, p.C392-C397, 2011.

STINCO, C. M.; FERNÁNDEZ-VÁZQUEZ, R.; HERNANZ, D.; HEREDIA, F. J.; MELÉNDEZ-MARTÍNEZ, A. J.; VICARIO, I. M. Industrial orange juice debittering: Impact on bioactive compounds and nutritional value. **Journal of Food Engineering**, v. 116, n. 1, p.155-161, 2013.

TIWARI, B. K.; O'DONNELL, C. P.; MUTHUKUMARAPPAN, K.; CULLEN, P. J. Ascorbic acid degradation kinetics of sonicated orange juice during storage and comparison with thermally pasteurised juice. **LWT - Food Science and Technology**, v. 42, n. 3, p.700-704, 2009.

TOUNSI, M. S.; WANNES, W. A.; OUERGHEMMI, I.; JEGHAM, S.; NJIMA, Y. B.; HAMDAOUI, G.; ZEMNI, H.; MARZOUK, B. Juice components and antioxidant capacity of four Tunisian Citrus varieties. **Journal Of The Science Of Food And Agriculture**, vol. 91, n. 1, p.142-151, 2011.

VELÁZQUEZ-ESTRADA, R. M.; HERNÁNDEZ-HERRERO, M. M.; RUFER, C. E.; GUAMIS-LÓPEZ, B.; ROIG-SAGUÉS, A. X. Influence of ultra high pressure homogenization processing on bioactive compounds and antioxidant activity of orange juice. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 18, p. 89–94, 2013.

WANG, A. Y.; ZHOU, M. Y.; LIN, W. C. Antioxidative and anti-inflammatory properties of *Citrus sulcata* extracts. **Food Chemistry**, v. 124, n. 3, p. 958–963, 2011.

YANG, M.; CHUNG, S. J.; CHUNG, C. E.; KIM, D. O.; SONG, W. O.; KOO, S. I.; CHUN, O. K. Estimation of total antioxidant capacity from diet and supplements in US adults. **British Journal of Nutrition**, v. 106, n. 2, p. 254-263, 2011.

YANG, M.; LEE, S. G.; WANG, Y.; LLOYD, B.; CHUNG, S. J.; SONG, W. O.; CHUN, O. K. Orange Juice, a Marker of Diet Quality, Contributes to Essential Micronutrient and Antioxidant Intakes in the United States Population. **Journal of Nutrition Education and Behavior**, v. 45, n. 4, p.340-348, 2013.

YEOM, H. W.; STREAKER, C. B.; ZHANG, Q. H.; MIN, D. B. Effects of Pulsed Electric Fields on the Quality of Orange Juice and Comparison with Heat Pasteurization. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 10, p. 4597–4605, 2000.

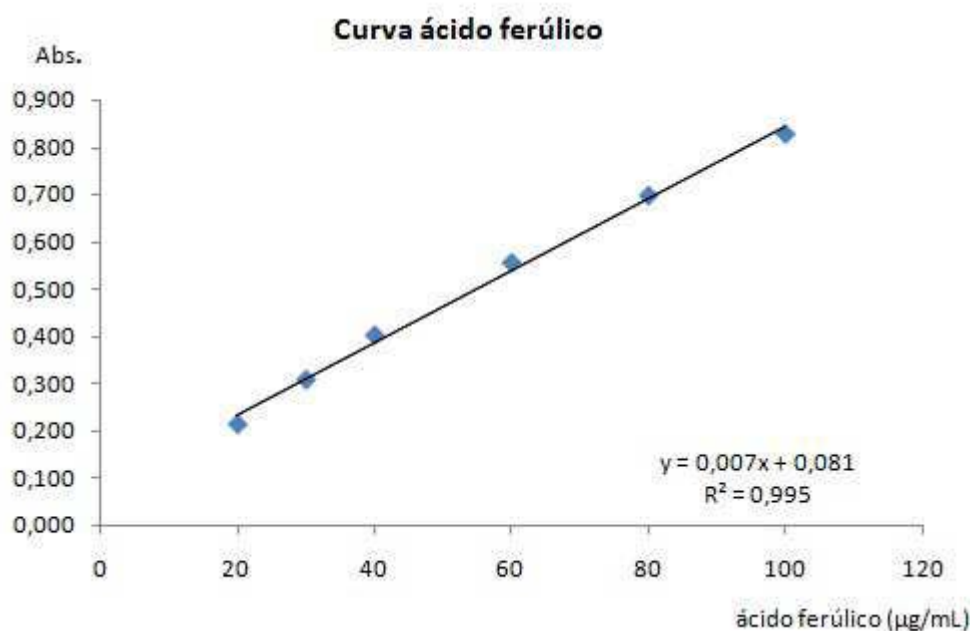
ZANATTA, A. L.; MICHELOTTO JUNIOR, P. V.; NISHIYAMA, A. The prevention of oxidative stress improves asthmatic inflammation. **Advances in Bioscience and Biotechnology**, v. 3, p. 1087–1090, 2012.

ZHANG, J.; WU, Y.; ZHAO, X.; LUO, F.; LI, X.; ZHU, H.; SUN, C.; CHEN, K. Chemopreventive effect of flavonoids from Ougan (*Citrus reticulata* cv. Suavissima) fruit against cancer cell proliferation and migration. **Journal of Functional Foods**, v. 10, p. 511–519, 2014.

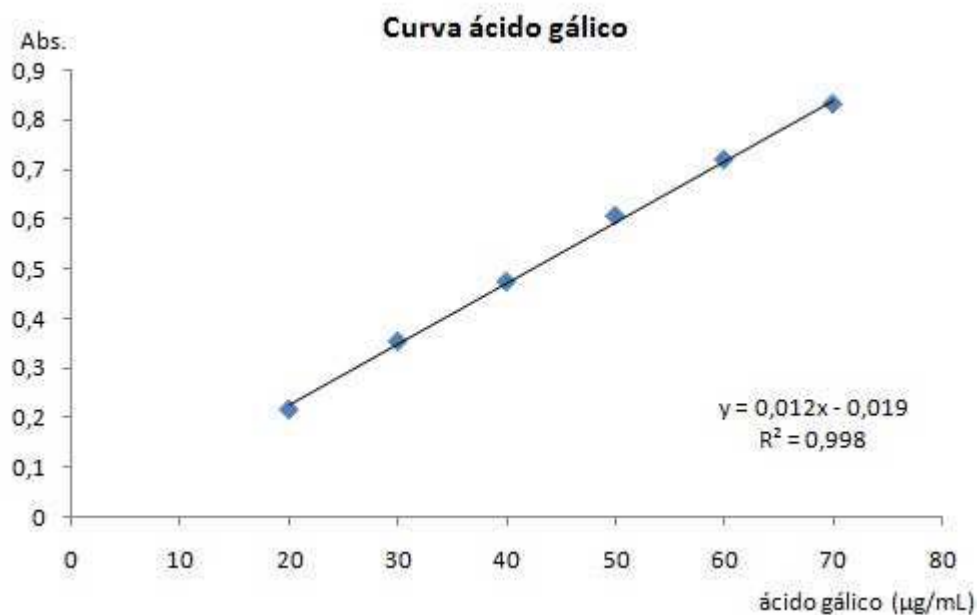
ZULUETA, A.; ESTEVE, M. J.; FRÍGOLA, A. ORAC and TEAC assays comparison to measure the antioxidant capacity of food products. **Food Chemistry**, vol.114, n. 1, p.310-316, 2009.

ANEXOS

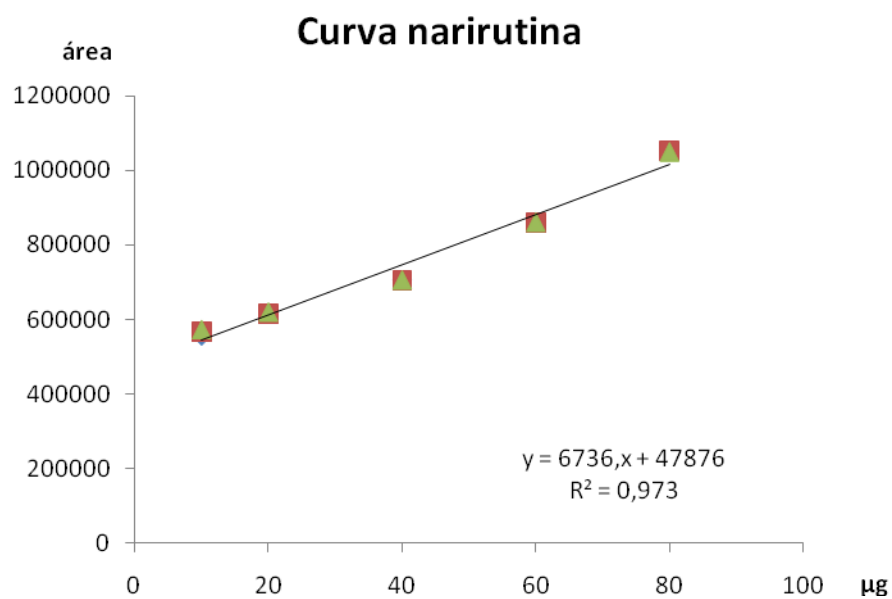
Anexo 1. Curva de calibração padrão ácido ferúlico para determinação de fenólicos totais.



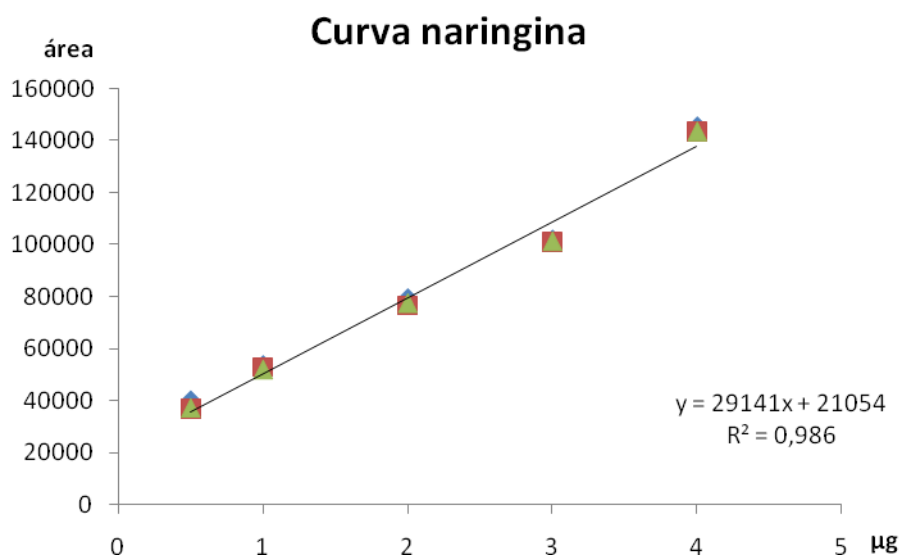
Anexo 2. Curva de calibração padrão ácido gálico para determinação de fenólicos totais.



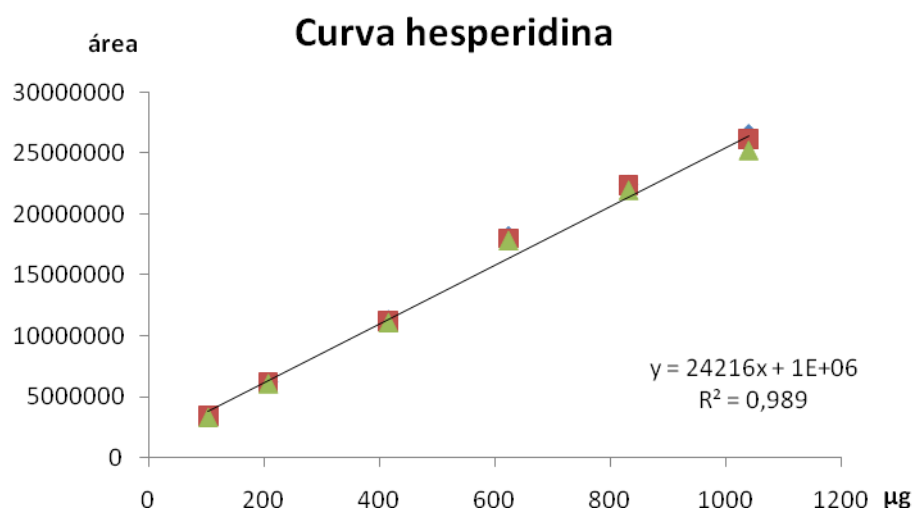
Anexo 3. Curva de calibração padrão narirutina.



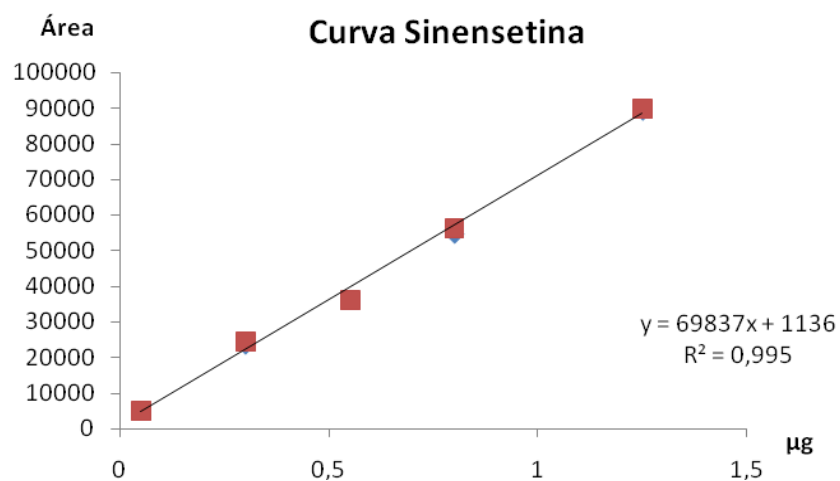
Anexo 4. Curva de calibração padrão naringina.



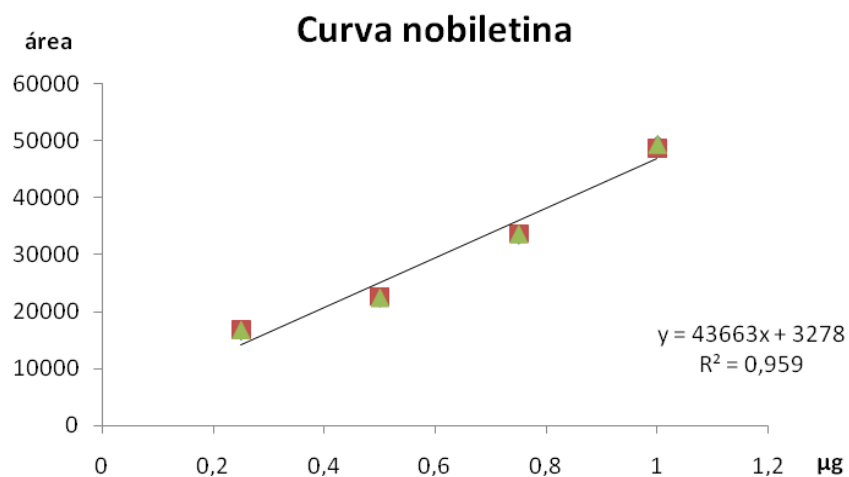
Anexo 5. Curva de calibração padrão hesperidina.



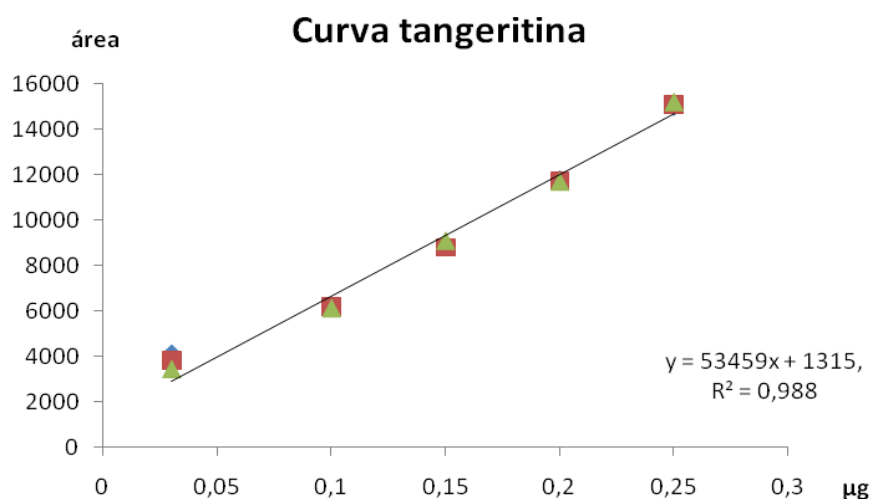
Anexo 6. Curva de calibração padrão sinensetina.



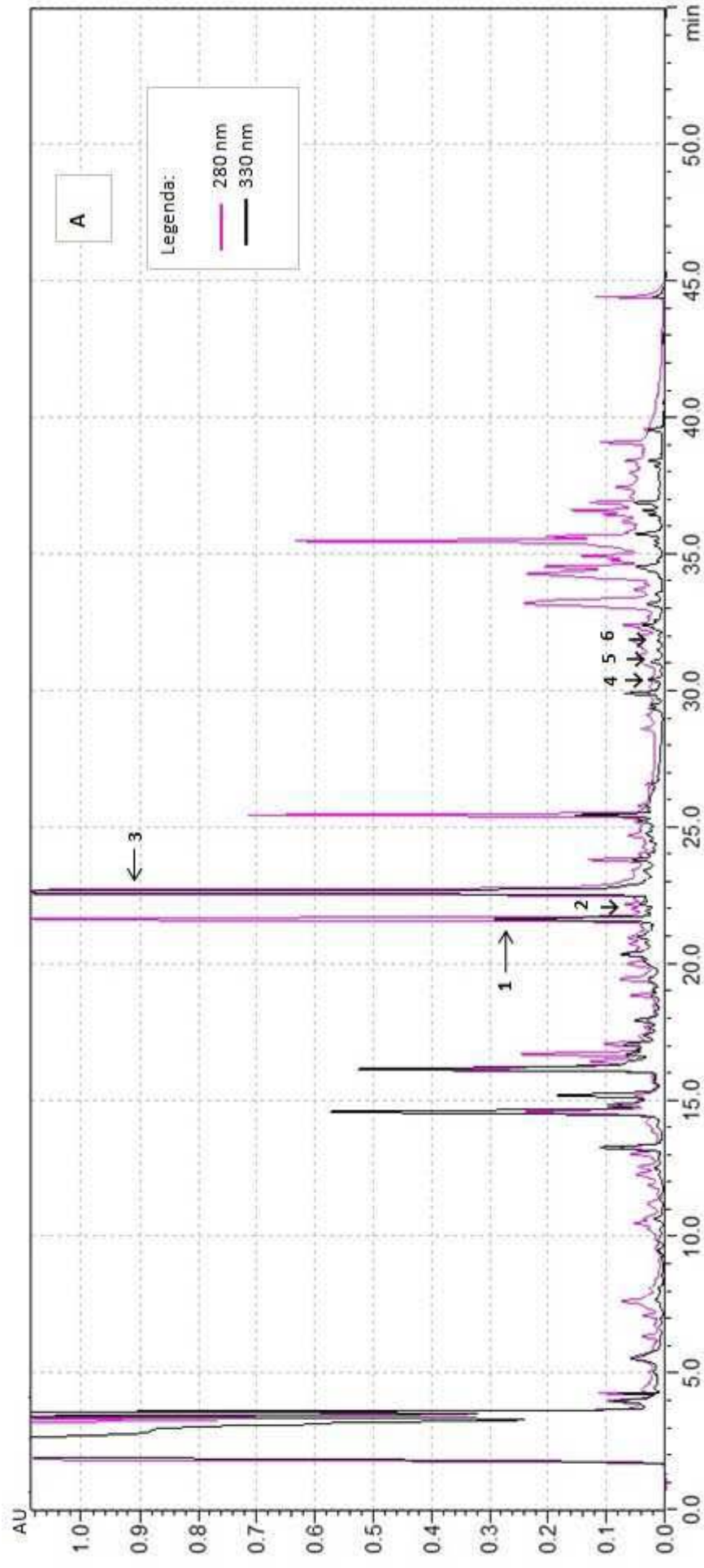
Anexo 7. Curva de calibração padrão nobiletina.



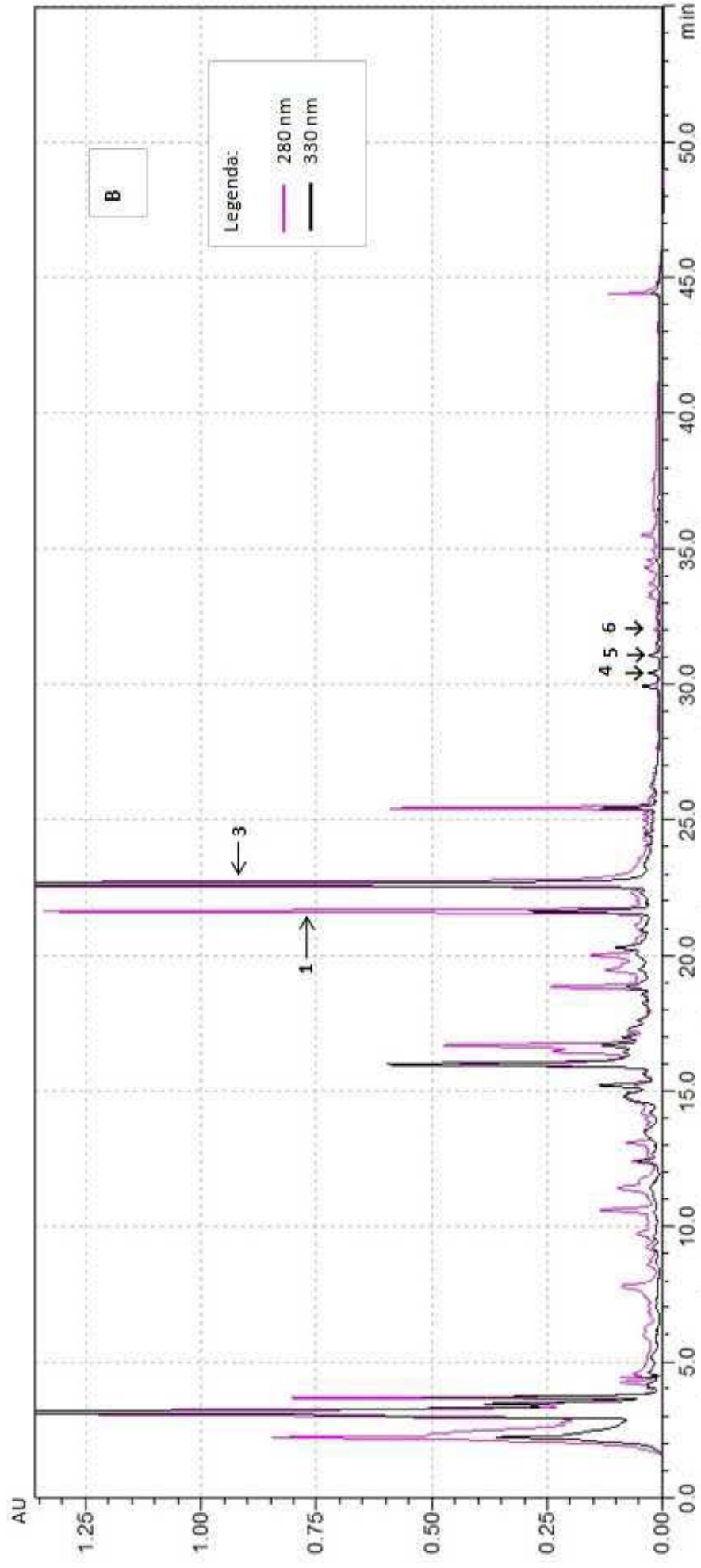
Anexo 8. Curva de calibração padrão tangeritina.



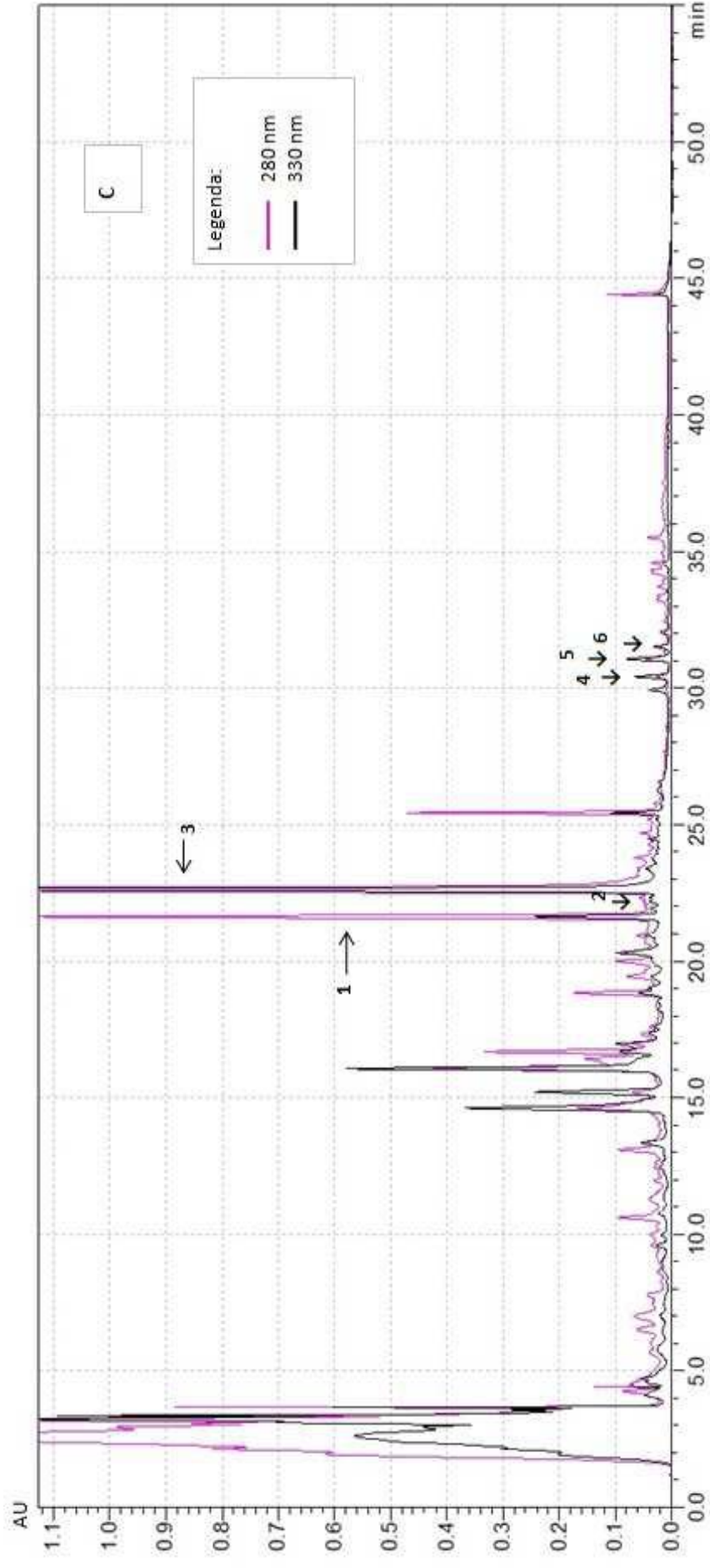
Anexo 9. Cromatograma dos flavonóides principais em suco fresco de laranja Pêra, a 280 e 330 nm.



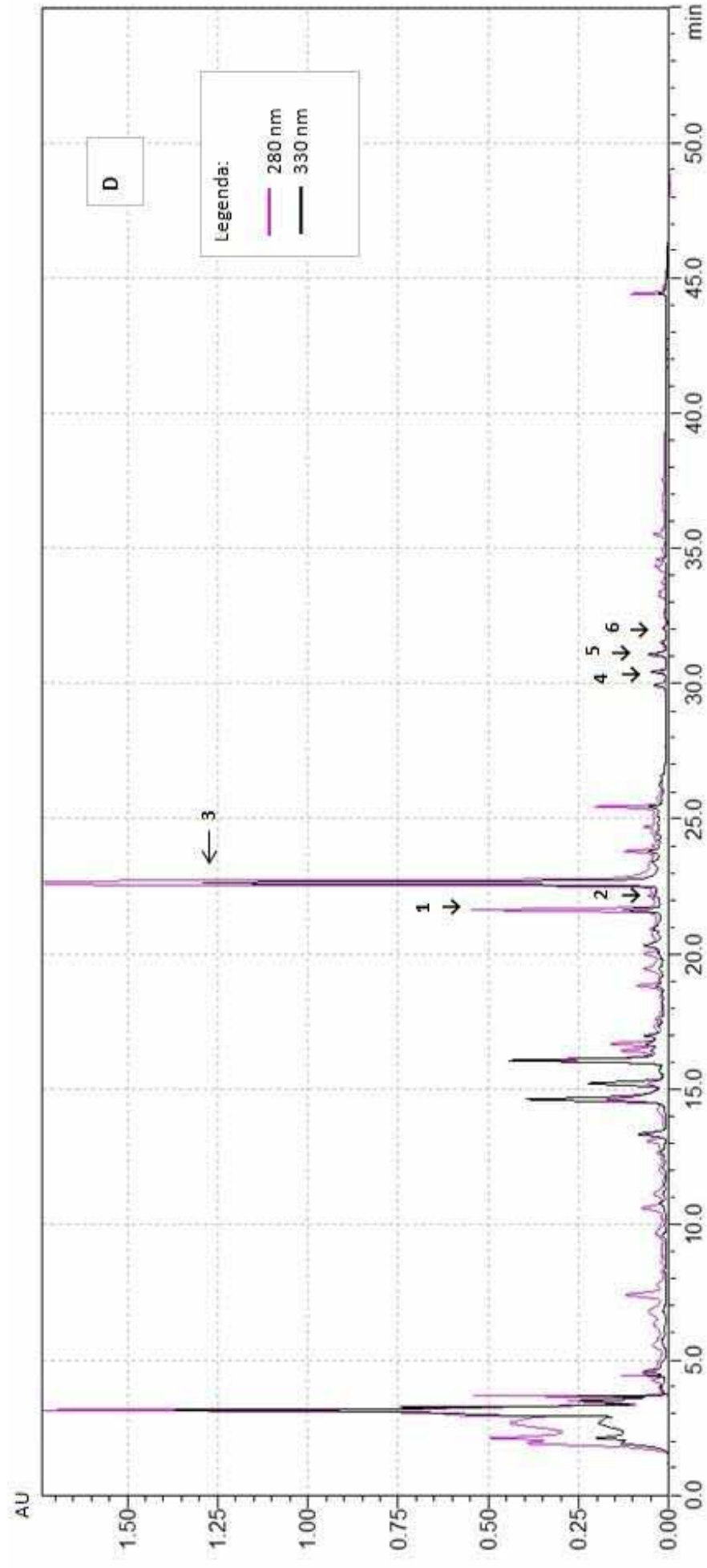
Anexo 10. Cromatograma dos flavonóides principais em suco fresco de laranja Lima, a 280 e 330 nm.



Anexo 11. Cromatograma dos flavonóides principais em suco pasteurizado marca A, a 280 e 330 nm.



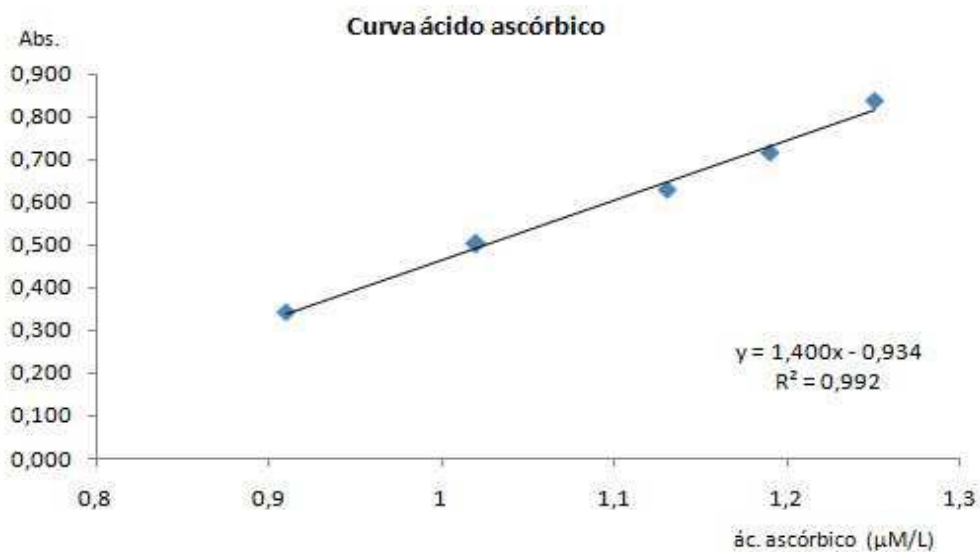
Anexo 12. Cromatograma dos flavonóides principais em suco pasteurizado marca B, a 280 e 330 nm.



Anexo 13. Curva de calibração padrão ácido ascórbico para ensaio MTT.



Anexo 14. Curva de calibração padrão ácido ascórbico para ensaio FRAP.



Anexo 15. Curva de calibração padrão Trolox para ensaio FRAP.

