

Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Departamento de Alimentos e Nutrição

**INFLUÊNCIA DA VARIEDADE E REGIÃO DE CULTIVO SOBRE
COMPOSTOS BIOATIVOS, ATIVIDADE ANTIOXIDANTE
E COR DE LARANJAS DE POLPA VERMELHA**

Gabriela Dinois Merussi

Biomédica

Araraquara - SP

2012

Gabriela Dinois Merussi

**INFLUÊNCIA DA VARIEDADE E REGIÃO DE CULTIVO SOBRE
COMPOSTOS BIOATIVOS, ATIVIDADE ANTIOXIDANTE
E COR DE LARANJAS DE POLPA VERMELHA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Alimentos e Nutrição da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, UNESP, para obtenção do título de Mestre em Alimentos e Nutrição.

Profa. Dra. Célia Maria de Sylos

Orientadora

Araraquara - SP

2012

Ficha Catalográfica

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

Merussi, Gabriela Dinois

M575i Influência da variedade e região de cultivo sobre compostos bioativos,
atividade antioxidante e cor de laranjas de polpa vermelha / Gabriela Dinois
Merussi. – Araraquara, 2012
89 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. Laranjas. 2. Ácido ascórbico. 3. Compostos fenólicos. 3. Flavanonas.
4. Carotenóides. 5. Antioxidante. 6. Cor. I. Sylos, Célia Maria de, orient. II.
Título.

CAPES: 50700006

COMISSÃO EXAMINADORA

Profa. Dra. Célia Maria de Sylos
Orientadora

Prof. Dr. Rodrigo Rocha Latado

Profa. Dra. Daniela Cardoso Umbelino Cavallini

Prof. Dra. Eliane Maria Ravasi Stéfano Simionato

DEDICATÓRIA

Aos meus amados pais, Rogério e Vera,
que fizeram de tudo para me proporcionar uma boa educação.

Sempre me dando muito amor.

Ao meu namorado Matheus,
que apóia todas as minhas decisões e me dá forças para eu continuar
na luta pelas realizações dos meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

Especialmente a Deus, que esta em todos os momentos da minha vida me guiando, protegendo e me dando força.

À professora Dra.Célia Maria de Sylos por sua paciente orientação, e por palavras, que em momentos difíceis me trouxeram tranquilidade em seguir em frente.

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

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

À comissão examinadora por aceitarem participar da banca e colaborar na melhoria deste trabalho.

Às pessoas dos laboratórios que freqüentei: análise de alimentos, pró-bióticos e pré-bióticos, e controle de qualidade. E a todos espalhados no departamento de alimentos e nutrição: funcionários, pós-graduandos e professores. Posso falar sem medo de errar que muitos destes tornaram-se verdadeiros amigos, pois estavam ao meu lado em muitos momentos felizes, mas também, em muitos difíceis e cansativos. Apenas não mencionarei nomes por que são muitos, e se por alguma hipótese esquecesse um, ficaria muito triste.

Às secretárias da pós-graduação por seus auxílios e competências.

À CAPES pelo auxílio financeiro concedido.

“Consulte não a seus medos, mas a suas esperanças e sonhos. Pense não sobre suas frustrações, mas sobre seu potencial não usado. Preocupe-se não com o que você tentou e falhou, mas com aquilo que ainda é possível a você fazer.”

Papa João XXIII

RESUMO

A laranja é a fruta mais consumida mundialmente, tanto *in natura* como na forma de suco. Atualmente no Brasil vêm sendo cultivadas variedades de laranjas de polpa vermelha, laranjas estas que diferem das de polpa clara por possuírem o licopeno na sua composição de carotenóides. Sabe-se que as laranjas apresentam vários compostos bioativos benéficos a saúde humana como carotenóides, vitaminas e compostos polifenólicos, porém, ainda são poucas essas informações a respeito das laranjas de polpa vermelha. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi comparar três variedades de laranjas de polpa vermelha (Sanguínea de Mombuca (SM), Baía Cara-Cara (BCC) e Valência Puka (VP)) com uma variedade de polpa clara (Valência) cultivadas em três cidades do Estado de São Paulo (Barretos, Bofete e Ibaté) em relação às características físico-químicas, a presença de compostos bioativos (ácido ascórbico, fenólicos totais, flavanóides totais, carotenóides totais, e principais flavanonas glicosídicas e carotenóides), capacidades antioxidantes e parâmetros de cor, e, além disso, verificar o efeito das condições ambientais das cidades de cultivo sobre os parâmetros analisados. Com os resultados observou-se que as laranjas de polpa vermelha em comparação a variedade Valência mostraram ter sucos menos ácidos e uma cor mais escura, com maior saturação da cor vermelha e de maior vivacidade. Não apresentaram diferenças significativas nas concentrações de ácido ascórbico, compostos fenólicos totais, narirutina, hesperidina, violaxantina, zeaxantina e α -caroteno. Para os flavonóides totais, apenas as laranjas VP cultivadas em Barretos e Ibaté apresentaram os maiores teores significativos. Os conteúdos de carotenóides não apresentaram diferenças significativas entre as variedades de polpa vermelha, porém estas mostraram ter de 20 a 76% a mais de teores de carotenóides totais que as laranjas Valência, e o mesmo comportamento foi observado para as concentrações do β -caroteno, β -criptoxantina e luteína que apresentaram respectivamente um aumento de 230 a 375%, 36 a 65%, e de até 37%. O licopeno foi identificado apenas nas laranjas de polpa vermelha. Os maiores teores de alguns carotenóides foram obtidos pelas laranjas cultivadas em Bofete, cidade que esta localizada em uma altitude intermediária em relação a Barretos e Ibaté, e caracterizada por apresentar temperaturas amenas. Já, os menores conteúdos de ácido ascórbico, carotenóides totais, β -caroteno, β -criptoxantina e violaxantina foram obtidos pelas laranjas de Barretos, cidade que localiza-se em uma menor altitude e apresenta temperaturas elevadas. A SM foi a variedade que apresentou maior capacidade antioxidante, e dentre os compostos quantificados, o ácido ascórbico foi o que mais contribuiu para esta propriedade, seguido pelos carotenóides totais e compostos fenólicos totais. Pelos resultados obtidos verificou-se que as condições ambientais das cidades de cultivo influenciaram nas características físico-químicas e composição de compostos bioativos, e estes também diferiram entre as laranjas de polpa vermelha e laranjas de polpa clara.

Palavras-chaves: laranjas; ácido ascórbico; compostos fenólicos; flavanonas; carotenóides; antioxidante; cor.

ABSTRACT

Orange is the fruit more consumed worldwide both as fresh as juice. Currently in Brazil is being cultivated varieties of red pulp oranges, and these differ from pulp clear by present lycopene in their carotenoid composition. It is known that oranges have several bioactive compounds beneficial to human health such as carotenoids, vitamins and polyphenolic compounds, however, almost no one has such information about the red pulp oranges. Thus, the objective of this study was to compare three varieties of oranges red pulp (Sanguínea de Mombuca (SM), Baia Cara-Cara (BCC) and Valência Puka (VP)) with a variety of clear pulp (Valência) grown in three cities of State of São Paulo (Barretos, Bofete and Ibaté) in relation to physical and chemical characteristics, the presence of bioactive compounds (ascorbic acid, total phenolics, total flavonoids, total carotenoids, and main flavanone glycosides and carotenoids), antioxidants capacities and color parameters, and also check the effect of environmental conditions of cities of cultivation on the parameters analyzed. With the results it was observed that red pulp oranges when compared with variety Valência showed juices less acid and a color darker with greater saturation of red coloration and higher vivacity. No significant differences in the concentrations of ascorbic acid, total phenolics, narirutina, hesperidin, violaxanthin, zeaxanthin and α -carotene. For flavonoids, only VP oranges grown in Barretos and Ibaté showed significant higher levels. The content of carotenoids showed no significant differences between the varieties of red pulp oranges, but these proved to have 20-76% more total carotenoid than Valência oranges, and the same behavior was observed for concentrations of β -carotene, β -cryptoxanthin, and lutein which respectively showed an increase 230-375%, 36-65% and up to 37%. Lycopene was identified only in red oranges. The highest levels of some carotenoids were obtained by the oranges grown in Bofete, a city that is located at an intermediate altitude in relation Ibaté and Barretos, and characterized by the mild temperatures. Already, the lower content of ascorbic acid, total carotenoids, β -carotene, β -cryptoxanthin and violaxanthin were obtained by Barretos oranges, a town located at a lower altitude and presents high temperatures. The variety SM presented the highest antioxidant capacity, and among the quantified compounds, ascorbic acid was the largest contributor to this property, followed by total carotenoids and phenolic compounds. By the results obtained verified that the environmental conditions of cultivation cities influence on the physico-chemical characteristics and composition of bioactive compounds, and these also differed between to oranges red pulp and oranges clear pulp .

Keywords: oranges; ascorbic acid; phenolics compounds; flavanones; carotenoids; antioxidant; color.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL.....	10
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	11
OBJETIVOS.....	13

CAPÍTULO 1

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
1. Laranjas.....	15
1.1. Produção no Brasil.....	15
1.2. Classificação em função da cor da polpa.....	15
2. Estresse oxidativo e agentes antioxidantes	17
2.1. Compostos antioxidantes presentes nas laranjas	18
2.1.1. Ácido ascórbico.....	18
2.1.2. Compostos fenólicos.....	19
2.1.3. Carotenóides	21
2.2. Fatores que podem influenciar o conteúdo dos compostos bioativos.....	25
2.2.1. Importância da avaliação das variedades e condições ambientais de cultivo.....	26
3. Métodos para avaliação das capacidades antioxidantes.....	27
4. Medição de cor	28
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	30

CAPÍTULO 2

COMPOSTOS BIOATIVOS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE VARIEDADES DE LARANJAS DE POLPA VERMELHA CULTIVADAS EM DIFERENTES REGIÕES.....	38
RESUMO.....	39
ABSTRACT	40
INTRODUÇÃO.....	41
MATERIAL.....	42
MÉTODOS	43
Determinação de sólidos solúveis totais, acidez titulável total e <i>ratio</i>	43
Determinação de ácido ascórbico	43
Determinação de compostos fenólicos totais	44
Determinação de flavonóides totais	44
Determinação de carotenóides totais.....	45
Determinação das capacidades antioxidantes	45
Método ABTS.....	45
Método DPPH.....	46
Análise estatística.....	46
RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
Sólidos solúveis totais, acidez titulável total e <i>ratio</i>	47
Compostos bioativos.....	49

Capacidades antioxidantes	53
Correlação entre os compostos bioativos e as capacidades antioxidantes	55
CONCLUSÃO	57
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58

CAPÍTULO 3

INFLUÊNCIA DA VARIEDADE E REGIÃO DE CULTIVO SOBRE FLAVANONAS, CAROTENÓIDES E COR DE LARANJAS DE POLPA VERMELHA	63
RESUMO	64
ABSTRACT	65
INTRODUÇÃO	66
MATERIAL	67
MÉTODOS	69
Extração de flavanonas glicosídicas	69
Separação e quantificação de flavanonas glicosídicas	69
Extração e quantificação de carotenóides totais	70
Separação e quantificação dos carotenóides isolados	70
Análise de cor	71
Análise estatística	71
RESULTADOS E DISCUSSÃO	72
Separação e quantificação de flavanonas glicosídicas	72
Separação e quantificação de carotenóides	73
Carotenóides sob efeito da variabilidade genética e condições ambientais	79
Avaliação dos parâmetros de cor	80
CONCLUSÃO	82
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	84
CONCLUSÕES GERAIS	89

INTRODUÇÃO GERAL

A laranja é a fruta mais aceita e consumida mundialmente, tanto na forma *in natura* como de suco. É conhecida por ser importante fonte de compostos bioativos como ácido ascórbico, compostos fenólicos, flavonóides e carotenóides, compostos estes de grande interesse de cientistas, consumidores e indústrias, visto que apresentam potencial atividade antioxidante, pois evitam ou diminuem significativamente efeitos adversos de espécies reativas na função fisiológica normal de seres humanos. Com isso, estudos sugerem que o consumo de laranjas auxilia na prevenção do envelhecimento precoce e atuam na proteção contra alguns tipos de câncer, doenças cardiovasculares, doença de Alzheimer, diabetes, catarata, degeneração macular relacionada à idade, entre outras (SILALAH, 2002; KUSKOSKI et al., 2005; PIMENTEL et al., 2005; SUN e TANUMIHARDJO, 2007; JAYAPRAKASHA e PATIL, 2007; PELLEGRINI et al., 2007; KARADAG et al., 2009; YAHIA, 2010; ALVES et al., 2010).

Segundo Bitters (1961), as laranjas podem ser classificadas em função da coloração de suas polpas em laranjas claras e sanguíneas. As laranjas claras são caracterizadas pela cor amarela-alaranjada devido à presença dos pigmentos carotenóides, já as laranjas sanguíneas apresentam coloração vermelho-intensa em função da presença de antocianinas.

Atualmente foi descrito um novo grupo de laranjas, denominado laranjas de polpa vermelha ou falsas-sanguíneas. Estas diferem das laranjas claras por apresentarem maiores concentrações de alguns carotenóides e também por possuírem o licopeno, carotenóide de coloração vermelha que não está presente nas laranjas de polpa clara (SAUNT, 2000; LEE, 2001; XU et al., 2006; LIU et al., 2007; FANCIULLINO et al., 2008; LATADO et al., 2008; MOURA, 2010). Variedades destas laranjas: Sanguínea de Mombuca, Valência Puka e Baia Cara-Cara começaram a ser cultivadas no Brasil.

Acredita-se que laranjas de polpa vermelha apresentariam grande potencial de comercialização, visto que já é de conhecimento que apresentam compostos bioativos benéficos à saúde humana, porém, ainda existem poucas informações sobre estes compostos sob influência de diferentes variedades e condições ambientais de cultivo.

Devido aos fatos apresentados parece ser de grande importância agregar conhecimento de valor nutricional, e de qualidade do ponto de vista comercial das variedades de laranjas de polpa vermelha. Com isso, o objetivo deste trabalho foi comparar três variedades de laranjas de polpa vermelha com uma de polpa clara em relação à caracterização físico-química, e determinações dos compostos bioativos, capacidades antioxidantes e parâmetros de cor dos sucos. E, além disso, verificar se estes parâmetros também sofrem com a influência das localizações geográficas e condições ambientais de três cidades de cultivo no Estado de São Paulo, Brasil.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, C.Q.; DAVID, J.M.; DAVID, J.P.; BAHIA, M.V.; AGUIAR, R.M. Methods for determination of in vitro antioxidant activity for extracts and organic compounds. **Quím. Nova.**, v.33, n.10, p.2202-2210, 2010.

BITTERS, W.P. Physical characters and chemical composition as affected by scions and rootstocks. In: SINCLAIR, W.B. (Ed.). **The orange: its biochemistry and physiology**. Riverside: The University of California, 1961. p.56-95.

FANCIULLINO, A.L.; CERCOS, M.; DHUIQUE-MAYER, C.; FROELICHER, Y.; TALON, M.; OLLITRAULT, P.; MORILLON, R. Changes in carotenoid content and biosynthetic gene expression in juice sacs of four orange varieties (*Citrus sinensis*) differing in flesh fruit color. **J. A. Food Chem.**, v.56, n.10, p.3628-3638, 2008.

JAYAPRAKASHA, G.K.; PATIL, B.S. In vitro evaluation of the antioxidant activities in fruit extracts from citron and blood orange. **Food Chem.**, v.101, p.410-418, 2007.

KARADAG, A.; OZCELIK, B.; SANER, S. Review of methods to determine antioxidant capacities. **Food Anal. Methods**, v.2, p.41-60, 2009.

KUSKOSKI, E.M.; ASUERO, A.G.; TRONCOSO, A.M.; MANCINI-FILHO, J; FETT, R. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v.25, n.4, p. 726-732, 2005.

LATADO, R.R.; VOIGT, V.; NISHIMURA, D.S.; LEAO, H.C.; SYLOS, C.M. Laranjas de polpa vermelha. Caracterização de frutos e do suco dos frutos. Anais do XX Congresso Brasileiro de Fruticultura. 54th Annual Meeting of the Interamerican Society for Tropical Horticulture. Vitória/ES, 12-17 de Out., 2008.

LEE, H.S. Characterization of carotenoids in juice of red Navel orange (Cara Cara). **J. Agric. Food Chem.**, v.49, n.5, p.2563-2568, 2001.

LIU, Q.; XU, J.; LIU, Y.Z.; ZHAO, X.L.; DENG, X.X.; GUO, L.L.; GU, J.Q. A novel bud mutation that confers abnormal patterns of lycopene accumulation in sweet orange fruit (*Citrus sinensis* L. Osbeck). **J. Exp. Bot.**, v.58, n.15-16, p.4161-4171, 2007.

MOURA, L.M. **Compostos bioativos em frutas cítricas: quantificação, avaliação da atividade antioxidante, parâmetros de cor e efeito da pasteurização.** 2010. 142f. Tese (Doutorado em Alimentos e Nutrição) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara-SP, 2010.

PELLEGRINI, N.; COLOMBI, B.; SALVATORE, S.; BRENNAN, O.V.; GALAVERNA, G.; RIO, D.D.; BIANCHI, M.; BENNETT, R.N.; BRIGHENTI, F. Evaluation of antioxidant capacity of some fruit and vegetable foods: efficiency of extraction of a sequence of solvents. **J. Sci. Food Agric.**, v.87, p.103-111, 2007.

PIMENTEL, C.V.M.; FRANCKI, V.M.; GOLLÜCKE, A.P.B. **Alimentos funcionais: introdução as principais substâncias bioativas em alimentos.** São Paulo: Ed. Varela, 2005. 95 p.

SAUNT J: **Citrus varieties of the world.** Sinclair International Ltd., Norwich, England; 2000.

SILALAH, J. Anticancer and health protective properties of citrus fruit components. **Asia Pac. J. Clin.Nutr.**, v.11, p.79-84, 2002.

SUN, T.; TANUMIHARDJO, S.A. An integrated approach to evaluate food antioxidant capacity. **J. Food Sci.**, v.72, n.9, 2007.

XU, C.J.; FRASER, P.D.; WANG, W.J.; BRAMLEY, P.M. Differences in the carotenoid content of ordinary citrus and lycopene-accumulating mutants. **J. Agric. Food Chem.**, v.54, n.15, p.5474-5481, 2006.

YAHIA, E.M. The contribution of fruit and vegetable consumption to human health. In: ROSA, L.A.; ALVAREZ-PARRILLA, E.; GONZALEZ-AGUILAR, G.A. **Fruit and vegetable phytochemicals: chemistry, nutritional value and stability.** Hoboken: Wiley-Blackwell, 2010. p.3-51.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Comparar três variedades de laranjas de polpa vermelha (Sanguínea de Mombuca, Baia Cara-Cara e Valência Puka) com uma variedade de polpa clara (Valência), cultivadas nas mesmas condições em três cidades, em relação à presença de compostos bioativos, atividade antioxidante e parâmetros de cor.

Objetivos Específicos

- Determinar os sólidos solúveis totais, acidez total titulável e *ratio*, e teores de ácido ascórbico, fenólicos totais, flavonóides totais e carotenóides totais.
- Identificar e quantificar as principais flavanonas glicosídicas e os principais carotenóides.
- Correlacionar os parâmetros de cor com os teores de carotenóides totais.
- Avaliar as capacidades antioxidantes pelos métodos ABTS e DPPH.
- Correlacionar os compostos bioativos com as capacidades antioxidantes.
- Verificar o efeito das localizações geográficas e condições ambientais das três cidades de cultivo (Barretos, Bofete e Ibaté do Estado de São Paulo, Brasil) sobre os parâmetros analisados.

CAPÍTULO 1

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. Laranjas

1.1. Produção no Brasil

O Brasil é o país líder na produção de laranjas. A safra 2009/2010 teve uma produção de 16.238.000 toneladas métricas, equivalente a 32,62% da produção mundial. Além disso, também lidera na produção e exportação de suco de laranja, nesta safra, produziu 1.330.000 e exportou 1.320.000 toneladas métricas - 65° Brix, equivalente respectivamente a 61,18% e 86,59% da produção e exportação mundial (AGRIANUAL, 2011).

A laranja é a fruta mais plantada no país e seu cultivo está presente em todos os Estados brasileiros. Comparativamente, os pomares de laranja ocupam uma área 20 vezes superior do que os pomares de maçã, 10 vezes maior aos de manga e às plantações de uva, e aproximadamente o dobro das terras destinadas ao cultivo de banana. O Estado de São Paulo detém 70% da área plantada de pomares de laranja (NEVES et al., 2010), é o principal pólo produtor, tendo sido responsável em 2010 por 78,43% da produção nacional (AGRIANUAL, 2011).

Existe uma grande diversidade de variedades de laranjas, atualmente, os pomares do Estado de São Paulo apresentam 55% das árvores das variedades tardias (Valência e Natal), 23% com variedades precoces (Hamlin, Westin, Rubi e Pineapple) e 22% com variedade meia estação (Pêra Rio). Os citricultores têm preferência pelas variedades tardias em função da sua maior produtividade, qualidade de seus frutos e importância econômica (NEVES et al., 2010).

1.2. Classificação em função da cor da polpa

Segundo Bitters (1961), as laranjas podem ser classificadas em função da coloração de suas polpas em laranjas claras e em laranjas sanguíneas.

As laranjas de polpa clara são caracterizadas por apresentar coloração amarela-alaranjada na polpa e no suco devido à presença de pigmentos carotenóides. Estes pigmentos quando sofrem alterações em suas concentrações fazem com que ocorra conseqüentemente variações na coloração. Entre os

carotenóides, β -criptoxantina é considerado o principal contribuinte para a cor alaranjada enquanto que luteína e violaxantina para a cor amarela (MOULY et al., 1999). A classe das laranjas de polpa clara englobam quase que a totalidade das laranjas comerciais cultivadas no mundo, incluindo as variedades de mesa (laranjas Baías, Navel, Baianinhas e outras), variedades usadas para a extração de suco (Pêra, Valência, Natal e Hamlin), laranjas sem acidez (Laranja Lima, Serra d'água) e outras (CTENAS et al., 2000).

Já as laranjas sanguíneas são caracterizadas pela coloração vermelho-intensa (violácea ou roxa) na polpa e no suco, devido a presença do pigmento antocianina que é solúvel em água (BITTERS, 1961; MACCARONE et al., 1983). Estas laranjas são originárias da região Mediterrânea, provavelmente de Malta ou da região da Sicília (Itália), e têm sido cultivadas há vários séculos, principalmente na Itália, Espanha, Marrocos, locais com clima ameno ou clima mediterrâneo e maior amplitude térmica diária (dias quentes e noites frias), os quais favorecem a presença da coloração violácea. As variedades mais conhecidas são: Moro, Tarroco e Sanguinelo (RAPISARDA et al., 2001).

Atualmente foi descrito outro grupo de laranjas, denominadas laranjas de polpa vermelha ou falsas-sanguíneas. Estas apresentam como característica diferencial a coloração vermelha na polpa, mas que não se transfere totalmente para o suco. Variedades destas laranjas não possuem antocianinas e diferem das laranjas de polpa clara por apresentarem maiores concentrações de alguns carotenóides, principalmente o β -caroteno, e também por possuírem o licopeno, carotenóide de coloração vermelha que não é identificado nas laranjas de polpa clara (SAUNT, 2000; LEE, 2001; XU et al., 2006; LIU et al., 2007; FANCIULLINO et al 2008; LATADO et al., 2008; MOURA, 2010). Recentemente, variedades destas laranjas: Sanguínea de Mombuca, Valência Puka e Baia Cara-Cara começaram a ser cultivadas no Brasil.

Ao contrário das laranjas sanguíneas, as laranjas de polpa vermelha apresentam coloração vermelha mesmo quando cultivadas em regiões quentes ou

de baixa amplitude térmica diária, e teoricamente, devem apresentar polpa com coloração ainda mais intensa, quando plantadas em regiões de clima ameno e/ou de alta amplitude térmica diária (LATADO, 2008).

2. Estresse oxidativo e agentes antioxidantes

O processo de oxidação é a conversão de uma substância química em um derivado com menor número de elétrons, ou seja, é a perda de um ou mais elétrons para outra substância (LARSON, 1997). Esta transferência de elétrons é um processo químico fundamental para a sobrevivência das células, porém, simultaneamente a este processo ocorre a produção de radicais livres e de outras espécies reativas de oxigênio que podem causar danos oxidativos ao organismo humano (BAE et al., 1999).

No organismo, os radicais livres possuem diferentes funções e encontram-se envolvidos na produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular, sinalização intercelular e síntese de substâncias biológicas (HALLIWELL et al., 1992), entretanto, seu excesso apresenta efeitos deletérios tais como danos ao DNA, proteínas e organelas celulares, provocando nestas alterações na estrutura e funções, e assim, envolvidos no envelhecimento precoce e em diversas patologias como câncer, doenças cardiovasculares, degenerativas e neurológicas, choque hemorrágico, catarata, disfunções cognitivas entre outras (HALLIWELL et al., 1992; SILALAH, 2002; PIMENTEL et al., 2005; SUN e TANUMIHARDJO, 2007; JAYAPRAKASHA e PATIL, 2007; PELLEGRINI et al., 2007; KARADAG et al., 2009; ALVES et al., 2010; MAIANI et al., 2009; YAHIA, 2010).

O próprio organismo produz substâncias com função antioxidante que tem a capacidade de combater os radicais livres, regenerando ou prevenindo os danos oxidativos, porém muitas vezes é insuficiente para o combate, podendo então o organismo sofrer ações degenerativas através de um distúrbio conhecido como estresse oxidativo (ALVES et al., 2010). Devido a isso, tem sido crescente a atenção de cientistas, consumidores e indústrias sobre substâncias de fontes externas, como

alimentos e bebidas, que também apresentam capacidade antioxidante, pois possuem a habilidade de sequestrar radicais livres, neutralizando o estresse oxidativo responsável por provocar várias doenças humanas. (SILALAH, 2002; PIMENTEL et al., 2005; SUN e TANUMIHARDJO, 2007; JAYAPRAKASHA e PATIL, 2007; PELLEGRINI et al., 2007; KARADAG et al., 2009, ALVES et al., 2010; MAIANI et al., 2009; YAHIA, 2010).

Os antioxidantes alimentares são definidos como substâncias que quando presentes em baixas concentrações em comparação com os substratos oxidáveis evitam ou diminuem significativamente os efeitos adversos de espécies reativas na função fisiológica normal de seres humanos, normalmente atuando quelando metais de transição e inibindo reações de radicais em cadeias, oxigênio singlete e enzimas oxidativas (HUANG et al., 2005).

2.1. Compostos antioxidantes presentes nas laranjas

As laranjas *in natura* e em forma de suco são fontes de compostos bioativos com potencial atividade antioxidante, como ácido ascórbico, compostos fenólicos e carotenóides. Estes são discutidos a seguir.

2.1.1. Ácido ascórbico

A laranja contém alto teor de ácido ascórbico (AA), principal forma biologicamente ativa da vitamina C. É um antioxidante natural hidrossolúvel nos fluidos biológicos que inibe o desenvolvimento das principais condições oxidativas, sendo necessário à prevenção e manutenção da saúde da pele, gengivas e vasos sanguíneos. Também atua na prevenção de aterosclerose, doenças cardiovasculares e algumas formas de câncer, além de possuir diversas funções biológicas na formação de colágeno, absorção de ferro inorgânico, redução do nível de colesterol, inibição da formação de nitrosaminas e fortalecimento do sistema imunológico (LEE e KADER, 2000; SILALAH, 2002).

As frutas cítricas são fontes ideais de vitamina C e a concentração desse micronutriente nessas é influenciada por diversos fatores pré e pós-colheita, desde o cultivar utilizado, até condições climáticas, como práticas de plantio, método de colheita e processamento (LEE e KADER, 2000).

O Ministério da Agricultura e do Abastecimento (BRASIL, 2000) descreve em regulamento técnico geral para fixação dos padrões de identidade e qualidade para polpa de fruta, que os sucos de laranja não podem apresentar teores inferiores a 25 mg de ácido ascórbico em 100 mL de suco. E segundo o Ministério da Saúde BRASIL (2005), um conteúdo médio de 45 mg de ácido ascórbico, é o valor recomendado na ingestão diária de Vitamina C para um adulto, ou seja, se um suco de laranja estiver dentro dos padrões de qualidade, ao beber um copo de 200 mL deste, o organismo já receberia até mais que a recomendação diária desta vitamina.

A determinação de ácido ascórbico por titulação com 2,6 diclorofenol-indofenol é considerado um método rápido, fácil e barato, de modo que tem sido largamente utilizado. A única desvantagem é que por este método não se detecta o ácido dehidroascórbico, porém, segundo estudo de Sánchez-Moreno et al. (2003b) em que analisaram ácido ascórbico e ácido dehidroascórbico nas laranjas, verificaram que este último contribuiu muito pouco para a atividade de vitamina C.

2.1.2. Compostos fenólicos

Compostos fenólicos são uma das maiores classes de metabólitos secundários das plantas, sendo essenciais para o seu crescimento e reprodução, e são sintetizados principalmente em condições de estresse como infecções, ferimentos, radiações UV, dentre outros. Em alimentos, esses compostos são responsáveis pela cor, adstringência, aroma e estabilidade oxidativa (NACZK e SHAHIDI, 2006; CARVALHO et al., 2006).

Os compostos fenólicos apresentam mais de 8000 substâncias identificadas, e podem ser divididos em grupos, de acordo com a sua estrutura química (ROSS e KASUM, 2002). A esta classe pertencem: flavonóides, flavinóides, ácidos fenólicos,

cumarinas, taninos e lignina. Nas frutas cítricas, os flavonóides aparecem com destaque, e quatro tipos ocorrem com freqüência: flavanonas, flavonas, flavonóis e antocianinas. As flavanonas glicosídicas são as principais, pois nas frutas cítricas se acumulam em maior quantidade e são responsáveis pelo sabor e turvação dos sucos cítricos (BENAVENTE-GÁRCIA e CASTILLO, 2008).

As flavanonas glicosídicas, hesperidina e narirutina, são as principais em sucos de laranjas (RAPISARDA et al., 1999; GIL-IZQUIERDO et al., 2001; SÁNCHEZ-MORENO et al., 2003a; GATTUSO et al., 2007; MOURA e SYLOS, 2008), outras também identificadas são: naringina, neohesperidina, didimina e apigenina (KELEBEK et al., 2009). Hesperidina e narirutina são dominantes nas laranjas doces (*C. sinensis*), enquanto que neohesperidina e naringina, nas laranjas azedas (*C. aurantium*). A principal diferença entre estas está em suas moléculas de açúcar que influenciam o gosto (PETERSON, 2006).

Além de influenciar nos fatores sensoriais das laranjas, as flavanonas e os compostos fenólicos como um todo apresentam importante papel na saúde humana, pois agem como antioxidantes, não somente por sua habilidade em doar hidrogênio ou elétrons, mas também em virtude de seus radicais intermediários estáveis que tem a capacidade de impedir a oxidação de vários ingredientes do alimento, particularmente de lipídios (BRAND-WILLIAMS et al., 1995; RAPISARDA et al., 2001).

As flavanonas, em especial a hesperidina, têm mostrado uma vasta gama de propriedades terapêuticas. Estas são consideradas diuréticas, hipolipidêmicas, analgésicas, antiinflamatórias e antialérgicas, e estudos relatam que o seu consumo também auxilia na prevenção de câncer, aterosclerose e hipertensão (MERKEN e BEECHER, 2000; MANTHEY et al., 2001; ATURKI et al., 2004; BENAVENTE-GÁRCIA e CASTILLO, 2008; VINUEZA et al., 2008).

O conteúdo de compostos fenólicos nas plantas pode ser influenciado por numerosos fatores, como o amadurecimento, fatores ambientais, processamento e estocagem (MANACH et al., 2004). Outro ponto a ser considerado é que existem

diversos métodos de determinação destes compostos, e o modo de extração destes e a reação realizada para suas determinações podem os alterar de forma significativa (GHAFAR et al., 2010).

2.1.3. Carotenóides

Os carotenóides são pigmentos naturais lipofílicos responsáveis pela coloração amarela, laranja e vermelha de muitos alimentos, e com isso são considerados muito importantes na aceitação destes, uma vez que a cor é um dos atributos de qualidade que mais influenciam na escolha dos consumidores (RODRIGUEZ-AMAYA et al., 2008). No entanto, são seus efeitos de prevenção e/ou proteção à saúde que despertam o interesse de pesquisas científicas (TIBBLE, 1998; SLATTERY et al., 2000; CANTUTI-CASTELVETRI et al., 2000; SHAMI e MOREIRA, 2004; FRASER e BRAMLEY, 2004; KRINSKY e JOHNSON, 2005; RIBAYA-MERCADO e BLUMBERG, 2007; RAO e RAO, 2007; RODRIGUEZ-AMAYA et al., 2008; MAIANI et al., 2009).

Os carotenóides dos alimentos são tetraterpenóides (C_{40}) e a característica de maior destaque nestas moléculas é o cromóforo, um sistema extenso de duplas ligações conjugadas responsável por conferir cores aos carotenóides (RODRIGUEZ-AMAYA et al., 2008).

As frutas cítricas e em destaque as laranjas são potenciais fontes de carotenóides, sendo relatado nestas, mais de 115 tipos de pigmentos (ROUSEFF e RALEY, 1996; FANCIULLINO et al., 2006), e são estes os responsáveis pela coloração característica da casca e da polpa de laranjas claras maduras (MELÉNDEZ-MARTÍNEZ et al., 2007).

É importante também lembrar que existem mais dois grupos de laranjas, as laranjas sanguíneas que apresentam coloração vermelho-intensa na polpa e no suco devido à presença dos carotenóides, mas também, e principalmente por, conter o pigmento antocianina (ARENA et al., 2000; LEE, 2002; KELEBEK et al., 2008; FANCIULLINO et al., 2008), e laranjas de polpa vermelha, caracterizadas pela

coloração vermelha na polpa devido a presença de maiores teores de alguns carotenóides do que as laranjas claras, e mais a presença do licopeno, carotenóide de pigmentação vermelha que não é identificado nas laranjas polpa clara (SAUNT, 2000; LEE, 2001; XU et al., 2006; LIU et al., 2007; FANCIULLINO et al., 2008; LATADO, 2008; MOURA, 2010).

Nos estudos de composição de carotenóides em sucos de laranjas claras, os principais carotenóides encontrados são: luteína, β -criptoxantina, zeaxantina, violaxantina, luteína-5,6-epóxido, anteraxantina, α -caroteno, β -caroteno, ζ -caroteno, α -criptoxantina, luteoxantina, mutatoxantina, auroxantina e neoxantina, e seus isômeros; e em menores freqüências e concentrações encontram-se: citraurina, trolicromo, trolixantina e neocromo (MOULY et al., 1999; LEE, 2001; LEE e CASTLE, 2001; LEE et al., 2001; CORTÉS et al., 2004; GAMA e SYLOS, 2005; MELÉNDEZ-MARTÍNEZ et al., 2007). Destes carotenóides, os mais pesquisados são os que têm envolvimento na saúde humana: β -caroteno, α -caroteno, β -criptoxantina, licopeno, luteína e zeaxantina (Figura 1.), e também, violaxantina, por ter ampla distribuição alimentar, porém ainda precisam ser desvendadas suas implicações na saúde (RODRIGUEZ-AMAYA et al., 2008).

Os carotenóides: α -caroteno, β -caroteno, β -criptoxantina, luteína e zeaxantina apresentam atividade antioxidante (HIX et al., 2004; SMIDT e BURKE, 2004; SHAMI e MOREIRA, 2004), e destes, os três primeiros também exercem atividade pró-vitâmica A, sendo o β -caroteno o principal, pois apresenta 100% desta atividade, enquanto os demais 50 % ou menos (CORTÉS et al., 2004; RODRIGUEZ-AMAYA et al., 2008).

O carotenóide licopeno é encontrado em alimentos como tomate, goiaba, melancia, mamão e recentemente encontrado nas laranjas de polpa vermelha (SAUNT, 2000; LEE, 2001; XU et al., 2006; LIU et al., 2007; FANCIULLINO et al., 2008; LATADO, 2008; MOURA, 2010). Este aparece atualmente como um dos mais potentes agentes antioxidantes naturais, e está sendo sugerido na prevenção de doenças cardiovasculares e de carcinogênese, com maiores evidências benéficas

para tumores de próstata, pulmão e estômago (CLINTON, 1998; GIOVANNUCCI, 1999; SHAMI e MOREIRA, 2004; KRIS-ETHERTON et al., 2002, RAO e RAO, 2007). Além disso, o licopeno pode ser responsável por efeitos benéficos realizados por mecanismos não-antioxidantes, pois o aumento de sua concentração no corpo pode regular funções de genes, modular a resposta hormonal e imune, diminuindo assim o risco de aparecimento de doenças crônicas (ARGAWAL e RAO, 2000).

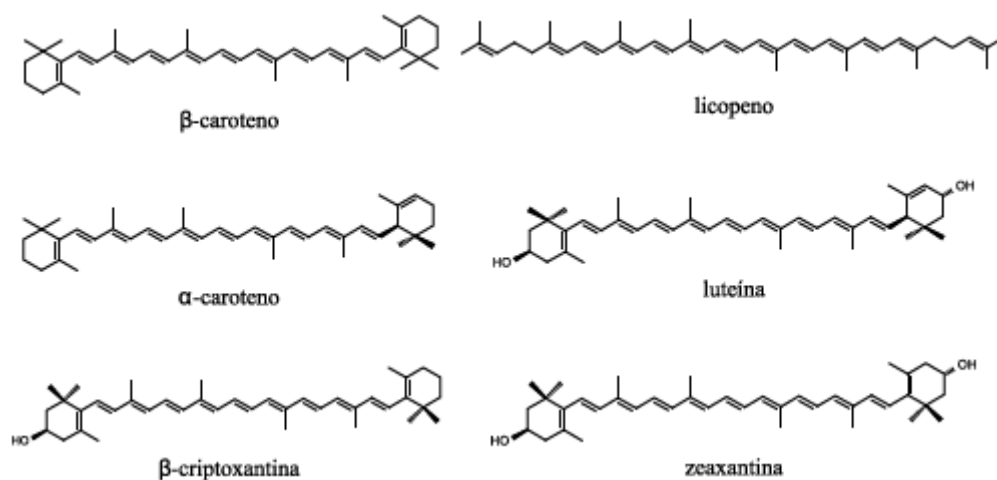


Figura 1. Estruturas dos carotenoides considerados importantes para a saúde.

Fonte: RODRIGUEZ-AMAYA et al., 2008.

Luteína e zeaxantina também apresentam ação antioxidante que protege as células contra os radicais livres. O consumo destes deve estar associado a uma alimentação equilibrada e hábitos de vida saudáveis (BRASIL, 2008). Estes carotenóides têm sido relacionando à proteção contra doenças dos olhos, como degeneração macular relacionada à idade e catarata, na prevenção de alguns tipos de câncer, em particular os de mama e pulmão, e também na diminuição de riscos de doenças cardíacas e acidente vascular cerebral (RIBAYA-MERCADO e BLUMBERG, 2004).

A composição dos carotenóides nas laranjas pode ser afetada por diversos fatores como genéticos, estágio da maturação, condições ambientais, localização geográfica, manuseio durante e pós colheita, processamento e estocagem (RODRIGUEZ-AMAYA, 1999; LEE, 2001; LEE e CASTLE, 2001; KATO et al., 2004;

RODRIGO et al. 2004; FANCIULLINO et al., 2006; MELÉNDEZ-MARTÍNEZ, 2007; FANCIULLINO et al., 2008; MAIANI et al., 2009; DHUIQUE-MAYER et al. 2009; BERNARDI et al., 2010).

No trabalho de Dhuique-Mayer et al. (2009) em que estudaram o efeito do genótipo e fatores ambientais no conteúdo de carotenóides em sucos citricos relataram que de seis variedades de frutas citricas, as laranjas doces foram as que mais sofreram com a influência ambiental, pois quando cultivadas em clima mediterraneo apresentaram maiores teores de carotenóides totais, e também aumento de teores de violaxantina, β -criptoxantina e β -caroteno do que quando cultivadas em climas tropicais e subtropicais, característica esta também descrita por Mouly et al. (1999) em estudo com laranjas Valência. Com estes dados, verifica-se grande necessidade da associação de uma análise de perfil e quantificação de carotenóides presentes em laranjas com suas variedades e condições ambientais de cultivo.

Nas análises de carotenóides, outro aspecto a ser considerado é o método analítico utilizado. Devido o fato dos carotenóides serem altamente suscetíveis a isomerização ou degradação pela presença de luz, calor, oxigênio, ácidos, metais, entre outros, uma série de precauções bem relatadas na literatura devem ser tomadas durante as etapas de sua análise, que são: preparo da amostra, extração, saponificação, separação, detecção e quantificação (SCOTT, 1992; RODRIGUEZ-AMAYA, 1999; RODRIGUEZ-AMAYA, 2001; MELÉNDEZ-MARTNEZ et al., 2007; RODRÍGUEZ-BERNALDO DE QUIRÓS e COSTA, 2006; RODRIGUEZ-AMAYA et al., 2008). É recomendável evitar o aquecimento excessivo, portanto, para concentrar os extratos de carotenóides, deve-se utilizar evaporadores rotativos, bem como utilizar solventes com baixo ponto de ebulição. Os carotenóides extraídos devem ser armazenados em vidro âmbar envoltos por folha de alumínio, em locais escuros a -20 °C ou menos, em total ausência de oxigênio; e todas as operações devem ser realizadas sob luz difusa (MELÉNDEZ-MARTÍNEZ et al., 2007; MAIANI, et al., 2009).

Antigamente era possível apenas a determinação de carotenóides totais em alimentos. Com o tempo surgiu a técnica de separação dos carotenóides em carotenos e xantofilas por cromatografia em coluna aberta, e posteriormente, com a introdução de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) equipado com detectores de UV/Visível foi possível a separação, detecção e quantificação de carotenóides individuais, oferecendo assim maior qualidade nos resultados analíticos (MELÉNDEZ-MARTÍNEZ et al., 2007; MAIANI, et al., 2009).

2.2. Fatores que podem influenciar o conteúdo dos compostos bioativos

Os compostos bioativos, segundo trabalhos descritos anteriormente, podem ser influenciados não só por variabilidade genética, mas também por fatores ambientais.

A influência de fatores externos pode ocorrer porque os compostos bioativos são produtos do metabolismo secundário de plantas, e estes representam uma interface química entre as plantas e o ambiente circundante, ou seja, o conteúdo total e/ou proporções relativas destes metabólitos podem ser alterados por variações temporais e espaciais, mesmo estas plantas apresentando um controle genético, pois a expressão pode sofrer modificações resultantes da interação de processos bioquímicos, fisiológicos, ecológicos e evolutivos. Os principais fatores ambientais que podem implicar ou alterar a produção ou concentração de metabólitos são: sazonalidade, ritmo circadiano, estágio de desenvolvimento e idade, temperatura, disponibilidade de água, radiação UV, nutrientes do solo, altitude, composição atmosférica e estímulos mecânicos ou ataque de patógenos no tecido (GOBBONETO e LOPES, 2007) (Figura 2).

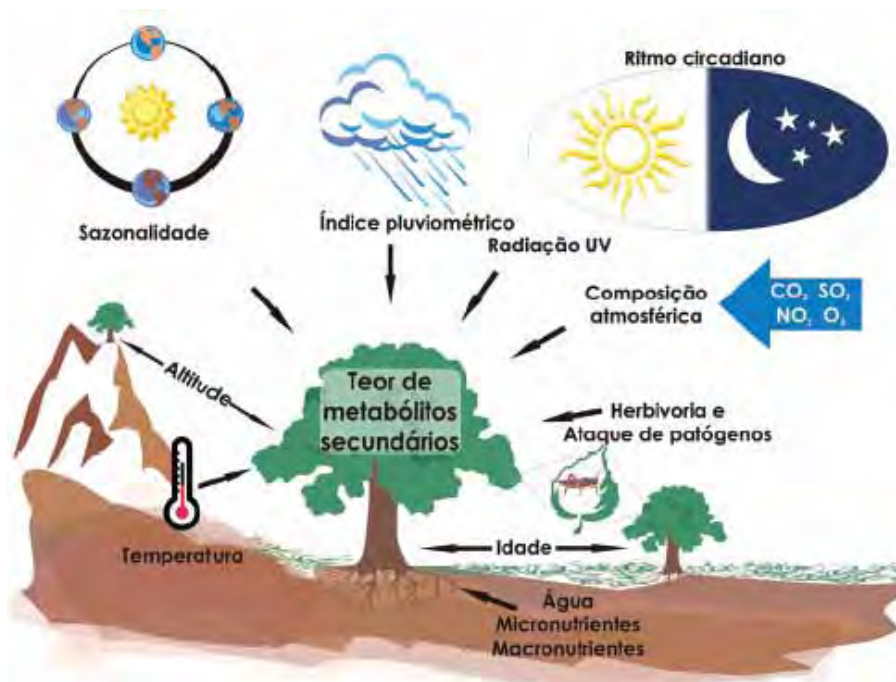


Figura 2. Principais fatores que podem influenciar o acúmulo de metabólitos secundários em plantas.

Fonte: GOBBO-NETO e LOPES, 2007.

2.2.1. Importância da avaliação das variedades e condições ambientais de cultivo

Nos últimos anos, houve um incremento da exploração de produtos e subprodutos de algumas frutíferas, atribuído à crescente preocupação do consumidor com a relação dieta e saúde (YAHIA, 2010). Devido a isso, a caracterização física e química dos frutos, e a quantificação de componentes bioativos são importantes para o conhecimento do valor nutricional, e do ponto de vista comercial, para agregar valor e qualidade ao produto (GOBBO-NETO e LOPES, 2007; YAHIA, 2010). Tendo em vista que estes compostos, além de influência das diferentes variedades, também podem ser influenciados por fatores ambientais, fica evidente a necessidade de estudos visando detectar as condições e épocas para cultivo e/ou coleta que conduzam a uma matéria-prima vegetal com concentrações desejáveis desses princípios ativos (GOBBO-NETO e LOPES, 2007).

3. Métodos para avaliação das capacidades antioxidantes

Em consequência do grande interesse em estudos sobre compostos bioativos alimentares que apresentam atividade antioxidante, há também a exigência de métodos convenientes e confiáveis para a determinação desta (SUN e TANUMIHARDJO, 2007; KARADAG et al., 2009; ALVES et al., 2010).

Existem diversos métodos para avaliar a capacidade antioxidante, porém eles diferem uns dos outros em termos de mecanismos e condições de reação e oxidantes. Ao selecionar o método mais adequado é necessário considerar que as condições de análise, o substrato e a concentração do antioxidante sejam simuladores do alimento o quanto possível. E, devido a atividade antioxidante ocorrer por diferentes mecanismos, a utilização de apenas um método para a avaliação pode não refletir com precisão o mecanismo de ação dos radicais ou dos antioxidantes num sistema complexo, exigindo assim, a utilização em paralelo de pelo menos mais um método para esta avaliação. (SÁNCHEZ-MORENO, 2002; PRIOR et al. 2005; THAIPOGA et al., 2006; SUN e TANUMIHARDJO, 2007; KARADAG et al., 2009; TABART et al., 2009; ALVES et al., 2010)

Nas medidas *in vitro* das capacidades antioxidantes de compostos alimentares, uma das estratégias mais aplicadas consiste em avaliar a capacidade sequestradora de espécies reativas de oxigênio (ALVES et al., 2010). Em função de muitos compostos com atividade anti-radical livre poderem ser hidrofílicos (ácido ascórbico) e lipofílicos (carotenóides), é interessante a utilização de métodos capazes de avaliar compostos com diferentes polaridades. Dentre os diversos, freqüentemente são utilizados o método 2,2-difenil-2-picrilidrazilo (DPPH) e o método ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzoatiazolina)-6-sulfônico (ABTS), pois ambos podem ser aplicados no estudo de compostos antioxidantes hidrofílicos e lipofílicos, tanto puros ou como em extratos (ARNAO et al., 2001; ROGINSKY e LISSI, 2005). Estes métodos utilizam compostos cromógenos de natureza radical que simulam a redução de espécie reativa de oxigênio. Nas análises, o declínio da coloração da solução indica a redução dos radicais pela substância antioxidante do extrato da

amostra utilizada, e isso se deve a alta habilidade de doação de hidrogênio pelos compostos antioxidantes (JAYAPRAKASHA e PATIL, 2007; ALI et al., 2008).

Revisões de literatura sobre a determinação de capacidades antioxidantes também relatam que muitos métodos estão sendo utilizados por diferentes grupos de pesquisas com diferentes protocolos no modo de realizar os ensaios, por exemplo, a concentração utilizada do radical sintético, o tempo de incubação, o pH da mistura da reação, e além disso, os resultados são expressos de diversas formas, ficando assim, incoerente a comparação de resultados de capacidades antioxidantes de alimentos entre estudos de laboratórios diferentes (PRIO et al., 2005; SUN e TANUMIHARDJO, 2007; STRATIL et al., 2007; SHARMA e BHAT, 2009).

4. Medição de cor

A determinação da qualidade dos alimentos não é apenas considerada por seus valores nutricionais, mas também por sua cor, por provocar estímulos visuais. (LIMA et al., 2005). Segundo Huggart et al. (1979) e Tepper (1993) a cor dos sucos cítricos influencia diretamente nas preferências dos consumidores, ela é considerada um dos parâmetros avaliados para a classificação comercial do produto em relação à sua qualidade.

As medições de cor podem ser realizadas por avaliação visual e análise instrumental. Para a análise dos alimentos visualmente faz-se uma avaliação por meios dos sentidos, tendo assim a subjetividade. Existe também a avaliação visual por meio de escalas de cor ou atlas contendo padrões comparativos, sendo esta eficiente para indústrias têxteis, pois possuem padrões estáveis, diferente de uma indústria alimentar. Já o uso de métodos instrumentais que podem ser realizados com a utilização dos instrumentos: colorímetros, espectrofotômetros e espectralradiômetros obtêm-se uma medição objetiva e precisa, porém há a necessidade de uma interpretação correta dos dados, e, além disso, estes equipamentos são caros e necessitam de uma manutenção complexa (MELÉNDEZ-MARTÍNEZ et al., 2005).

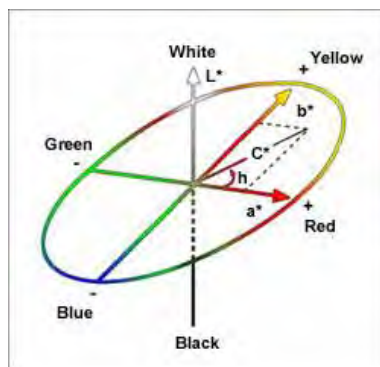


Figura 3. Parâmetros de cor do sistema CIELAB.

Fonte: <http://www.gravurexchange.com/gravurezine/0805-ezine/ploumidis.htm>

A caracterização da cor dos alimentos pode ser representada numericamente pelas coordenadas retangulares do sistema CIELab (Commission Internationale de l'Éclairage - Lightness, redness-greenness, and yellowness-blueness) (Figura 3) que são: L^* (luminosidade) que varia do preto (0) ao branco (100), a^* (verde quando negativo e vermelho quando positivo), b^* (azul quando negativo e amarelo quando positivo) (McGUIRE, 1992), sendo estes relacionados à reflectância da luz visível em comprimentos de ondas específicos (ARIAS et al., 2000). Os valores obtidos destes parâmetros, quando combinados matematicamente, permitem obter valores de coordenadas cilíndricas que são o Chroma (C^*) e o ângulo hue (h). A saturação do C^* define a vivacidade (próximo de 60) ou opacidade da cor (próximo de zero) (ARIAS et al., 2000), e o h relaciona-se às diferenças de absorbância em diferentes comprimentos de onda permitindo distinguir colorações de mesma luminosidade; ele mostra a localização da cor em um diagrama, onde o ângulo 0° representa vermelho puro; 90° , o amarelo puro; 180° , o verde puro e o 270° , o azul puro (SHEWFELT et al., 1988)

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRIANUAL. Anuário da Agricultura Brasileira. São Paulo: FNP Consultoria & Comércio, 2011. p.245-261.
- ALI, S.S.; KASOJU, N.; LUTHRA, A.; SINGH, A.; SHARANABASAVA, H.; SAHU, A.; BORA, U. Indian medicinal herbs as sources of antioxidants. **Food Res. Int.**, v.41, p.1-15, 2008.
- ALVES, C.Q.; DAVID, J.M.; DAVID, J.P.; BAHIA, M.V.; AGUIAR, R.M. Methods for determination of in vitro antioxidant activity for extracts and organic compounds. **Quím. Nova**, v.33, n.10, p.2202-2210, 2010.
- AGARWAL, S.; RAO, A.V. Tomato lycopene and its role in human health and chronic diseases. **Canadian Med. Assoc. J.**, v.19, n.6, p.739-744, 2000.
- ARENA, E.; FALLICO, B.; MACCARONE, E. Influence of carotenoids and pulps on the color modification of blood orange juice. **J. Food Sci.**, v.65, n.3, p.458-460, 2000.
- ARIAS, R.; LEE, T.C.; LOGENDRA, L.; JANES, H. Correlation of lycopene measured by HPLC with the L*, a*, b* color readings of a hydroponic tomato and the relationship of maturity with color and lycopene content. **J. Agric. Food Chem.**, v.48, n.5, p.1697-1702, 2000.
- ARNAO, M.B.; CANO, A.; ACOSTA, M. The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity. **Food Chem.**, v.73, n.2, p.2390-244, 2001.
- ATURKI, Z.; BRANDI, V.; SINIBALDI, M. Separation of flavanone-7-O-glycoside diastereomers and analysis in citrus juices by multidimensional liquid chromatography coupled with mass spectrometry. **J. Agric. Food Chem.**, v.52, n.17, p.5303-5308, 2004.
- BAE, G.U.; SEO, D.W.; KWON, H.K.; LEE, H.Y.; HONG, S.; LEE, Z.W.; HA, K.S.; LEE, H.W.; HAN, J.W. Hydrogen peroxide activates p70 (S6k) signaling pathway. **J. Biol. Chem.**, v.274, n.46, p.32596-32602, 1999.
- BENAVENTE-GÁRCIA, O.; CASTILLO, J. Update on uses and properties of citrus flavonoids: New findings in anticancer, cardiovascular, and anti-inflammatory activity. **J. Agric. Food. Chem.**, v.56, n.15, p.6185-6205, 2008.
- BERNARDI, J.; LICCIARDELLO, C.; RUSSO, M.P.; CHIUSANO, M.L.; CARLETTI, G.; RECUPERO, G.R.; MAROCCO, A. Use of a custom array to study differentially expressed genes during blood Orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck) ripening. **J. Plant. Physiol.**, v.167, n.4, p.301-310, 2010.
- BITTERS, W.P. Physical characters and chemical composition as affected by scions and rootstocks. In: SINCLAIR, W.B. (Ed.). **The orange: its biochemistry and physiology**. Riverside: The University of California, 1961. p.56-95.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensm. Wiss. Technol.**, v.28, p.25-30, 1995.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Instrução Normativa nº 01/00, de 07/01/00. Regulamento técnico geral para fixação dos padrões de identidade e qualidade para polpa de fruta. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 10 de janeiro, 2000.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Alimentos com alegações de propriedades funcionais e ou de saúde, novos alimentos/ingredientes, substâncias prebióticas e Probióticos. IX - Lista de alegações de propriedade funcional aprovadas. 2008. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm Acesso em: 20 ago. 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 269, de 22 de setembro de 2005. Aprova o regulamento técnico sobre a Ingestão Diária Recomendada (IDR) de proteína, vitaminas e minerais. Diário Oficial da União, Brasília, 23 de setembro, 2005.

CANTUTI-CASTELVETRI, I.; SHUKITT-HALE, B.; JOSEPH, J.A. Neurobehavioral aspects of antioxidants in aging. **Int. J. Dev. Neurosci.**, v.18, p.367-381, 2000.

CARVALHO, P.G.B.; MACHADO, C.M.M.; MORETTI, C.L.; FONSECA, M.E.N. Hortaliças como alimentos funcionais. **Hort. Bras.**, v.24, n.4, p.397-404, 2006.

CLINTON, S.K. Lycopene: chemistry, biology, and implications for human health and disease. **Nutr. Ver.**, v.56, n.2, p.35-51, 1998.

CORTÉS, C.; ESTEVE, M.J.; FRÍGOLA, A.; TORREGROSA, F. Identification and quantification of carotenoids including geometrical isomers in fruit and vegetable juices by liquid chromatography with ultraviolet-diode array detection. **J. Agric. Food Chem.**, v.52, n.8, p.2203-2212, 2004.

CTENAS, M.L.B.; CTENAS, A.C.; QUAIST, D. Frutas das terras brasileiras. São Paulo: C2 Editora, 2000. p.85-97.

DHUIQUE-MAYER, C.; FANCIULLINO, A.L.; DUBOIS, C.; OLLITRAULT, P. Effect of genotype and environment on citrus juice carotenoid content. **J. Agric. Food Chem.**, v. 57, n.19, p.9160-9168, 2009.

FANCIULLINO, A.L.; CERCOS, M.; DHUIQUE-MAYER, C.; FROELICHER, Y.; TALON, M.; OLLITRAULT, P.; MORILLON, R. Changes in carotenoid content and biosynthetic gene expression in juice sacs of four orange varieties (*Citrus sinensis*) differing in flesh fruit color. **J. Agric. Food Chem.**, v.56, n.10, p.3628-3638, 2008.

FANCIULLINO, A.L.; DHUIQUE-MAYER, C.; LURO, F.; CASANOVA, J.; MORILLON, R.; OLLITRAULT, P. Carotenoid diversity in cultivated citrus is highly influenced by genetic factors. **J. Agric. Food Chem.**, v. 54, n.12, p.4397-4406, 2006.

FRASER, P.D.; BRAMLEY, P.M. The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. **Prog. Lipid. Res.**, v.43, n.3, p.228-265, 2004.

GAMA, J.J.T.; SYLOS, C.M. Major carotenoid composition of Brazilian Valencia orange juice: identification and quantification by HPLC. **Food Res. Int.**, v.38, p.899-903, 2005.

GATTUSO, G; BARRECA, D.; GARGUILLI, C.; LEUZZI, U.; CORISTI, C. Flavonoid composition of citrus juice, **Molecules**, v.12, n.8, p.1641-1673, 2007.

GHAFFAR, M.F.A.; PRASAD, K.N.; WENG, K.K.; ISMAIL, A. Flavonoid, hesperidine, total phenolic contents and antioxidant activities from Citrus species. **Afr. J. Biotechnol.**, v.9, n.3, p.326-330, 2010.

GIL-IZQUIERDO, A.; GIL, M.I.; FERRERES, F.; TOMAS-BARBERAN, F.A. In vitro availability of flavanoids and other phenolics in orange juice. **J. Agric. Food Chem.**, v.49, n.2, p.1035-1041, 2001.

GIOVANNUCCI, E. Tomatoes, tomato-based products, lycopene and cancer: a review of the epidemiological literature. **J. Nat. Canc. Instit.**, v.91, n.4, p.317-331, 1999.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N.P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Quim Nova**, v.30, n.2, p.374-381, 2007.

HALLIWELL, B.; CROSS, C.E.; GUTTERIDGE, J.M.C. Free radicals, antioxidants and human disease: where are we now? **J. Lab. Clin. Med.**, v.119, p.598-620, 1992.

HIX, L.M.; LOCKWOOD, S.F.; BERTRAM, J. S. Bioactive carotenoids: potent antioxidants and regulators of gene expression. **Redox Rep.**, v.9, n.4, p.181-191, 2004.

HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R.L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **J. Agric. Food Chem.**, v.53, n.6, p.1841-1856, 2005.

HUGGART, R.L.; FELLERS, P.J.; De JAGER, G.; BRADY, J. The influence of color on consumer preferences for Florida frozen concentrated grapefruit juices. **Proc. Fla. State Hortic. Soc.**, v.92, p.148-151, 1979.

JAYAPRAKASHA, G.K.; PATIL, B.S. In vitro evaluation of the antioxidant activities in fruit extracts from citron and blood orange. **Food Chem.**, v.101, p.410-418, 2007.

KARADAG, A.; OZCELIK, B.; SANER, S. Review of methods to determine antioxidant capacities. **Food Anal. Methods**, v.2, p.41-60, 2009.

KATO, M.; IKOMA, Y.; MATSUMOTO, H.; SUGIURA, M.; HYODO, H.; YANO, M. Accumulation of carotenoids and expression of carotenoid biosynthetic genes during maturation in citrus fruit. **Plant. Physiol.**, v.134, n.2, p.1-14, 2004.

KELEBEK, H.; CANBAS, A.; SELLI, S. Determination of phenolic composition and antioxidant capacity of blood orange juices obtained from cvs. Moro and Sanguinello (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) grown in Turkey. **Food Chem.**, v.107, n.4, p.1710-1716, 2008.

KELEBEK, H.; SELLI, S.; CANBAS, A. HPLC Determination of organic acids, sugars, phenolic compositions and antioxidant capacity of orange juice and orange wine made from a Turkish cv. Kozan. **Microchem J.**, v.91, p.187-192, 2009.

KRINSKY, N.I.; JOHNSON, E.J. Carotenoid actions and their relation to health and disease. **Mol. Aspects Med.**, v.26, p.459-516, 2005 .

KRIS-ETHERTON, P.M.; HECKER, K.D.; BONANOME, A.; COVAL, S.M.; BINKOSKI, A.E.; HILPERT, K.F.H.; GRIEL, A.E.; ETHERTON, T.D. Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. **Am. J. M.**, v.113, n.9, p.71- 88, 2002.

LARSON, R.A. **Naturally occurring antioxidants**, Lewis Publishers: New York, 1997, p. 1.

LATADO, R.R. **Laranjas de polpa vermelha e laranjas sanguíneas**. Espaço citrícola - a citricultura on line, N.35, p.27-38, 2008.

LATADO, R.R.; VOIGT, V.; NISHIMURA, D.S.; LEO, H.C.; SYLOS, C.M. Laranjas de polpa vermelha. Caracterização de frutos e do suco dos frutos. Anais do XX Congresso Brasileiro de Fruticultura. 54th Annual Meeting of the Interamerican Society for Tropical Horticulture. Vitória/ES, 12-17 de Out., 2008.

LEE, H.S. Characterization of carotenoids in juice of red Navel orange (Cara Cara). **J. Agric. Food Chem.**, v.49, n.5, p.2563-2568, 2001.

LEE, H.S. Characterization of major anthocyanins and the color of red-fleshed blood orange (*Citrus sinensis*). **J. Agric. Food Chem.**, v.50, n.5, p.1243-1246, 2002.

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

LEE, H. S.; CASTLE, W.S.; COATES, G. A. High-performance liquid chromatography for the characterization of carotenoids in the new sweet orange (Earlygold) grown in Florida, USA. **J. Chromatogr. A**, v. 913, n.1-2, p.371-377, 2001.

LEE, S.K.; KADER, A.A. Preharvest and postharvest factors influencing vitamin C content of horticultural crops. Postharv. **Postharvest Biol. Tech.**, v.20, p.207-220, 2000.

LIMA, V.L.A.G.; MÉLO, E.A.; MACIEL, M.I.S.; PRAZERES, F.G.; MUSSER, R.S.; LIMA, D.E.S. Total phenolic and carotenoid contents in acerola genotypes harvested at three ripening stages. **Food Chem.**, v.90, n.4, p.565-568, 2005.

LIU, Q.; XU, J.; LIU, Y.Z.; ZHAO, X.L.; DENG, X.X.; GUO, L.L.; GU, J.Q. A novel bud mutation that confers abnormal patterns of lycopene accumulation in sweet orange fruit (*Citrus sinensis* L. Osbeck). **J. Exp. Bot.**, v.58, n.15-16, p.4161-4171, 2007.

MACCARONE, E.; MACCARONE, A.; PERRIN, G.; RAPISARDA, P. Anthocyanin of the Moro orange juice. **Ann. Chim.**, v.73, p.533-539, 1983.

MAIANI, G.; CASTÓN, M.J.P.; CATASTA, G.; TOTI, E.; CAMBRODÓN, I.G.; BYSTED, A.; GRANADO-LORENCIO, F.; BEGOÑA OLMEDILLA-ALONSO, B.; KNUTHSEN, P.; MASSIMO VALOTI, M.; BÖHM, V.; MAYER-MIEBACH, E.; BEHSNILIAN, D.; SCHLEMMER, U. Carotenoids: actual knowledge on food sources, intakes, stability and bioavailability and their protective role in humans. **Mol. Nutr. Food. Res.**, v.53, n.2, p.194-218, 2009.

MANACH, C.; SCALBERT, A.; MORAND, C.; RÉMÉSY, C.; JIMÉNEZ, L. Polyphenols: food sources and bioavailability. **Am. J. Clin. Nutr.**, v.79, n.5, p.727-747, 2004.

MANTHEY, J.A.; GUTHRIE, N.; GROHMANN, K. Biological properties of citrus flavonoids pertaining to cancer and inflammation. **Curr.Med. Chem.**, v.8, n.2, p.135-153, 2001.

McGUIRE, R. G. Reporting of objective color measurements. **Hort Sci.**, v.27, n.12, p.1254-1555, 1992.

MELÉNDEZ-MARTÍNEZ, A.J., VICARIO, I.M., HEREDIA, F.J. Instrumental measurement of Orange juice colour: a review. **J. Sci. Food Agric.**, v.85,n.6, p.894-901, 2005.

MELÉNDEZ-MARTÍNEZ, A.J.; VICARIO, I.M.; HEREDIA, F.J. Review: analysis of carotenoids in orange juice. **J. Food Compos. Anal.**, v. 20, n.7, p.638-649, 2007.

MERKEN, H.M.; BEECHER, G.R. Measurement of food flavonoids by high-performance liquid chromatography: a review. **J. Agric. Food Chem.**, v.48, n.3, p.576-599, 2000.

MOULY, P.P.; GAYDOU, E.M.; LAPIERRE, L.; CORSETTI, J. Differentiation of several geographical origins in single-strength Valencia orange juices using quantitative comparison of carotenoid profiles. **J. Agric. Food Chem.**, v.47, n.10, p.4038-4045, 1999.

MOURA, L.M. **Compostos bioativos em frutas cítricas: quantificação, avaliação da atividade antioxidante, parâmetros de cor e efeito da pasteurização**. 2010. 142f. Tese (Doutorado em Alimentos e Nutrição) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara-SP, 2010.

MOURA, L.M.; SYLOS, C.M. The effect of the manufacturing process on the citrus juice on the concentrations of flavanones. **Alim. Nutr.**, v.19, n.4, p.379-384, 2008.

NACZK, M.; SHAHID, F. Phenolics in cereals, fruits and vegetables: occurrence, extraction and analysis. **J. Pharm.Biomed. Anal.**, v.41, n.5, p.1523-1542, 2006.

NEVES, M.F.; TROMBIN, V.G.; MILAN, P.; LOPES, F.F.; PEREIRA, F.C; KALAKI, R.B. **O Retrato da citricultura Brasileira**. Editora Marcos Fava Neves, Ribeirão Preto, SP, 2010. 137p.

PELLEGRINI, N.; COLOMBI, B.; SALVATORE, S.; BRENNA, O.V.; GALAVERNA, G.; RIO, D.D.; BIANCHI, M.; BENNETT, R.N.; BRIGHENTI, F. Evaluation of antioxidant capacity of some fruit and vegetable foods: efficiency of extraction of a sequence of solvents. **J. Sci. Food Agric.**, v.87, p.103-111, 2007.

PETERSON, J.J. Flavanones in oranges, tangerines (mandarins), tangors, and tangelos: a compilation and review of the data from the analytical literature. **J. Food Compost. Anal.**, v.19, p.66-73, 2006.

PIMENTEL, C.V.M.; FRANCKI, V.M.; GOLLÜCKE, A.P.B. **Alimentos funcionais: introdução as principais substâncias bioativas em alimentos**. São Paulo: Ed. Varela, 2005. 95 p.

PRIOR, R.L.; WU, X.; SCHAICH, K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. **J. Agric. Food Chem.**, v.53,n.8, p.3101-3113, 2005.

RAPISARDA, P.; BELLOMO, S.E.; INTRIGLIOLO, F. Anthocyanins in blood oranges: composition and biological activity. **Recent Res. Dev. Agric. Food Chem.**, v.5, p.217-230, 2001.

RAPISARDA, P.; TOMAINO, A.; CASCIO, R.; BONINA, F.; PASQUALE, A.; SAIJA, A. Antioxidant effectiveness as influenced by phenolic content of fresh orange juices, **J. Agric. Food Chem.**, v.47, n.11, p.4718-4723, 1999.

RAO, A.V.; RAO, L.G. Carotenoids and human health. **Pharmacol Res.**, v.55, n.3, p.207-216, 2007.

RIBAYA-MERCADO, J.; BLUMBERG, J. Lutein and zeaxanthin and their potential roles in disease prevention. **J. Am. Coll. Nutr.**, v.23, n.6, p.576-587, 2004.

RODRIGO, M.J.; MARCOS, J.F.; ZACARIAS, L. Biochemical and molecular analysis of carotenoid biosynthesis in flavedo of orange (*Citrus sinensis* L.) during fruit development and maturation. **J. Agric. Food Chem.**, v.52, n.22, p.6724-6731, 2004.

RODRIGUEZ-AMAYA, DB. A Guide to Carotenoid Analysis in Foods. Washington DC: ILSI Press, 2001.

RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Changes in carotenoids during processing and storage of foods. **Arch. Latinoam. Nutr.**, v.49, n.3, p.38-47, 1999. 64p.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B.; KIMURA, M.; AMAYA-FARFAN, J. **Fontes brasileiras de Carotenóides:tabela brasileira de composição de carotenóides em alimentos**. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 2008. 98p.

RODRÍGUEZ-BERNALDO DE QUIRÓS, A.; COSTA, H.S., Analysis of carotenoids in vegetable and plasma samples: A review. **J. Food Comp. Anal.**, v.19, n.2-3, p.97-111, 2006.

ROGINSKY, V.; LISSI, E.A. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. **Food Chem.**, v.92, n.2, p.235-254, 2005.

ROSS, J.A.; KASUM, C.M. Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects, and safety. **Annu. Rev. Nutr.**, v.22, p.19-34, 2002.

ROUSEFF, R.; RALEY, L. Application of diode array detection with a C-30 reversed phase column for the separation and identification of saponified orange juice carotenoids. **J. Agric. Food Chem.**, v.44, n.8, p.2176-2181, 1996.

SÁNCHEZ-MORENO, C. Review: methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. **Food Sci. Tech. Int.**, v.8, n.3, p.121-137, 2002.

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. **J Sci Food Agric.**, v.83, n.5, p.430-439, 2003a.

SÁNCHEZ-MORENO, C.; PLAZA, L.; De ANCOS, B.; CANO, M. P. Vitamin C, provitamin A carotenoids, and other carotenoids in highpressurized orange juice during refrigerated storage. **J. Agric. Food Chem.**, v. 51, n.3, p.647-653, 2003b.

SAUNT J: **Citrus varieties of the world**. Sinclair International Ltd., Norwich, England; 2000.

SCOTT, K.J. Observations on some of the problems associated with the analysis of carotenoids in foods by HPLC. **Food Chem.**, v.45, n.5, p.357-364, 1992.

SHAMI, N.J.I.E.; MOREIRA, E.A.M. Licopeno como agente antioxidante. **Rev. Nutr.**, v.17, n.2, p.227-236, 2004.

SHARMA, O.P.; BHAT, T.K. DPPH antioxidant assay revisited. **Food Chem.**, v.113, n.4, p.1202-1205, 2009.

SHEWFELT, R.L.; THAI, C.N.; DAVIS, J.W. Prediction of changes in color of tomatoes during ripening at different constant temperatures. **J. Food Sci.**, v.53, n.5, p.1433-1437, 1988.

SILALAH, J. Anticancer and health protective properties of citrus fruit components. **Asia Pac. J. Clin.Nutr.**, v.11, p.79-84, 2002.

SLATERRY, M.L.; BENSON, J.; CURTIN, K.; MA, K.; SCHAEFFER, D.; POTTER, J.D., Carotenoids and colon cancer. **Am J Clin Nutr.**, v.71, p.575-582, 2000.

SMIDT, C.R.; BURKE, D.S. Nutritional significance and measurement of carotenoids. **Curr. Top. Nutraceut. Res.**, v.2, n.2, p.79-91, 2004.

STRATIL, P.; KLEJDUS, B.; KUBÁN, V. Determination of phenolic compounds and their antioxidant activity in fruits and cereals. **Talanta**, v.71, n.4, p.1741-1751, 2007.

SUN, T.; TANUMIHARDJO, S.A. An integrated approach to evaluate food antioxidant capacity. **J. Food Sci.**, v.72, n.9, p.159-165, 2007.

TABART, J.; KEVERS, C.; PINCEMAIL, J.; DEFRAIGNE, J.O.; DOMMES, J. Comparative antioxidant capacities of phenolic compounds measured by various tests. **Food Chem.**, v.113, n.4, p.1226-1233, 2009.

TEPPER, B. J. Effects of a slight color variation on consumer acceptance of orange juice. **J. Sensory Stud.**, v.8, n.2, p.145-154, 1993.

THAIPONG, K.; BOONPRAKOB, U.; CROSBY, K.; CISNEROS-ZEVALLOS, L.; BYRNE, D.H. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. **J. Food Comp. Anal.**, v.19, n.6-7, p. 669-675, 2006.

TIBBLE, D.L. Further evidence of the cardiovascular benefits of diets enriched in carotenoids. **Am. J. Clin Nutr.**, v.68, p.521-522, 1998.

VINUEZA, J.C.; FARIA, J.B.; CÉSAR, T.B. Hesperidina diminui o colesterol sanguíneo de ratos alimentados com gordura saturada. **Alim.Nutr.**, v.19, n.4, p.473-479, 2008.

XU, C.J.; FRASER, P.D.; WANG, W.J.; BRAMLEY, P.M. Differences in the carotenoid content of ordinary citrus and lycopene-accumulating mutants. **J. Agric. Food Chem.**, v.54, n.15, p.5474-5481, 2006.

YAHIA, E. M. The contribution of fruit and vegetable consumption to human health. In: ROSA, L.A.; ALVAREZ-PARRILLA, E.; GONZALEZAGUILARA, G.A. **Fruit and vegetable phytochemicals: chemistry, nutritional value and stability**. Hoboken: Wiley-Blackwell, 2010. p.3-51.

CAPÍTULO 2

COMPOSTOS BIOATIVOS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE VARIEDADES DE LARANJAS DE POLPA VERMELHA CULTIVADAS EM DIFERENTES REGIÕES

RESUMO

A laranja é a fruta mais consumida mundialmente, tanto *in natura* como na forma de suco. Atualmente no Brasil vêm sendo cultivadas variedades de laranjas de polpa vermelha, laranjas estas que diferem das de polpa clara por possuírem o licopeno na sua composição de carotenóides. Sabe-se que as laranjas apresentam vários compostos bioativos benéficos a saúde humana como carotenóides, vitaminas e compostos polifenólicos, porém, ainda são poucas essas informações a respeito das laranjas de polpa vermelha. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi comparar três variedades de laranjas de polpa vermelha (Sanguínea de Mombuca (SM), Baia Cara-Cara (BCC) e Valência Puka (VP)) com uma variedade de polpa clara (Valência) cultivadas em três cidades (Barretos, Bofete e Ibaté do Estado de São Paulo, Brasil) em relação às características físico-químicas, a presença de compostos bioativos (ácido ascórbico, fenólicos totais, flavonóides totais e carotenóides totais) e capacidades antioxidantes, além disso, verificar o efeito das condições ambientais das cidades de cultivo sobre os parâmetros analisados. Os conteúdos de ácido ascórbico foram determinados por titulometria pelo método de redução do 2,6-diclorofenol-indofenol, e os teores de compostos fenólicos totais, flavonóides totais e carotenóides totais determinados por espectroscopia do UV/Visível. A capacidade antioxidante equivalente a trolox (TEAC) e equivalente a vitamina C (VCEAC) foram analisadas pelos métodos 2,2-difenil-2-picrilidrazilo (DPPH) e 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzoatiazolina)-6-sulfônico (ABTS). Os sucos das laranjas de polpa vermelha em comparação aos da variedade Valência mostraram-se menos ácidos e não apresentaram diferenças significativas nas concentrações de ácido ascórbico e compostos fenólicos totais. Para os flavonóides totais, apenas as laranjas VP cultivadas em Barretos e Ibaté apresentaram os maiores teores significativos. As concentrações de carotenóides totais nas variedades de laranjas de polpa vermelha não diferiram significativamente entre si, porém foram de 20 a 76% maiores do que nas laranjas Valência. Os menores teores de ácido ascórbico e carotenóides totais foram obtidos nas laranjas cultivadas em Barretos, cidade que esta localizada em uma menor altitude em relação a Bofete e Ibaté, e caracterizada por apresentar temperaturas elevadas. A TEAC e a VCEAC apresentaram resultados com forte correlação positiva significativa entre os dois métodos utilizados (ABTS e DPPH). A SM foi a variedade que apresentou o maior poder antioxidante, e o ácido ascórbico foi o composto que mais contribuiu para esta propriedade, seguido pelos carotenóides totais e compostos fenólicos totais.

Palavras-chave: laranjas; ácido ascórbico; compostos fenólicos; flavonóides; carotenóides; antioxidante.

ABSTRACT

Orange is the fruit more consumed worldwide both as fresh as juice. Currently in Brazil is being cultivated varieties of red pulp oranges, and these differ from pulp clear by present lycopene in their carotenoid composition. It is known that oranges have several bioactive compounds beneficial to human health such as carotenoids, vitamins and polyphenolic compounds, however, almost no one has such information about the red pulp oranges. Thus, the objective of this study was to compare three varieties of oranges red pulp (Sanguínea de Mombuca (SM), Baia Cara-Cara (BCC) and Valência Puka (VP)) with a variety of clear pulp (Valencia) grown in three cities (Barretos, Bofete and Ibaté of São Paulo, Brazil) in relation to physical and chemical characteristics, the presence of bioactive compounds (ascorbic acid, total phenolics, total flavonoids and total carotenoids), and antioxidants capacities, also check the effect of environmental conditions of cities of cultivation on the parameters analyzed. The content of ascorbic acid was determined by titration by the method of reduction of 2,6-dichlorophenol-indophenol, and the concentrations of total phenolics, total flavonoids and total carotenoids determined by spectroscopy of UV/Visible. The trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) and vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) were examined using 2,2-diphenyl-2-picrilidrazilo (DPPD) and 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzoatiazolina)-6-sulfonic acid (ABTS). The juices of red pulp oranges in comparison to the variety Valência were less acidic and no significant differences in the concentrations of ascorbic acid and phenolic compounds. For flavonoids, only VP oranges grown in Barretos and Ibaté showed significant higher levels. Concentrations of total carotenoids in oranges varieties of red pulp not differ significantly among themselves, but were 20-76% higher than in Valência oranges. The lower levels of ascorbic acid and total carotenoids were obtained in oranges grown in Barretos, a city that is located at a lower altitude compared to Bofete and Ibaté, and characterized by the high temperatures. The TEAC and VCEAC results showed a strong positive correlation between the two methods used (ABTS e DPPH). The SM was the variety that presented the highest antioxidant power, and ascorbic acid was the compound that contributed most to this property, followed by total carotenoids and phenolic compounds.

Keywords: oranges; ascorbic acid; phenolics compounds, flavonoids; carotenoids; antioxidant.

INTRODUÇÃO

As laranjas são conhecidas por serem importantes fontes de compostos bioativos como ácido ascórbico, compostos fenólicos e carotenóides, compostos estes de grande interesse de cientistas, consumidores e indústrias, visto que apresentam potencial atividade antioxidante, pois evitam ou diminuem significativamente efeitos adversos de espécies reativas na função fisiológica normal de seres humanos. Com isso, estudos sugerem que o consumo de laranjas auxilia na prevenção do envelhecimento precoce e atuam na proteção contra alguns tipos de câncer, doenças cardiovasculares, doença de Alzheimer, diabetes, catarata, degeneração macular relacionada à idade, entre outras (SILALAH, 2002; KUSKOSKI et al., 2005; PIMENTEL et al., 2005; SUN e TANUMIHARDJO, 2007; JAYAPRAKASHA e PATIL, 2007; PELLEGRINI et al., 2007; KARADAG et al., 2009; YAHIA, 2010; ALVES et al., 2010).

Segundo Bitters (1961), as laranjas podem ser classificadas em função da coloração de suas polpas em laranjas claras e sanguíneas. As laranjas claras são caracterizadas pela cor amarela-laranjada devido à presença dos pigmentos carotenóides, já as laranjas sanguíneas apresentam coloração vermelho-intensa em função da presença de antocianinas.

Atualmente foi descrito um novo grupo de laranjas, denominado laranjas de polpa vermelha ou falsas-sanguíneas. Estas diferem das laranjas claras por apresentarem maiores concentrações de alguns carotenóides e também por possuírem o licopeno, carotenóide de coloração vermelha que não está presente nas laranjas de polpa clara (SAUNT, 2000; LEE, 2001; XU et al., 2006; LIU et al., 2007; FANCIULLINO et al., 2008; LATADO et al., 2008; MOURA, 2010). Variedades destas laranjas: Sanguínea de Mombuca, Valência Puka e Baia Cara-Cara começaram a ser cultivadas no Brasil.

Acredita-se que laranjas de polpa vermelha apresentariam grande comercialização na forma de fruta de mesa ou para o processamento na forma de suco, visto que já é de conhecimento que apresentam compostos bioativos benéficos a saúde humana, porém, ainda existem poucas informações sobre estes compostos sob influência de diferentes variedades e condições ambientais de cultivo.

Devido aos fatos apresentados, é de grande importância agregar conhecimento de valor nutricional e de qualidade do ponto de vista comercial das laranjas de polpa vermelha. Com isso, o objetivo deste trabalho foi comparar três variedades de laranjas de polpa vermelha com uma de polpa clara em relação à caracterização físico-química e determinações dos compostos bioativos e das capacidades antioxidantes. Além disso, verificar se estes parâmetros também sofrem com a influência das localizações geográficas e condições ambientais de três cidades de cultivo do Estado de São Paulo, Brasil.

MATERIAL

Três variedades de laranja de polpa vermelha: Baia Cara-Cara (BCC), Sanguínea de Mombuca (SM) e Valência Puka (VP), e uma variedade de polpa clara, Valência, cultivadas nas mesmas condições em campos experimentais localizados nas cidades de Barretos, Bofete e Ibaté do Estado de São Paulo, Brasil, foram fornecidas pelo Centro APTA Citros Sylvio Moreira/IAC. As localizações geográficas e condições climáticas das cidades de cultivo estão apresentadas na Tabela 1.

As laranjas foram colhidas no ano de 2010 em diferentes estádios de desenvolvimento. As laranjas Valência foram obtidas nos meses de maio (lote 1), junho (lote 2), julho (lote 3), setembro (lote 4), outubro (lote 5) e novembro (lote 6). As variedades Sanguínea de Mombuca e Baia Cara-Cara obtidas nos meses de maio, junho e julho, e a Valência Puka nos meses de setembro, outubro e novembro.

Não foram colhidas amostras de laranjas Valência e VP cultivadas na cidade de Bofete no mês de novembro. Cada lote era formado em média por 15 frutos. Os sucos das laranjas foram extraídos e armazenados em frascos de vidros cobertos com papel alumínio e mantidos a -18°C.

Tabela 1. Localizações geográficas e condições climáticas das cidades de cultivo das laranjas.

	Barretos	Bofete	Ibaté
Latitude	20°33'26"Sul	23°06'08"Sul	21°57'17"Sul
Longitude	48°34'04" Oeste	48°15'28"Oeste	47°59'48"Oeste
Altitude (m)	530	576	839
Clima	Tropical	Tropical de altitude	
Temperatura	elevada entre 18 e 28 °C.	amena entre 18 e 22 °C	Verão: > que 22 °C Frio: entre -3 e 18 °C
Amplitude térmica diária	Significativa		Não significativa
Estações	Verão quente e chuvoso Inverno ameno e seco	Inverno com geadas frequentes	Inverno seco
Índice pluviométrico	Entre 1000 e 1500mm/ano		

Fonte: IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Cidades.** www.ibge.gov.br
<http://pt.wikipedia.org/wiki/Clima>; <http://pt.wikipedia.org/wiki/Barretos> ou Bofete ou Ibaté

MÉTODOS

Determinação de sólidos solúveis totais, acidez titulável total e *ratio*

Sólidos solúveis totais (SST) (°Brix) e acidez titulável total (ATT) foram determinados de acordo com AOAC (2005). O *ratio* foi calculado pela relação de SST/ATT.

Determinação de ácido ascórbico

O conteúdo de ácido ascórbico foi determinado por titulometria pelo método de redução do 2,6-diclorofenol-indofenol pelo ácido ascórbico, e os resultados foram expressos em mg ácido ascórbico (AA) em 100 mL de suco (AOAC, 2005).

Determinação de compostos fenólicos totais

Os compostos fenólicos foram extraídos segundo Yu e Dahegren (2000) com algumas modificações. Um volume de 0,5 mL do suco de laranja mais 10 mL de acetona 80% foram misturados em vortex por 1 minuto, e então, deixados ao abrigo da luz durante 1 hora em temperatura ambiente; posteriormente, foram centrifugados a 6500 rpm durante 2 minutos. O conteúdo de fenólicos totais foi determinado por espectroscopia do UV/Visível utilizando o reagente de Folin-Ciocalteu em método colorimétrico (SINGLETON e ROSSI, 1965) modificado por Scalbert et al. (1989). O sobrenadante (0,5 mL) foi misturado com 2,5 mL do reagente recém diluído de 0,2 N Folin-Ciocalteu, e incubadas a 50°C durante 5 minutos; em seguida, a reação foi neutralizada por adição de 2 mL de Na_2CO_3 7,5% e as amostras incubadas a 50° C durante 5 minutos antes da leitura da absorbância a 760 nm. A quantificação foi feita por uma curva de calibração preparada com ácido gálico (5 a 25 μg /mL), e os resultados foram expressos em mg de equivalente de ácido gálico (EAG) em 100 mL de suco.

Determinação de flavonóides totais

Os flavonóides totais foram extraídos de acordo com Yu e Dahegren (2000) com algumas modificações, acima descritas para compostos fenólicos. O conteúdo foi determinado pelo método colorimétrico segundo Zhishen et al. (1999). Um volume de 5 mL do sobrenadante era colocado em um tubo de ensaio, e então adicionado 0,3 mL de NaNO_2 5%. Após 5 minutos foi adicionado 0,6 mL de AlCl_3 10%, e depois de 6 minutos, 2 mL de NaOH 1M, seguido da adição de 2,1 mL de água destilada, e então a amostra foi lida em espectrofotômetro de UV/Visível a 510nm. A quantificação foi feita por uma curva de calibração preparada com rutina (100 a 500 μg /mL), e os resultados foram expressos em mg de equivalente de rutina (ER) em 100 mL de suco.

Determinação de carotenóides totais

Os carotenóides foram extraídos com acetona refrigerada (1,7°C a 3,3°C), transferidos para éter de petróleo e saponificados com KOH metanólico 10% por 16 horas. Os extratos foram lavados com água para remoção do alcali e levados a um volume em balão volumétrico. A leitura da absorbância da solução realizada a 450 nm, e o teor de carotenóides totais expresso em termos de β -caroteno ($A^{1\%}_{1\text{cm}}$ de 2592, em éter de petróleo), aplicando-se a Lei de Beer (RODRIGUEZ-AMAYA, 2001).

Determinações das capacidades antioxidantes

Preparo da amostra

Uma massa de 2,5 g da amostra foi transferida para balão volumétrico de 25 mL e o volume completado com água destilada. A solução foi centrifugada a 6500 rpm por 5 minutos e o sobrenadante obtido era então utilizado para avaliar as capacidades antioxidantes.

Método ABTS.

O método de 2,2'-azino-*bis*-(3-etilbenzoatiazolina)-6-sulfônico (ABTS) foi feito de acordo com Arnao et al. (2001) com algumas modificações. O radical (ABTS^+) foi obtido a partir da reação entre 5 mL de ABTS (7,0 mM) com 88 μL de persulfato de potássio (140 mM), e mantido ao abrigo da luz em temperatura ambiente durante 16 horas antes da utilização. Em seguida, 1 mL da solução de ABTS^+ foi diluída com metanol até obter uma absorbância de $0,9 \pm 0,02$ unidades a 734 nm. Os sobrenadantes dos extratos das laranjas (150 μL) foram colocadas a reagir com 2850 μL de solução de ABTS^+ , e após 6 minutos na ausência de luz, a diminuição da absorbância era lida a 734 nm.

Método DPPH.

Para o método de 2,2-difenil-2-picrilidrazilo (DPPH), seguiu-se o procedimento segundo Brand-Williams et al. (1995) com algumas modificações. A solução estoque foi preparada pela dissolução de 12 mg de DPPH em 50 mL de metanol e armazenadas a -20 °C até serem utilizadas. A solução de trabalho foi obtida através de 5 mL da solução estoque diluída com metanol até obter uma absorbância de $0,90 \pm 0,02$ unidades a 515 nm. Os sobrenadantes dos extratos das laranjas (150 µL) foram colocados a reagir com 2850 µL de solução de DPPH⁺, e após 30 minutos na ausência de luz, a diminuição da absorbância era lida a 515 nm.

Quantificação pelos métodos ABTS e DPPH.

As curvas de calibração para quantificações da capacidade antioxidante equivalente a trolox (TEAC) e, capacidade antioxidante equivalente a vitamina C (VCEAC) foram construídas respectivamente com concentrações da solução padrão de trolox e solução padrão de ácido ascorbico. O procedimento foi o mesmo que o utilizado para as amostras, obedecendo as restrições de cada método. Os resultados foram expressos em µM TEAC /g de amostra e em mg VCEAC /100g de amostra.

Análise estatística

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com três repetições de cada tratamento. A análise estatística dos resultados foi realizada através de análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Os resultados foram expressos em média $\pm$ erro-padrão (EP) dos lotes analisados. Para verificar a correlação entre as capacidades antioxidantes e os compostos bioativos foi utilizado o teste de correlação de Pearson.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Sólidos solúveis totais, acidez titulável total e *ratio*

A Figura 1 mostra o comportamento dos parâmetros SST, ATT e *ratio* dos sucos das laranjas ao longo dos meses de colheita.

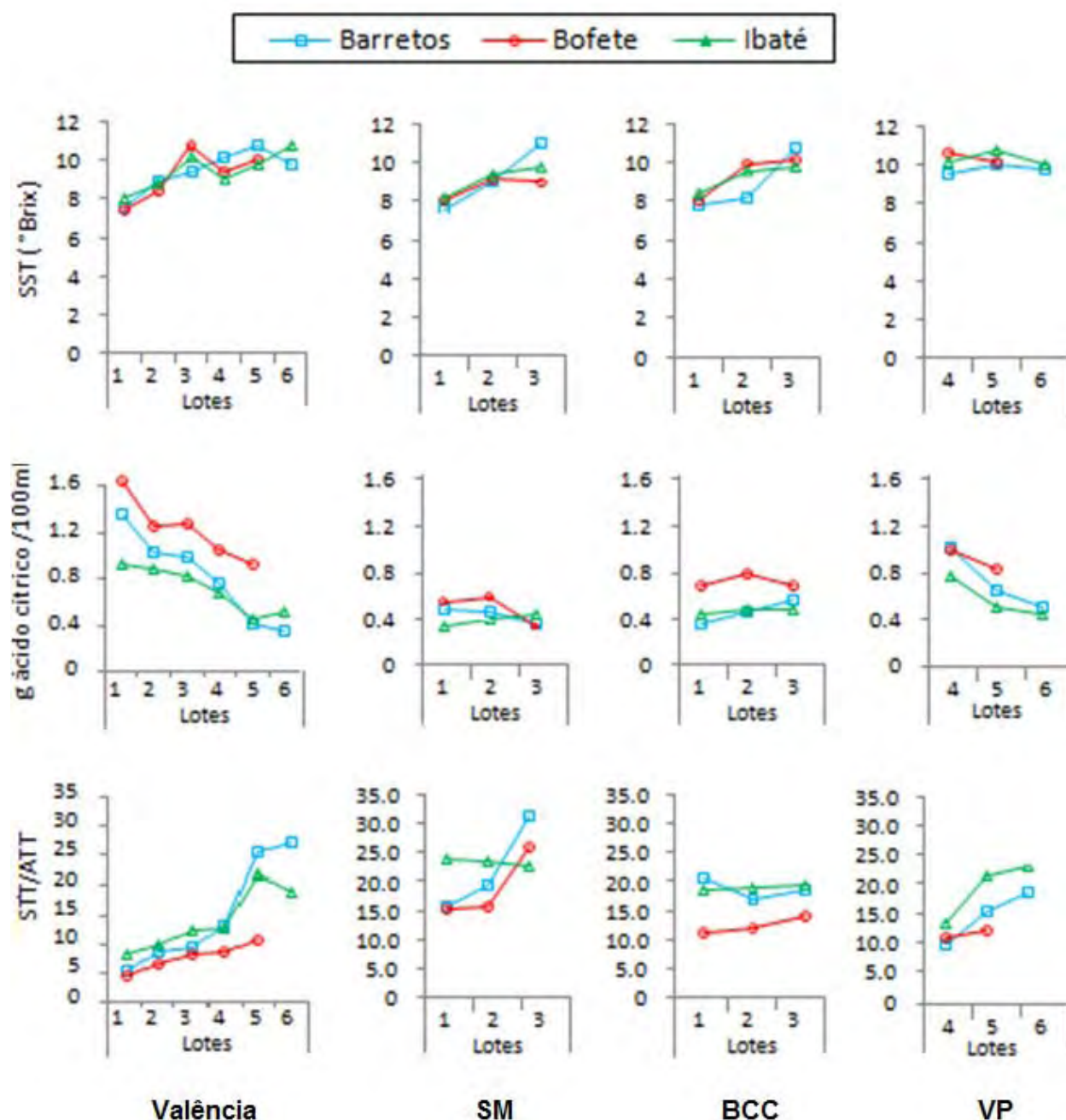


Figura 1. Valores de SST, ATT e *ratio* de quatro variedades de laranjas cultivadas em três cidades do Estado de São Paulo, Brasil. Cada ponto representa a média de três repetições.

Os teores médios de SST das amostras analisadas variaram de 8,7 a 10,3 °Brix, e estes não diferiram estatisticamente ($p > 0,05$) entre si. Em relação a acidez, os teores médios foram de 0,39 a 1,23 g de ácido cítrico/100 mL, sendo que as laranjas de polpa vermelha SM e BCC apresentaram teores significativamente menores ($p \leq 0,05$) quando comparados aos das laranjas VP, e principalmente em relação às laranjas Valência. Observou-se que com exceção das laranjas SM que apresentaram teores que não diferiram ($p > 0,05$) entre as cidades, as outras variedades apresentaram os maiores teores de acidez quando cultivadas em Bofete, seguida das cidades de Barretos e Ibaté.

Os valores de *ratio* (SST/ATT) que são utilizados como indicador do estágio de maturação variaram significativamente ($p \leq 0,05$) entre os lotes analisados. As variedades de polpa vermelha apresentaram valores médios de 11,4 a 23,5, valores maiores que os encontrados nas laranjas claras (7,84 a 14,9), porém, houve diferença significativa ($p \leq 0,05$) apenas entre as laranjas Valência de Bofete (7,84) e as laranjas SM cultivadas em Barretos (22,2) e em Ibaté (23,7). Pelos dados obtidos verificou-se que as variedades de polpa vermelha, em especial a SM, apresentaram maturação mais precoce que as laranjas Valência, isto porque seus frutos apresentaram sucos com menores teores de acidez e maiores valores de *ratio*, característica esta também observada no trabalho de Latado et al. (2008), no qual as laranjas SM cultivadas em diversas cidades apresentaram maturação mais precoce que as laranjas Pêra (polpa clara).

Esta evolução do *ratio* em laranjas doces pode ser explicada pela variação genética, idade das árvores, florada, produtividade e condições climáticas (VOLPE et al., 2002). Para as laranjas claras a faixa de *ratio* pode variar entre 6 e 20 durante a maturação, sendo o intervalo de 15 a 18, o preferido pelos consumidores, e a faixa compreendida entre 11 e 14, ideal para a industrialização (VIÉGAS, 1991).

Compostos bioativos

De um modo geral, as frutas apresentam em sua constituição vários compostos com ação antioxidante, como o ácido ascórbico, os carotenóides e os compostos fenólicos. A quantidade e o perfil destes fitoquímicos mudam em função do tipo, variedade e grau de maturação da fruta, bem como das condições climáticas e edáficas do cultivo (LEONG e SHUI, 2002).

Os resultados de ácido ascórbico mostraram que as laranjas Valência (70,2 a 85,4 mg AA/100 mL) apresentaram maiores teores médios em relação às variedades de polpa vermelha SM (65,1 a 74,7 mg AA/100 mL), BCC (55,8 a 68,5 mg AA/100 mL) e VP (63,9 a 79,7 mg AA/100 mL), porém, com exceção dos teores das laranjas Valência cultivadas em Bofete e Ibaté e da variedade VP de Bofete que foram significativamente maiores ($p \leq 0,05$) do que o teor BCC de Barretos, os demais não diferiram ($p > 0,05$) entre si. Observou-se também que as laranjas cultivadas em Barretos apresentaram as menores concentrações deste composto do que as obtidas pelas laranjas de Bofete e Ibaté (Figura 2).

O conteúdo de AA encontrado na variedade Valência foi semelhante aos encontrados em trabalhos de Couto e Canniatti-Brazaca (2010) (78,5 mg AA/100 mL) e Duzzioni et al. (2010) (79,4 mg AA/100 mL) para esta mesma variedade porém cultivada em diferentes cidades do Estado de São Paulo. Nas variedades de laranjas de polpa vermelha, o teor médio na SM (70,6 mg AA/100 mL) e na BCC (62,6 mg AA/100 mL) foram semelhantes ao encontrado por Moura (2010) para estas mesmas variedades, SM (74,4 mg AA/100 mL) e BCC (68,0 mg AA/100 mL), cultivadas no estado de São Paulo nas cidades São Bento de Sapucaí, Mogi Mirim e Cordeirópolis. Os resultados ora encontrados para laranjas de polpa clara e vermelha mostraram ser significativamente maiores que os relatados em trabalhos com laranjas sanguíneas, nos quais, o teor médio encontrado foi de

aproximadamente 52,0 mg AA/100 mL (RAPISARDA et al., 2001; KELEBEK et al., 2008; SELLI, 2007).

Segundo o Ministério da Saúde (BRASIL,2005), a recomendação da ingestão diária de Vitamina C para um adulto é de 45 mg, portanto, ao ingerir 100 mL do suco de qualquer uma destas variedades avaliadas, o organismo receberá um conteúdo superior ao desejado deste composto bioativo.

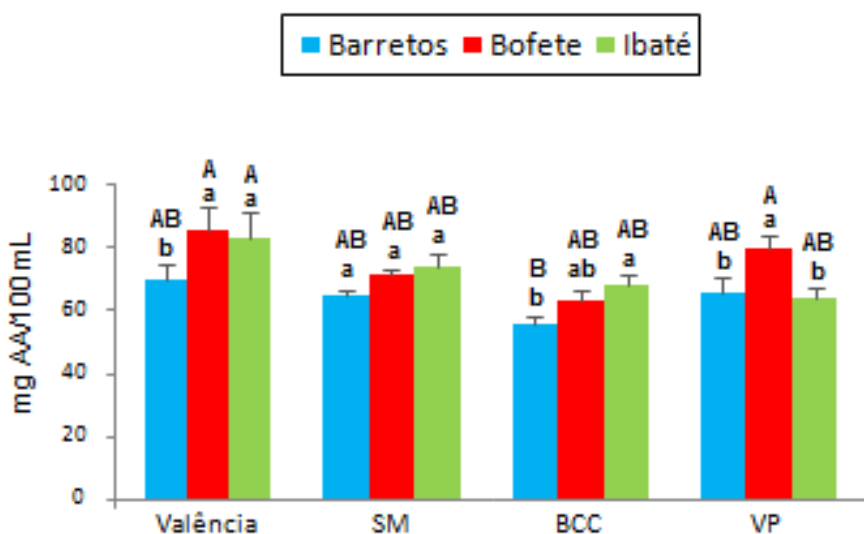


Figura 2. Teores de ácido ascórbico de quatro variedades de laranjas cultivadas em três cidades do Estado de São Paulo, Brasil.

Colunas e barras representam médias $\pm$ EP, Valência: Barretos e Ibaté (n=18), Bofete (n=15); SM e BCC: Barretos, Bofete e Ibaté (n=9); VP: Barretos e Ibaté (n=9), Bofete (n=6).

Letras minúsculas iguais indicam que não diferem significativamente entre as cidades de cultivo de determinada variedade no teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Letras maiúsculas iguais não diferem significativamente no teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Os compostos fenólicos na variedade Valência (924,9 a 1010,8 mg EAG/100 mL), na SM (878,4 a 915,3 mg EAG/100 mL), na BCC (863,5 a 875,3 mg EAG/100 mL) e na VP (914,2 a 1057,0 mg EAG/100 mL) apresentaram teores médios que não diferiram estatisticamente ($p > 0,05$) entre as variedades, nem mesmo entre as cidades de cultivo (Figura 3).

Os teores de compostos fenólicos obtidos neste trabalho mostraram-se relativamente inferiores ao descrito por Moura (2010), no qual encontrou nas variedades SM e BCC, teores médios que variaram de 1310,0 a 1680,0 mg

EAG/100mL, porém o valor médio (960,2 mg EAG/100mL) de todas as variedades foi significativamente maior que o relatado no trabalho de Duzzioni et al. (2010) para a variedade Valência (648,6 mg EAG/100mL).

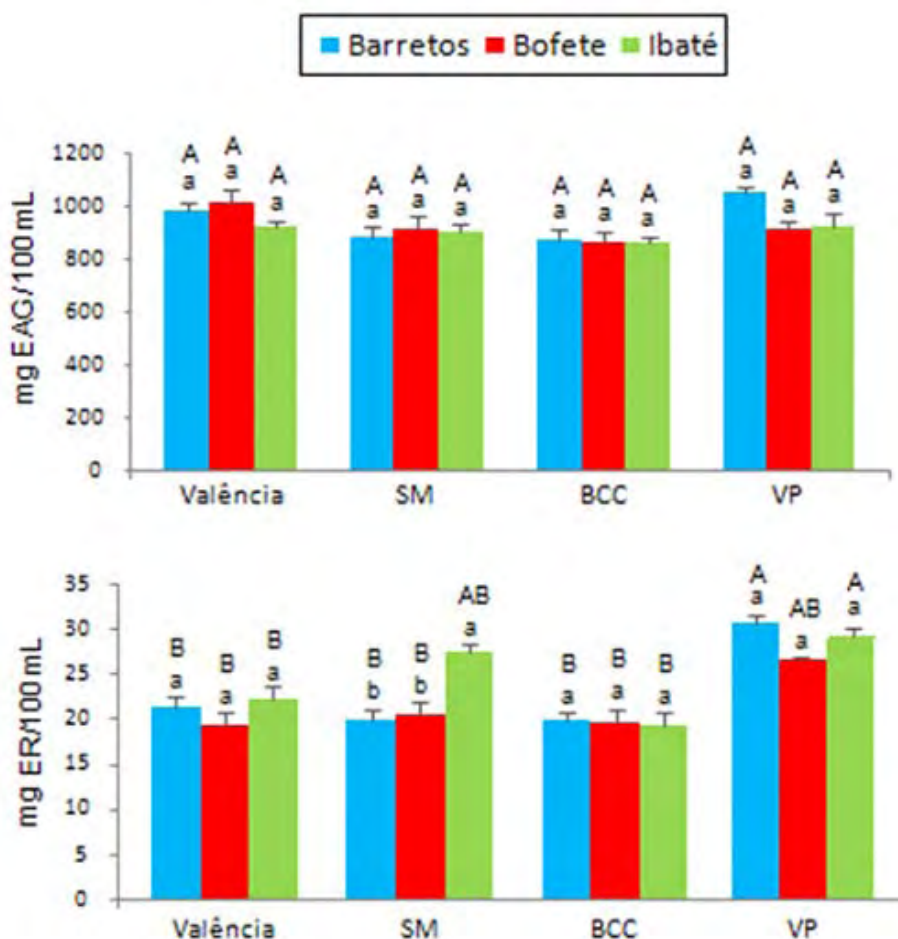


Figura 3. Teores de compostos fenólicos totais e flavonóides totais de quatro variedades de laranjas cultivadas em três cidades do Estado de São Paulo, Brasil.

Colunas e barras representam médias $\pm$ EP, Valência: Barretos e Ibaté (n=18), Bofete (n=15); SM e BCC: Barretos, Bofete e Ibaté (n=9); VP: Barretos e Ibaté (n=9), Bofete (n=6). Letras minúsculas iguais indicam que não diferem significativamente entre as cidades de cultivo de determinada variedade no teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Letras maiúsculas iguais não diferem significativamente no teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Sobre os flavonóides totais, verificou-se que os teores expressos em mg ER/100 mL variaram nas laranjas Valência de 19,4 a 22,2, na SM de 19,8 a 27,4, na BCC de 19,5 a 19,8 e na VP de 26,7 a 30,7. A variedade VP cultivada nas três cidades e a SM de Ibaté foram as que apresentaram os maiores teores deste composto. Em relação a influência das condições ambientais sobre este, somente foi

observada na variedade SM cultivada em Ibaté, pois apresentou o maior teor significativo ($p \leq 0,05$) em relação as laranjas cultivadas em Barretos e Bofete (Figura 3).

Os valores neste estudo para flavonóides totais foram relativamente semelhantes ao de Moura (2010), o qual encontrou teores médios de 14,5 a 21,7 mg ER/100 mL nas laranjas variedade Pêra, e de 10,1 a 23,5 mg ER/100 mL nas variedades de polpa vermelha, SM e BCC.

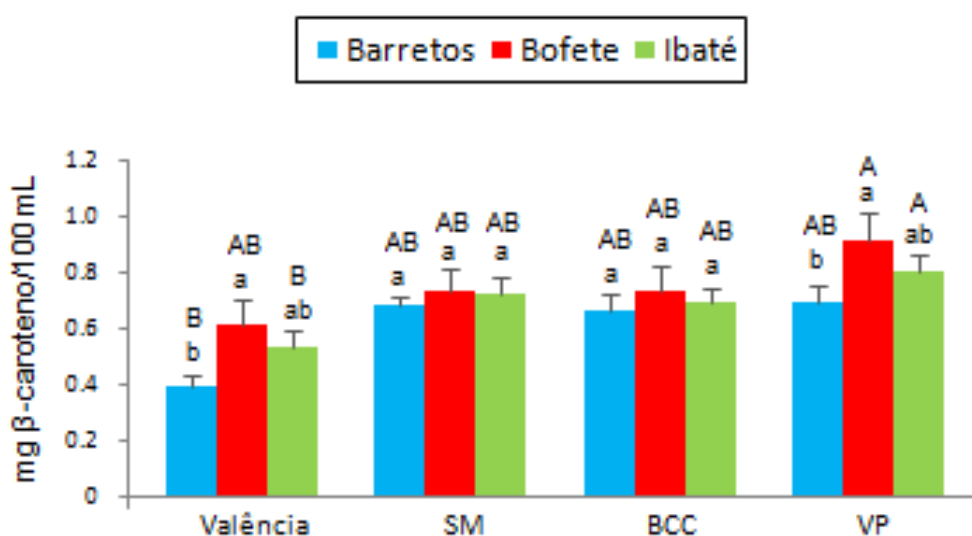


Figura 4. Teores de carotenóides totais de quatro variedades de laranjas cultivadas em três cidades do Estado de São Paulo, Brasil.

Colunas e barras representam médias $\pm$ EP, Valência: Barretos e Ibaté ($n=18$), Bofete ($n=15$); SM e BCC: Barretos, Bofete e Ibaté ($n=9$); VP: Barretos e Ibaté ($n=9$), Bofete ($n=6$).

Letras minúsculas iguais indicam que não diferem significativamente entre as cidades de cultivo de determinada variedade no teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Letras maiúsculas iguais não diferem significativamente no teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Em relação aos carotenóides totais, as concentrações médias nas laranjas Valência variaram de 0,397 a 0,615 mg β -caroteno/100 mL e nas laranjas de polpa vermelha de 0,672 a 0,915 mg/100 mL, sendo que nestas variedades SM, BCC e VP, os teores não diferiram ($p > 0,05$) entre si, porém apresentaram 20 a 76% a mais deste composto do que os encontrados nas laranjas Valência (Figura 4), característica esta já relatada por outros trabalhos que realizaram esta comparação entre laranjas de polpa clara e vermelha (LEE, 2001; XU et al., 2006; LATADO et al.,

2008; MOURA, 2010). Com isso, pode-se afirmar que este maior conteúdo de carotenóides totais nas variedades de laranjas de polpa vermelha certamente contribui para um melhor valor nutricional, além de uma cor mais viva na polpa e no suco destas laranjas.

Os carotenoides totais além de sofrerem com a influência de diferentes variedades de laranjas, também foram afetados por condições ambientais de cultivo, pois os maiores teores foram obtidos pelas laranjas cultivadas em Bofete, seguida por Ibaté e Barretos, resultado em especial para as variedades Valência e VP (Figura 4). Verificou-se também que o acúmulo de carotenóides totais nas laranjas relacionou-se com o amadurecimento das mesmas, comportamento já descrito por outros trabalhos (LEE e CASTLE, 2001; KATO et al., 2004; RODRIGO et al., 2004).

Capacidades antioxidantes

A avaliação das capacidades antioxidantes foi realizada por dois métodos, ABTS e DPPH, isto porque trabalhos descrevem que a atividade antioxidante em alimentos ocorre por diferentes mecanismos, e a utilização de apenas um método para a avaliação poderia não refletir com precisão o mecanismo de ação dos radicais livres ou dos antioxidantes (SÁNCHEZ-MORENO, 2002; PRIOR et al., 2005; THAIPONGA et al., 2006; SUN e TANUMIHARDJO, 2007; KARADAG et al., 2009; TABART et al., 2009; ALVES et al., 2010).

Neste estudo, os dois métodos ABTS e DPPH, apresentaram forte correlação positiva significativa ($p < 0,0001$) entre si, tanto para os resultados expressos em TEAC ($r = 0,8954$) quanto para os expressos em VCEAC ($r = 0,8766$), indicando assim, que os extratos das laranjas apresentaram atividades comparáveis nestes métodos. Esta correlação já havia sido relatada pelos trabalhos de Floegel et al. (2011) e Almeida et al. (2011), e ainda, estes dois trabalhos mais outros (ARNAO, 2000; KUSKOSKI et al., 2005), mencionaram que os resultados das capacidades

antioxidantes determinadas pelo método de DPPH apareceram sempre menores do que os obtidos por ABTS, perfil este também observado neste estudo (Tabela 2).

Tabela 2. Valores das capacidades antioxidantes de quatro variedades de laranjas cultivadas em três cidades do Estado de São Paulo, Brasil.

		ABTS		DPPH	
		TEAC ($\mu\text{mol/g}$)	VCEAC ($\text{mg}/100\text{g}$)	TEAC ($\mu\text{mol/g}$)	VCEAC ($\text{mg}/100\text{g}$)
Valência	Barretos	96,7 ^a _B $\pm$ 3,1	150,9 ^a _B $\pm$ 5,1	82,3 ^a _B $\pm$ 5,5	133,9 ^a _B $\pm$ 10,8
	Bofete	100,0 ^a _{AB} $\pm$ 3,0	156,6 ^a _{AB} $\pm$ 1,2	94,1 ^a _{AB} $\pm$ 1,8	150,4 ^a _{AB} $\pm$ 3,21
	Ibaté	98,2 ^a _{AB} $\pm$ 1,8	163,9 ^a _{AB} $\pm$ 2,4	84,1 ^a _B $\pm$ 3,8	145,4 ^a _B $\pm$ 6,5
SM	Barretos	116,5 ^a _{AB} $\pm$ 2,8	176,6 ^a _{AB} $\pm$ 1,1	97,8 ^a _{AB} $\pm$ 5,6	175,5 ^a _{AB} $\pm$ 14,0
	Bofete	120,7 ^a _A $\pm$ 3,8	187,0 ^a _A $\pm$ 4,1	114,5 ^a _A $\pm$ 5,9	192,9 ^a _A $\pm$ 9,6
	Ibaté	120,0 ^a _A $\pm$ 2,5	188,2 ^a _A $\pm$ 4,6	103,3 ^a _{AB} $\pm$ 8,5	187,3 ^a _A $\pm$ 9,7
BCC	Barretos	96,8 ^a _B $\pm$ 3,8	149,9 ^a _B $\pm$ 5,6	78,5 ^a _B $\pm$ 5,2	129,2 ^a _B $\pm$ 8,7
	Bofete	99,1 ^a _{AB} $\pm$ 5,5	159,5 ^a _{AB} $\pm$ 6,9	93,6 ^a _{AB} $\pm$ 9,8	153,0 ^a _{AB} $\pm$ 18,2
	Ibaté	97,5 ^a _{AB} $\pm$ 5,3	157,9 ^a _B $\pm$ 7,1	81,3 ^a _B $\pm$ 2,0	131,8 ^a _B $\pm$ 2,7
VP	Barretos	94,3 ^a _B $\pm$ 5,7	146,6 ^a _B $\pm$ 7,1	81,3 ^a _B $\pm$ 7,3	124,7 ^a _B $\pm$ 16,5
	Bofete	102,1 ^a _{AB} $\pm$ 3,7	159,9 ^a _{AB} $\pm$ 4,9	93,0 ^a _{AB} $\pm$ 6,2	149,6 ^a _{AB} $\pm$ 10,7
	Ibaté	93,8 ^a _B $\pm$ 4,8	147,6 ^a _B $\pm$ 6,8	84,4 ^a _B $\pm$ 7,1	127,8 ^a _B $\pm$ 12,6

Média $\pm$ EP. Valência: Barretos e Ibaté (n=18), Bofete (n=15); SM e BCC: Barretos, Bofete e Ibaté (n=9); VP: Barretos e Ibaté (n=9), Bofete (n=6).

Letras minúsculas iguais na mesma coluna indicam que não diferiram significativamente entre as cidades de cultivo de determinada variedade no teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Letras maiúsculas iguais na mesma coluna, não diferiram significativamente no teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

As laranjas analisadas apresentaram valores médios de TEAC pelos métodos ABTS e DPPH que variaram respectivamente de 93,8 a 120,7 $\mu\text{mol/g}$ e 81,3 a 114,5 $\mu\text{mol/g}$. Pelo método ABTS as laranjas SM cultivadas em Bofete e Ibaté apresentaram os maiores valores significativos ($p \leq 0,05$) quando comparados as laranjas Valência, BCC e VP cultivadas em Barretos, e a VP de Ibaté, e as demais laranjas apresentaram resultados que não diferiram ($P > 0,05$) entre si. Já pelo método de DPPH, a variedade SM de Bofete foi a que apresentou o maior valor

significativo ($p \leq 0,05$) em relação às outras três variedades cultivadas em Barretos e Ibaté.

Para VCEAC, os valores médios pelo método ABTS foram de 146,6 a 188,2 mg/100g, e pelo DPPH, de 124,7 a 192,9 mg/100g. Através dos dois métodos foi observado que a variedade SM produzida em Bofete e Ibaté apresentaram os maiores valores significativos ($p \leq 0,05$) em comparação às outras variedades cultivadas em Barretos e Ibaté, e as demais laranjas apresentaram valores de VCEAC que não diferiram ($P > 0,05$) entre si.

Com estes dados foi observado que ocorreram diferenças significativas ($p \leq 0,05$) nas capacidades antioxidantes quando comparadas entre variedades e cidades de cultivo, no entanto, é importante observar que não foram encontradas diferenças significativas ($P > 0,05$) nos valores obtidos entre as cidades de cultivo das variedades analisadas de forma isolada.

Os resultados das capacidades antioxidantes não foram comparados com obtidos por outros estudos, pois vêm sendo relatado que os métodos apresentam variações nos protocolos no modo de realizar os ensaios, como por exemplo, a concentração utilizada do radical sintético, o tempo de incubação, o pH da mistura da reação, e além da utilização de diferentes formas de expressar os resultados (PRIOR et al., 2005; SUN e TANUMIHARDJO, 2007; STRATIL et al., 2007; SHARMA e BHAT, 2009), sendo assim, incoerente a comparação destes resultados.

Correlação entre os compostos bioativos e as capacidades antioxidantes

O ácido ascórbico foi o único composto bioativo que apresentou correlação positiva significativa com a TEAC e VCEAC determinadas pelos dois métodos. Os carotenóides também contribuíram de forma significativa para a TEAC e VCEAC determinadas por ABTS, e TEAC por DPPH. Já os compostos fenólicos apresentaram correlação significativa apenas com a TEAC avaliada por ABTS, e, em

relação aos flavonóides totais, não foi verificada nenhuma contribuição significativa para as capacidades antioxidantes (Tabela 3).

Tabela 3. Correlação dos compostos bioativos na atividade antioxidante.

		ABTS		DPPH	
		TEAC	VCEAC	TEAC	VCEAC
Ácido ascórbico	r	0,4749	0,3355	0,4846	0,4413
	p	0,0020	0,0343	0,0015	0,0044
Fenólicos totais	r	0,4057	0,2140	0,2656	0,2245
	p	0,0094	0,1849 ^{ns}	0,0976 ^{ns}	0,1637 ^{ns}
Flavonóides totais	r	0,2521	0,1010	0,0308	0,0040
	p	0,1267 ^{ns}	0,5464 ^{ns}	0,8543 ^{ns}	0,9808 ^{ns}
Carotenóides totais	r	0,4755	0,4513	0,3756	0,3034
	p	0,0045	0,0074	0,0286	0,0811 ^{ns}

r, coeficiente de correlação de Pearson; p, valor de p, em negrito ($p \leq 0,05$),
^{ns}, não significativo.

Avaliadas por estes métodos, ABTS e DPPH, as capacidades antioxidantes são facilmente correlacionadas com ácido ascórbico presentes em frutas cítricas (SÁNCHEZ-MORENO et al., 2003; PROTEGGENTE, et al., 2003; THAIPONG et al., 2006; PELLEGRINI et al., 2007; STELLA et al., 2011), porém, esta não foi observada por Almeida et al. (2011) e Couto e Canniatti-Brazaca, (2010). A correlação significativa entre carotenóides e capacidade antioxidante aqui observadas também já havia sido relatada por Mahattanatawee et al.(2006) e Sánchez-Moreno et al. (2003). Do mesmo modo, trabalhos também já tinham observado que a contribuição dos flavanóides totais para a capacidade antioxidante mostrou ser insignificante (SÁNCHEZ-MORENO et al., 2003; GHASEMI et al., 2009; RUFINO et al., 2010). Já o dado da contribuição significativa de fenólicos totais somente na TEAC determinado por ABTS foi um pouco diferente da maioria dos trabalhos, pois normalmente encontram forte correlação positiva entre compostos fenólicos totais e capacidade antioxidante, tanto pelo método ABTS quanto para o

método DPPH (PROTEGGENTE, et al., 2003; THAIPONGA et al., 2006; PELLEGRINI et al., 2007; RUFINO et al., 2010; STELLA et al., 2011).

CONCLUSÃO

As laranjas de polpa vermelha em comparação a variedade Valência apresentaram sucos menos ácidos e sem diferenças significativas nas concentrações de ácido ascórbico e compostos fenólicos totais. Para os flavonóides totais, apenas as laranjas VP cultivadas em Barretos e Ibaté apresentaram os maiores teores significativos. Os conteúdos de carotenóides totais não diferiram entre as variedades de polpa vermelha, porém estas mostraram ter de 20 a 76% a mais deste composto do que a variedade Valência. Os menores teores de ácido ascórbico e carotenóides totais foram obtidos pelas laranjas cultivadas em Barretos, cidade que esta localizada em uma menor altitude em relação a Bofete e Ibaté, e caracterizada por apresentar temperaturas elevadas. A variedade SM foi a que apresentou os maiores valores das capacidades antioxidantes, e o ácido ascórbico foi o que mais contribuiu para esta propriedade, seguido pelos carotenóides totais e compostos fenólicos totais. Portanto, as características físico-químicas e compostos bioativos das laranjas analisadas mostraram sofrer influência de diferentes variedades e condições ambientais de cultivo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, M.M.B.; SOUSA, P.H.M.; ARRIAGA, A.M.C.; PRADO, G.M.; MAGALHÃES, C.E.C.; MAIA, G.A.; LEMOS, T.L.G. Bioactive compounds and antioxidant activity of fresh exotic fruits from northeastern Brazil, **Food Res. Int.**, Darking, v.44, n.7, p.2155-2159, 2011.
- ALVES, C.Q.; DAVID, J.M.; DAVID, J.P.; BAHIA, M.V.; AGUIAR, R.M. Methods for determination of in vitro antioxidant activity for extracts and organic compounds. **Quím. Nova**, v.33, n.10, p.2202-2210, 2010.
- AOAC. Official methods of analysis of the association of official analytical chemists. 18th ed. Washington, CC: AOAC, 2005.
- ARNAO, M.B. Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: A practical case. **Trends Food Sci. Technol.**, v.11, n.11, p.419-421, 2000.
- ARNAO, M.B.; CANO, A.; ACOSTA, M. The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity. **Food Chem.**, v.73, n.2, p.239-244, 2001.
- BITTERS, W.P. Physical characters and chemical composition as affected by scions and rootstocks. In: SINCLAIR, W.B. (Ed.). **The orange: its biochemistry and physiology**. Riverside: The University of California, 1961. p.56-95.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensm. Wiss. Technol.**, v.28, p.25-30, 1995.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 269, de 22 de setembro de 2005. Aprova o regulamento técnico sobre a Ingestão Diária Recomendada (IDR) de proteína, vitaminas e minerais. Diário Oficial da União, Brasília, 23 de setembro, 2005.
- COUTO, M.A.L.; CANNIATTI-BRAZACA, S.G. Quantification of vitamin C and antioxidant capacity of citrus varieties. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v.30, p.15-19, 2010.
- DUZZIONI, A.G.; FRANCO, A.G.; DUZZIONI, M.; SYLOS, C.M. Determinação da atividade antioxidante e de constituintes bioativos em frutas cítricas. **Alim. Nutr.**, v.21, n.4, p.643-649, 2010.
- FANCIULLINO, A.L.; CERCOS, M.; DHUIQUE-MAYER, C.; FROELICHER, Y.; TALON, M.; OLLITRAULT, P.; MORILLON, R. Changes in carotenoid content and biosynthetic gene expression in juice sacs of four orange varieties (*Citrus sinensis*) differing in flesh fruit color. **J. A. Food Chem.**, v.56, n.10, p.3628-3638, 2008.

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. **J. Food Comp. Anal.**, v.24, p.1043-1048, 2011.

GHASEMI, K.; GHASEMI, Y.; EBRAHIMZADEH, M.A. Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of 13 citrus species peels and tissues. **Pak. J. Pharm. Sci.**, v.22, n.3, p.277-281, 2009.

JAYAPRAKASHA, G.K.; PATIL, B.S. In vitro evaluation of the antioxidant activities in fruit extracts from citron and blood orange. **Food Chem.**, v.101, p.410-418, 2007.

KARADAG, A.; OZCELIK, B.; SANER, S. Review of methods to determine antioxidant capacities. **Food Anal. Methods**, v.2, p.41-60, 2009.

KATO, M.; IKOMA, Y.; MATSUMOTO, H.; SUGIURA, M.; HYODO, H.; YANO, M. Accumulation of carotenoids and expression of carotenoid biosynthetic genes during maturation in citrus fruit. **Plant Physiol.**, v.134, n.2, p.1-14, 2004.

KELEBEK, H.; CANBAS, A.; SELLI, S. Determination of phenolic composition and antioxidant capacity of blood orange juices obtained from cvs. Moro and Sanguinello (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) grown in Turkey. **Food Chem.**, v.107, n.4, p.1710-1716, 2008.

KUSKOSKI, E.M.; ASUERO, A.G.; TRONCOSO, A.M.; MANCINI-FILHO, J; FETT, R. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v.25, p.726-732, 2005.

LATADO, R.R.; VOIGT, V.; NISHIMURA, D.S.; LEO, H.C.; SYLOS, C.M. Laranjas de polpa vermelha. Caracterização de frutos e do suco dos frutos. Anais do XX Congresso Brasileiro de Fruticultura. 54th Annual Meeting of the Interamerican Society for Tropical Horticulture. Vitória/ES, 12-17 de Out., 2008.

LEE, H.S. Characterization of carotenoids in juice of red Navel orange (Cara Cara). **J. Agric. Food Chem.**, v.49, n.5, p.2563-2568, 2001.

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

LEONG, L.P.; SHUI, G. An investigation of antioxidant capacity of fruits in Singapore markets. **Food Chem.**, v.76, p. 69-75, 2002.

LIU, Q.; XU, J.; LIU, Y.Z.; ZHAO, X.L.; DENG, X.X.; GUO, L.L.; GU, J.Q. A novel bud mutation that confers abnormal patterns of lycopene accumulation in sweet orange fruit (*Citrus sinensis* L. Osbeck). **J. Exp. Bot.**, v.58, n.15-16, p.4161-4171, 2007.

MAHATTANATAWEE, K.; MANTHEY, J.A.; LUZIO, G.; TALCOTT, S.T.; GOODNER, K.; BALDWIN, E. A. Total antioxidant activity and fiber content of select Florida-grown tropical fruits. **J. Agric. Food Chem.**, v.54, n.19, p.7355-7363, 2006.

MOURA, L.M. **Compostos bioativos em frutas cítricas: quantificação, avaliação da atividade antioxidante, parâmetros de cor e efeito da pasteurização**. 2010. 142f. Tese (Doutorado em Alimentos e Nutrição) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara-SP, 2010.

PELLEGRINI, N.; COLOMBI, B.; SALVATORE, S.; BRENNAN, O.V.; GALAVERNA, G.; RIO, D.D.; BIANCHI, M.; BENNETT, R. N.; BRIGHENTI, F. Evaluation of antioxidant capacity of some fruit and vegetable foods: efficiency of extraction of a sequence of solvents. **J. Sci. Food Agric.**, v.87, p.103-111, 2007.

PIMENTEL, C.V.M.; FRANCKI, V.M.; GOLLÜCKE, A.P.B. **Alimentos funcionais: introdução as principais substâncias bioativas em alimentos**. São Paulo: Ed. Varela, 2005. 95 p.

PRIOR, R.L.; WU, X.; SCHAICH, K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. **J. Agric. Food Chem.**, v.53, n.8, p.3101-3113, 2005.

PROTEGGENTE, A.R.; SAIJA, A.; De PASQUALE, A.; RICE-EVANS, C.A. The compositional characterisation and antioxidant activity of fresh juices from sicilian sweet orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck) Varieties. **Free Radic. Res.**, v.37, n.6, p.681-687, 2003.

RAPISARDA, P.; BELLOMO, S.E.; INTELISANO, S. Storage temperature effects on blood orange fruit quality. **J. Agric. Food Chem.**, v.49, n.7, p.3230-3235, 2001.

RODRIGO, M.J.; MARCOS, J.F.; ZACARIAS, L. Biochemical and molecular analysis of carotenoid biosynthesis in flavedo of orange (*Citrus sinensis* L.) during fruit development and maturation. **J. Agric. Food Chem.**, v.52, n.22, p.6724-6731, 2004.

RODRIGUEZ-AMAYA, DB. A guide to carotenoid analysis in foods. Washington DC: ILSI Press, 2001. 64p.

RUFINO, M.S.M.; ALVES, R.E.; BRITO, E.S.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F.; MANCINI FILHO, J. Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. **Food Chem.**, v.121, n.4, p.996-1002, 2010.

SÁNCHEZ-MORENO, C. Review: methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. **Food Sci. Tech. Int.**, v.8, n.3, p.121-137, 2002.

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. **J Sci Food Agric.**, v.83, n.5, p.430-439, 2003.

SCALBERT, A.; MONTIES, B.; JANIN, G. Tannins in wood: comparison of different estimation methods. **J Agric Food Chem.**, v.37, p.1324-1329, 1989.

SELLI, S. Volatile constituent of orange wine obtained from Moro oranges (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck). **J. Food Quality**, v.30, n.3, p.330-3-41, 2007.

SHARMA, O.P.; BHAT, T.K. DPPH antioxidant assay revisited. **Food Chem.**, v.113, n.4, p.1202-1205, 2009.

SAUNT J: **Citrus varieties of the world**. Sinclair International Ltd., Norwich, England; 2000.

SILALAH, J. Anticancer and health protective properties of citrus fruit components. **Asia Pac. J. Clin.Nutr.**, v.11, p.79-84, 2002.

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

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

STRATIL, P.; KLEJDUS, B.; KUBÁN, V. Determination of phenolic compounds and their antioxidant activity in fruits and cereals. **Talanta**, v.71, n.4, p.1741-1751, 2007.

SUN, T.; TANUMIHARDJO, S.A. An integrated approach to evaluate food antioxidant capacity. **J. Food Sci.**, v.72, n.9, p.159-165, 2007.

TABART, J.; KEVERS, C.; PINCEMAIL, J.; DEFRAIGNE, J.O.; DOMMES, J. Comparative antioxidant capacities of phenolic compounds measured by various tests. **Food Chem.**, v.113, n.4, p.1226-1233, 2009.

THAIPONG, K.; BOONPRAKOB, U.; CROSBY, K.; CISNEROS-ZEVALLOS, L.; BYRNE, D.H. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. **J. Food Comp. Anal.**, v.19, n.6-7, p.669-675, 2006.

VIÉGAS, F.C.P. **A citricultura brasileira**. 2 ed. Campinas: Cargil, 1991.

VOLPE, A.C.; SHOFFELE, R.; BARBOSA, J.C. Influência da soma térmica e da chuva durante o desenvolvimento de laranjas “Valência” e “Natal” na relação entre sólidos solúveis e acidez e no índice tecnológico do suco. **Ver. Bras. Frutic.**, v.24, n.2, p.436-441, 2002.

XU, C.J.; FRASER, P.D.; WANG, W.J.; BRAMLEY, P.M. Differences in the carotenoid content of ordinary citrus and lycopene-accumulating mutants. **J. Agric. Food Chem.**, v.54, n.15, p.5474-5481, 2006.

YAHIA, E.M. The contribution of fruit and vegetable consumption to human health. In: ROSA, L.A.; ALVAREZ-PARRILLA, E.; GONZALEZAGUILARA, G.A. **Fruit and vegetable**

phytochemicals: chemistry, nutritional value and stability. Hoboken: Wiley-Blackwell, 2010. p.3-51.

YU, D.; DAHEGREN, R.A. Evaluation of methods for measuring polyphenol in coniter foliage. **J. Chem. Ecol.**, v.26, p.2119-2140, 2000.

ZHISHEN, J.; MENGCHENG, T.; JIANMING, W. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. **Food Chem.**, v.64, p.555-559, 1999.

CAPÍTULO 3

INFLUÊNCIA DA VARIEDADE E REGIÃO DE CULTIVO SOBRE FLAVANONAS, CAROTENÓIDES E COR DE LARANJAS DE POLPA VERMELHA

RESUMO

As laranjas contêm compostos bioativos benéficos à saúde humana. A composição qualitativa e quantitativa destas substâncias pode variar em função das condições de cultivo e entre variedades. No Brasil, a procura por novas variedades de laranja fez surgir o interesse pelas laranjas de polpa vermelha que possuem o licopeno, carotenóide que apresenta potencial atividade antioxidante, e não está presente nas laranjas de polpa clara, que são as mais cultivadas. Desta forma, os objetivos deste trabalho foram identificar e quantificar as principais flavanonas glicosídicas, e carotenóides presentes em três variedades de laranjas de polpa vermelha (Sanguínea de Mombuca (SM), Baía Cara-Cara (BCC) e Valência Puka (VP)) cultivadas em três cidades (Barretos, Bofete e Ibaté do Estado de São Paulo, Brasil), e comparar os resultados com os obtidos por laranjas de polpa clara Valência, cultivadas nas mesmas condições, além disso, correlacionar os teores dos carotenóides com os parâmetros de cor. Os carotenóides, assim como as flavanonas glicosídicas foram separados e quantificados por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) utilizando coluna C₁₈ e detector por arranjo de diodos. Os parâmetros de cor (L , a^* , b^*) foram medidos por colorímetro espectrofotômetro Hunter. As flavanonas glicosídicas identificadas em todas as variedades foram narirutina e hesperidina, apresentando concentrações que não diferiram significativamente entre as variedades, nem mesmo entre as cidades de cultivo. Com relação aos conteúdos de carotenóides, não foram observadas diferenças estatísticas entre as variedades de polpa vermelha, porém, estas mostraram ter de 20 a 76% a mais das concentrações de carotenóides totais do que a variedade Valência. O mesmo comportamento foi observado nos teores de β -caroteno, β -criptoxantina e luteína que apresentaram um aumento de 230 a 375%, 36 a 65%, e de até 37%, respectivamente. Os teores dos carotenóides violaxantina, zeaxantina e α -caroteno não apresentaram diferenças significativas entre todas as variedades, e o licopeno foi identificado apenas nas laranjas de polpa vermelha. Em relação as cidades de cultivo, os fatores ambientais de Barretos não contribuíram favoravelmente para a presença de alguns carotenóides nas amostras. Analisando os parâmetros de cor, observou-se que os sucos das laranjas de polpa vermelha apresentaram coloração mais escura, com maior saturação da cor vermelha e amarela, além de maior vivacidade quando comparados aos sucos das laranjas claras. Com base nos resultados conclui-se que não ocorreram diferenças qualitativas e quantitativas nas flavanonas encontradas entre as laranjas de polpa clara e vermelha. Já com relação aos carotenóides, as variedades SM, BCC e VP apresentaram maiores concentrações do que a Valência.

Palavras-chave: laranjas; flavanonas; carotenóides; licopeno; cor; HPLC.

ABSTRACT

Oranges contain bioactive compounds beneficial to human health. The qualitative and quantitative composition of these substances may vary depending on cultivation conditions and between varieties. In Brazil, demand for new varieties of orange has raised interest in red pulp oranges that have lycopene, carotenoid with powerful antioxidant activity, and is not present in the pulp clear oranges, which are the most cultured. Thus, the objectives of this study were to identify and quantify the major flavanone glycosides, and carotenoids in three orange varieties of red pulp (Sanguínea de Mombuca (SM), Baia Cara-Cara (BCC) e Valência Puka (VP)) grown in three cities (Barretos, Bofete and Ibaté the State of São Paulo, Brazil), and compare the results with those obtained by Valência, clear pulp oranges, grown under the same conditions, and moreover, correlate the levels of carotenoids with the color parameters. The carotenoids, like the flavanone glycosides were separated and quantified by high performance liquid chromatography (HPLC) using C18 column and a diode array detector. Color parameters (L, a *, b *) were measured by a spectrophotometer Hunter colorimeter. The flavanone glycosides identified in all varieties were narirutina and hesperidin, with concentrations that did not differ significantly between varieties, even between cities cultivation. With respect to the contents of carotenoids, there were no statistical differences between the varieties of red pulp, but these proved to have 20-76% higher concentrations of total carotenoids than the variety Valência. The same behavior was observed in the levels of β -carotene, β -cryptoxanthin and lutein which increased 230-375%, 36-65%, and up to 37%, respectively. The levels of carotenoids violaxanthin, zeaxanthin and α -carotene showed no significant differences between all varieties, and lycopene was identified only in the red pulp oranges. Regarding the cities of cultivation, environmental factors of Barretos not contributed positively to the presence of some carotenoids in samples. Analyzing the color parameters, it was observed that the juices of red pulp oranges had color darker, with greater saturation of red and yellow coloration and higher vivacity when compared to the juice from clear oranges. Based on the results it is concluded that there were no qualitative and quantitative differences in flavanones found between oranges of clear and red pulp. Now with regard to carotenoids, varieties SM, VP and BCC had higher concentrations than Valencia.

Keywords: oranges, flavanones, carotenoids, lycopene, color; HPLC.

INTRODUÇÃO

A laranja é uma das frutas cítricas mais aceitas e consumidas mundialmente, tanto na forma *in natura* como de suco. É considerada uma fruta rica em compostos que podem apresentar propriedades nutricionais e funcionais para o homem.

Dos compostos bioativos presentes nas laranjas, os carotenóides despertam grande interesse de cientistas, pois exercem atividade pró-vitaminica A (α -caroteno, β -caroteno, β -criptoxantina) e a atividade antioxidante (α -caroteno, β -caroteno, β -criptoxantina, luteína e zeaxantina) (RODRIGUEZ-AMAYA et al., 2008), atividades estas responsáveis por efeitos na prevenção e/ou proteção contra doenças graves, tais como câncer, doenças cardíacas, degeneração macular, lesão do neurônio, entre outras (TIBBLE, 1998; SLATERRY et al., 2000; CANTUTI-CASTELVETRI et al., 2000; SHAMI e MOREIRA, 2004; FRASER e BRAMLEY, 2004; KRINSKY e JOHNSON, 2005; RIBAYA-MERCADO e BLUMBERG, 2007; RAO e RAO, 2007; RODRIGUEZ-AMAYA et al., 2008; MAIANI et al., 2009). Além disso, os carotenóides são pigmentos responsáveis pela coloração, atributo de grande influência na aceitação dos alimentos (RODRIGUEZ-AMAYA et al., 2008).

Outro importante composto presente nas laranjas são as flavanonas glicosídicas. Estas são responsáveis pelo sabor e turvação dos sucos, e também apresentam capacidade antioxidante. As flavanonas têm sido consideradas diuréticas, hipolipidêmicas, analgésicas, antiinflamatórias, antialérgicas, e estudos relatam que o seu consumo também auxilia na prevenção de câncer, ateroma e hipertensão (MERKEN e BEECHER, 2000; MANTHEY et al., 2001; ATURKI et al., 2004; BENAVENTE-GÁRCIA e CASTILLO, 2008; VINUEZA et al., 2008).

Alguns trabalhos relatam que o conteúdo total e/ou proporções relativas de alguns compostos bioativos presentes em frutas podem ser influenciados por variações genéticas e fatores ambientais (MOULY et al., 1999; LEE, 2001; LEE e CASTLE, 2001; FANCIULLINO et al., 2006; MANACH et al., 2004; MELÉNDEZ-

MARTÍNEZ, 2007; FANCIULLINO et al., 2008; MAIANI et al., 2009; DHUIQUE-MAYER et al., 2009; GOBBO-NETO e LOPES, 2007; BERNARDI et al., 2010), portanto, análises químicas detalhadas são necessárias sobre produtos alimentícios resultantes de recombinações genéticas, e, além disso, é evidente a importância de avaliações de condições de cultivo e/ou coleta que conduzam a uma matéria-prima vegetal com concentrações desejáveis destes compostos bioativos (GOBBO-NETO e LOPES, 2007).

Devido aos fatos apresentados é de grande valia o estudo de variedades de laranjas que estão sendo recentemente cultivadas em diferentes regiões no Brasil, conhecidas como laranjas de polpa vermelha. Estas são caracterizadas por apresentar o licopeno, carotenóide de coloração vermelha que não é identificado nas laranjas de polpa clara (SAUNT, 2000; LEE, 2001; XU et al., 2006; LIU et al., 2007; FANCIULLINO et al., 2008; LATADO et al., 2008; MOURA, 2010).

Desta forma, o objetivo deste trabalho foi comparar três variedades de laranjas de polpa vermelha com uma variedade de polpa clara cultivadas em três cidades, em relação a identificação e quantificação das principais flavanonas glicosídicas e dos principais carotenóides. Correlacionar os teores dos carotenóides totais com parâmetros de cor, e, além disso, verificar o efeito das condições ambientais das cidades de cultivo sobre os parâmetros analisados.

MATERIAL

Três variedades de laranja de polpa vermelha: Baia Cara-Cara (BCC), Sanguínea de Mombuca (SM) e Valência Puka (VP), e uma variedade de polpa clara, Valência, cultivadas nas mesmas condições em campos experimentais localizados nas cidades de Barretos, Bofete e Ibaté do Estado de São Paulo, Brasil, foram fornecidas pelo Centro APTA Citros Sylvio Moreira/IAC. As localizações

geográficas e condições climáticas das cidades de cultivo estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1. Localizações geográficas e condições climáticas das cidades de cultivo das laranjas.

	Barretos	Bofete	Ibaté
Latitude	20°33'26"Sul	23°06'08"Sul	21°57'17"Sul
Longitude	48°34'04" Oeste	48°15'28"Oeste	47°59'48"Oeste
Altitude (m)	530	576	839
Clima	Tropical	Tropical de altitude	
Temperatura	elevada entre 18 e 28 °C.	amena entre 18 e 22 °C	Verão: > que 22 °C Frio: entre -3 e 18 °C
Amplitude térmica diária	Significativa		Não significativa
Estações	Verão quente e chuvoso Inverno ameno e seco	Inverno com geadas frequentes	Inverno seco
Índice pluviométrico	Entre 1000 e 1500mm/ano		

Fonte: IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Cidades.** www.ibge.gov.br
<http://pt.wikipedia.org/wiki/Clima>; <http://pt.wikipedia.org/wiki/Barretos> ou [Bofete](http://pt.wikipedia.org/wiki/Bofete) ou [Ibaté](http://pt.wikipedia.org/wiki/Ibaté)

As laranjas foram colhidas no ano de 2010 em diferentes estádios de desenvolvimento. As laranjas Valência foram obtidas nos meses de maio (lote 1), junho (lote 2), julho (lote 3), setembro (lote 4), outubro (lote 5) e novembro (lote 6). As variedades Sanguínea de Mombuca e Baía Cara-Cara obtidas nos meses de maio, junho e julho, e a Valência Puka nos meses de setembro, outubro e novembro. Não foram colhidas amostras de laranjas Valência e VP cultivadas na cidade de Bofete no mês de novembro. Cada lote era formado em média por 15 frutos. Os sucos das laranjas foram extraídos e armazenados em frascos de vidros cobertos com papel alumínio e mantidos a -18 °C.

MÉTODOS

Extração de flavanonas glicosídicas

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

Separação e quantificação de flavanonas glicosídicas

Utilizou-se cromatógrafo líquido (Shimadzu) com sistema quaternário de bombeamento de solvente, válvula injetora de amostra com capacidade de 20 µL, e acoplado a este, um detector por de arranjo de diodos (DAD).

Todos os solventes utilizados foram de grau cromatográfico, previamente filtrados em sistema Millipore de filtração á vácuo com membrana filtrante Nylon 66 para solvente orgânico de 0,45 µm x 47 mm. As amostras e as soluções-padrões foram filtradas em membrana filtrante FH (Millipore) de 0,22 µm.

As separações das flavanonas glicosídicas foram feitas de acordo com Moura (2010) com algumas modificações. Utilizou-se uma coluna de fase reversa (C₁₈) Shimadzu Shim-pack CLC-ODS (4,6 x 250 mm; 5 µm), e a fase móvel consistiu da mistura de acetonitrila: solução de ácido acético 5% (21:79) com vazão de 1,0 mL/minuto em 30 minutos de corrida. A detecção foi realizada a 280 nm.

As identificações das flavanonas glicosídicas foram feitas por comparação dos tempos de retenção e pelas características espectrais de absorção obtidas pelo DAD das amostras com dos respectivos padrões entre 190 e 450 nm. A quantificação foi realizada utilizando-se curvas de calibração com sete pontos de

concentração de narirutina (5-50 $\mu\text{g/mL}$) e hesperidina (20 a 280 $\mu\text{g/mL}$), ambas com $R^2 = 0,999$. Cada ponto da curva foi realizado em triplicata.

Extração e quantificação de carotenóides totais

Os carotenóides foram extraídos com acetona refrigerada (1,7°C a 3,3°C), transferidos para éter de petróleo e saponificados com KOH metanólico 10% por 16 horas. Os extratos foram lavados com água para remoção do alcali e levados a um volume em balão volumétrico. A leitura da absorbância da solução foi realizada a 450 nm, e o teor de carotenóides totais expresso em termos de β -caroteno ($A_{1\text{cm}}^{1\%}$ de 2592, em éter de petróleo), aplicando-se a Lei de Beer (RODRIGUEZ-AMAYA, 2001). Posteriormente, os extratos de carotenóides foram evaporados em rotaevaporador à temperatura máxima de 40°C, submetidos à secagem com N_2 e congelados a -18°C.

Separação e quantificação dos carotenóides isolados

Utilizou-se o mesmo cromatógrafo líquido utilizado para a análise das flavanonas. Todos os solventes utilizados foram de grau cromatográfico, previamente filtrados em sistema Millipore de filtração a vácuo com membrana filtrante Nylon 66 para solvente orgânico de 0,45 μm x 47 mm. As amostras e as soluções-padrões foram diluídas em 1mL da mistura acetona-metanol (1:1) e posteriormente filtradas em membrana filtrante FH (Millipore) de 0,22 μm .

A separação dos carotenóides foi realizada em coluna de fase reversa (C_{18}) Shimadzu Shim-pack CLC-ODS (4,6 x 250 mm; 5 μm), utilizando como fase móvel acetonitrila/metanol/acetato de etila com adição de 0,05% de trietilamina em cada solvente. Foi aplicado um gradiente de 99:1:0 para 64:1:35 em 30 minutos e 99:1:0 em 65 minutos, com vazão de 0,6 mL/minuto, temperatura média da coluna mantida a 25°C (MOURA, 2010). A detecção foi realizada a 450 nm.

Os carotenóides isolados individualmente foram identificados por comparação dos tempos de retenção e pelas características espectrais de absorção obtidos pelo DAD das amostras com dos respectivos padrões, e também valores na literatura. A quantificação de cada carotenóide foi calculada através da relação da área total (conteúdo de carotenóides totais) dos cromatogramas obtidos por CLAE.

Análise de cor

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

$$C^* = (a^{*2} + b^{*2})^{1/2}$$

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

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

Análise estatística

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com análises em duplicata para separações e quantificações de flavanonas glicosídicas e carotenóides, e em triplicata para os parâmetros de cor. A análise estatística dos resultados foi realizada através de análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Os resultados foram expressos em média $\pm$ EP (erro-padrão) dos lotes analisados. O teste de correlação de Pearson foi utilizado para determinar a correlação entre os parâmetros de cor dos sucos das laranjas e os carotenóides totais, e correlações entre os parâmetros de cor.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Separação e quantificação de flavanonas glicosídicas

Narirutina e hesperidina foram as flavanonas glicosídicas encontradas nos sucos das amostras. Estas flavanonas são as principais flavanonas presentes nas laranjas doces, grupo no qual as laranjas de polpa clara e vermelha estão inseridas (RAPISARDA et al., 1999; GIL-IZQUIERDO et al., 2001; SÁNCHEZ-MORENO et al., 2003; GATTUSO et al., 2007; MOURA e SYLOS, 2008). A hesperidina foi a principal flavanona encontrada com concentrações de 164,4 a 196,3 mg/L na SM, de 191,5 a 205,4 mg/L na BCC, de 189,8 a 212,4 mg/L na VP e de 148,2 a 184,8 mg/L na Valência. Já para narirutina, a faixa de concentração variou de 22,6 a 27,3, de 28,8 a 30,3, de 22,5 a 29,0 e de 26,5 a 30,4 mg/L para SM, BCC, VP e Valência, respectivamente. Os teores destas flavanonas não apresentaram diferenças significativas ($p>0,05$) entre as variedades de laranjas de polpa vermelha e laranjas de polpa clara, nem mesmo entre as cidades de cultivo (Figura 1).

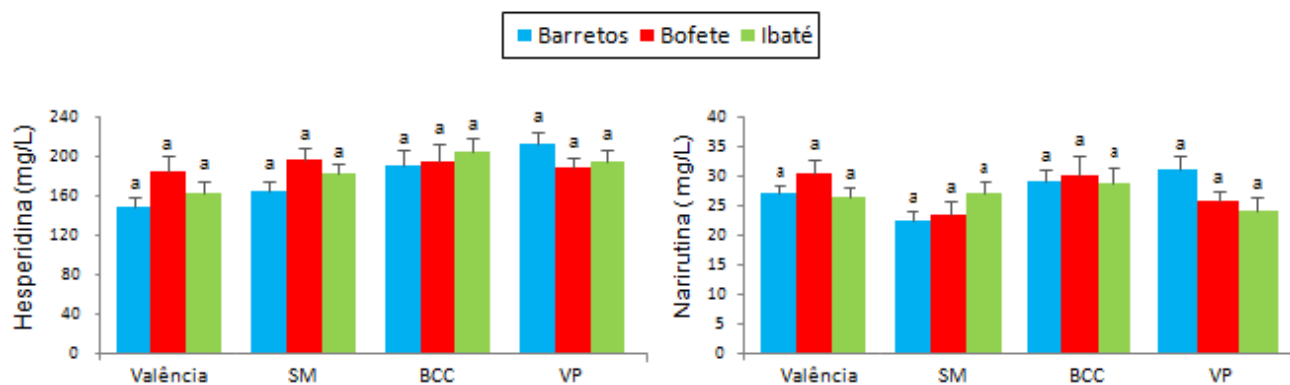


Figura 1. Teores de flavanonas glicosídicas de quatro variedades de laranjas cultivadas em três cidades do Estado de São Paulo, Brasil.

Colunas e barras representam médias $\pm$ EP, Valência: Barretos e Ibaté ($n=12$), Bofete ($n=10$); SM e BCC: Barretos, Bofete e Ibaté ($n=6$); VP: Barretos e Ibaté ($n=6$), Bofete ($n=4$). Letras iguais indicam que não diferiram significativamente no teste de Tukey ($p\leq 0,05$).

Moura (2010) estudando as variedades SM e BCC de polpa vermelha cultivadas em cidades do Estado de São de Paulo, diferentes deste trabalho,

encontraram respectivamente teores de hesperidina de 115,8 a 136,4 mg/L e de 141,06 a 153,8 mg/L, e teores de narirutina de 18,8 a 36,0 e de 25,6 a 29,6 mg/L, sendo conteúdos estes de hesperidina inferiores e os de narirutina semelhantes aos obtidos neste trabalho. Para as laranjas Valência os resultados deste trabalho foram maiores que os encontrados por Moura (2010) e por Moura e Sylos (2008) cujas concentrações variaram de 63,4 a 109,2 mg/L para hesperidina e de 6,8 a 17,8 mg/L para narirutina. E, em comparação com variedades sanguíneas Moro, Sanguinello e Tarocco que apresentam em sua composição o pigmento antocianina, nossos dados mostraram-se semelhantes aos teores de narirutina (29,8 a 32,6 mg/L) e maiores que os de hesperidina (112,9 a 143,2 mg/L) do que os verificados por Kelebek et al. (2008), e valores relativamente superiores aos conteúdos de narirutina (14,1 a 18,2 mg/L) e próximos aos de hesperidina (174,3 a 217,7 mg/L) dos obtidos no estudo de Prolegente et al. (2003).

A relação narirutina/hesperidina tem sido utilizada para o controle de qualidade de sucos de laranja. Valores médios desta relação para os sucos de laranjas Valência (0,169) e para os de laranjas de polpa vermelha, SM (0,141), BCC (0,149) e VP (0,1262) são considerados aceitáveis para o controle de qualidade, pois segundo Rousseff (1988), o suco para ser considerado autêntico tem que apresentar valores desta relação menores que 0,339.

Separação e quantificação de carotenóides

Neste trabalho foram quantificados os carotenóides que têm envolvimento na saúde humana: β -caroteno, β -criptoxantina, α -caroteno, licopeno, luteína e zeaxantina, e também, violaxantina, por ter grande concentração nestes frutos, mesmo ainda não sendo conhecidas suas implicações na saúde (RODRIGUEZ-AMAYA et al., 2008).

Nas variedades de laranjas de polpa vermelha os teores médios de carotenóides totais quantificados em termos de β -caroteno variaram de 6,72 a 9,15

mg/L e não diferiram ($p>0,05$) entre si, porém, mostraram ter de 20 a 76% a mais destes teores que os encontrados nas laranjas claras (3,97 a 6,15 mg/L), característica esta já relatada em outros trabalhos que avaliaram as laranjas de polpa vermelha (LEE 2001; XU et al., 2006; LATADO et al., 2008; MOURA, 2010). Com os dados, verificou-se que este composto sofreu influência das condições ambientais de cultivo, pois os maiores teores foram encontrados nas laranjas cultivadas em Bofete, seguida por Ibaté e Barretos (Figura 2). Observou-se também que o acúmulo de carotenóides totais nas laranjas relacionou-se ao amadurecimento das mesmas, como descrito em alguns trabalhos (LEE e CASTLE, 2001; KATO et al., 2004; RODRIGO et al., 2004). Nas variedades de laranjas de polpa vermelha, este maior conteúdo de carotenóides totais certamente contribui para uma cor mais viva da polpa e do suco, além de um melhor valor nutricional.

Os carotenóides separados por CLAE foram identificados por comparação dos tempos de retenção e pelas características espectrais de absorção obtidas pelo DAD das amostras com dos respectivos padrões, e também valores na literatura (BRITTON et al., 1995; RODRIGUEZ-AMAYA, 2001). A quantificação de cada carotenóide foi obtida por relação do conteúdo de carotenóides totais, ou seja, a área de cada pico do carotenóide correspondente em relação a área total do cromatograma obtido por CLAE. Esta maneira de quantificar os teores foi semelhante a realizada por Lee e Castle (2001) que apresentaram os resultados em porcentagens em relação aos carotenóides totais, já outros trabalhos quantificaram os carotenóides isolados utilizando curvas de calibração (GAMA e SYLOS, 2005, FANCIULLINO et al., 2008). Devido a estas diferenças nas quantificações dos teores, tornam-se difíceis comparações de valores entre trabalhos.

As médias em porcentagens dos pigmentos carotenóides analisados nas laranjas Valência e nas três variedades de polpa vermelha foram respectivamente: violaxantina (15,39 e 10,74%), luteína (15,03 e 12,03%), zeaxantina (12,99 e 10,29%), β -criptoxantina (15,31 e 15,59%), α -caroteno (3,02 e 3,52%), β -caroteno

(6,80 e 18,83%), e licopeno (7,80%), este último presente apenas nas laranjas vermelhas. Com isso, verificou-se que nas laranjas Valência o principal carotenóide foi violaxantina, seguido de β -criptoxantina, luteína, zeaxantina, β -caroteno e α -caroteno, já nas variedades de laranjas de polpa vermelha, o principal carotenóide foi o β -caroteno, seguido por β -criptoxantina, luteína, violaxantina, zeaxantina, licopeno e α -caroteno.

O licopeno é o carotenóide de grande interesse neste estudo, pois está presente somente nas laranjas de polpa vermelha. As variedades SM, BCC e VP apresentaram teores médios de 0,54 a 0,61 mg de licopeno/L, e estes não apresentaram diferenças significativas ($p>0,05$) entre as variedades e entre as cidades de cultivo (Figura 2). Este carotenóide de pigmentação vermelha aparece atualmente como um dos mais potentes agentes antioxidantes naturais, pois exerce forte ação contra radicais livres, e assim, está sendo sugerido na prevenção de doenças cardiovasculares e de carcinogênese, com maiores evidências benéficas para tumores de próstata, pulmão e estômago (CLINTON, 1998; GIOVANNUCCI, 1999; SHAMI e MOREIRA, 2004; KRIS-ETHERTON et al., 2002). Além disso, o licopeno pode ser responsável por efeitos benéficos realizados por mecanismos não-antioxidante, pois o aumento de sua concentração no corpo pode regular funções de genes, modular a resposta hormonal e imune, diminuindo assim o risco de aparecimento de doenças crônicas (ARGAWAL e RAO, 2000; RAO e RAO, 2007).

O β -caroteno é outro importante carotenóide neste estudo, pois foi o principal encontrado nas variedades de laranjas de polpa vermelha, as quais obtiveram teores médios de 1,00 a 1,98 mg/L, e estes não diferiram significativamente ($p>0,05$) entre si. Variedades SM, BCC e VP apresentaram de 230 a 375% a mais deste carotenóide quando comparado aos teores obtidos pelas laranjas Valência. Outros trabalhos que compararam os teores de carotenóides em laranjas de polpa vermelha com laranjas de polpa clara também relataram este aumento considerável de β -caroteno (LEE, 2001; LATADO et al., 2008; MOURA 2010). Outro importante

aspecto observado foi que o β -caroteno sofreu com as diferenças de condições ambientais de cultivo nas laranjas de polpa vermelha, visto que apresentam os maiores teores quando cultivadas em Bofete, seguida por Ibaté, e os menores teores significativos ($p \leq 0,05$) quando cultivadas em Barretos (Figura 2). Com os resultados obtidos pode-se dizer que estas laranjas de polpa vermelha são potenciais fontes de β -caroteno, e este além de fornecer uma cor mais forte para estas laranjas, também fornece uma importante atividade pró-vitaminica A, com 100% desta atividade, enquanto que o α -caroteno e o β -criptoxantina apresentam 50% ou menos (CORTÉS et al., 2004; RODRIGUEZ-AMAYA et al., 2008).

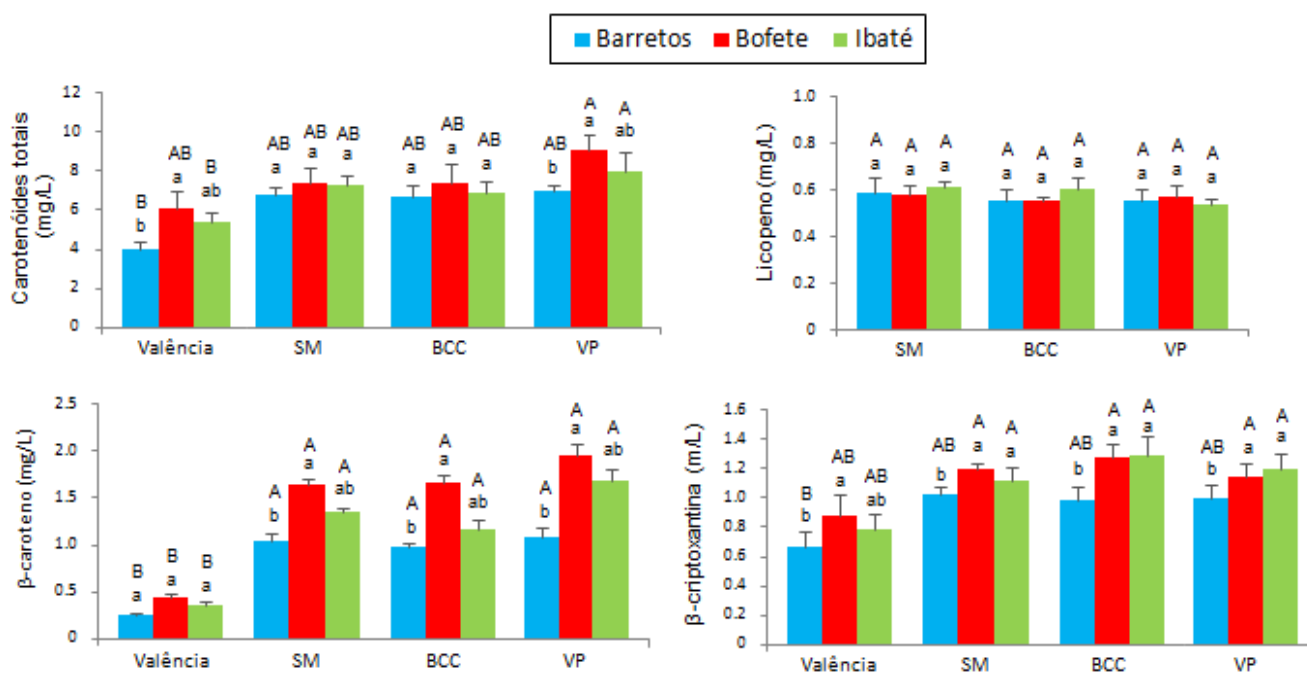


Figura 2. Teores de carotenóides totais, licopeno β -caroteno e β -criptoxantina de quatro variedades de laranjas cultivadas em três cidades do Estado de São Paulo, Brasil.

Colunas e barras representam médias $\pm$ EP, Valência: Barretos e Ibaté (n=12), Bofete (n=10); SM e BCC: Barretos, Bofete e Ibaté (n=6); VP: Barretos e Ibaté (n=6), Bofete (n=4). Letras minúsculas iguais indicam que não diferiram significativamente entre as cidades de cultivo de determinada variedade no teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Letras maiúsculas iguais não diferiram significativamente no teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

β -criptoxantina foi o segundo carotenóide mais predominante em todas as laranjas estudadas. As variedades de polpa vermelha obtiveram teores médios que

não diferiram significativamente ($p>0,05$) entre si, de 1,00 a 1,30 mg/L, no entanto, apresentaram-se 36 a 65% maiores que os teores obtidos nas laranjas claras. Barretos foi novamente o local de cultivo onde as laranjas apresentaram os menores teores significativos ($p\leq 0,05$) do carotenóide em questão (Figura 2). Este teor mais elevado de β -criptoxantina em laranjas de polpa vermelha também foi observado no trabalho de Latado et al. (2008), o qual comparou teores de alguns carotenóides nas variedades SM, VP e a variedade de polpa clara Pêra. Com isso, pode-se concluir que este carotenóide juntamente com o β -caroteno são os principais precursores da vitamina A nestas laranjas.

Violaxantina, pigmento mais amarelado presentes nas laranjas (GROSS, 1972; MOULY et al., 1999) apresentou-se como o principal carotenóide na composição das laranjas Valência. Todas as variedades apresentaram teores médios deste carotenóide que variaram de 0,62 a 1,03 mg/L, e estes não diferiram estatisticamente ($p>0,05$) entre si, mas como ocorreu com os teores de carotenóides totais, β -caroteno e β -criptoxantina, este também foi influenciado por condições ambientais, já que seus teores foram significativamente menores ($p\leq 0,05$) nas laranjas cultivadas em Barretos (Figura 3).

O conteúdo de luteína variou nas laranjas de polpa vermelha de 0,75 a 1,04 mg/L e nas claras de 0,69 a 0,90 mg/L. Os teores médios deste carotenóide nas variedades SM, BCC e VP não apresentaram diferença estatística ($p>0,05$) entre si, e mostraram ser até 37% maiores que os obtidos nas laranjas Valência. Também se verificou que o cultivo das laranjas Valência na cidade de Bofete gerou um teor médio de luteína significativamente maior ($p\leq 0,05$) que os obtidos nas laranjas provenientes de Barretos e Ibaté (Figura 3). Este resultado obtido de um conteúdo um pouco maior de luteína nestas laranjas vermelhas, as deixam ainda mais valiosas, visto que a luteína vem sendo relacionanda na proteção contra doenças dos olhos, como degeneração macular relacionada à idade e catarata, na prevenção de câncer, em particular os de mama e pulmão, e também na diminuição de riscos de

doenças cardíacas e acidente vascular cerebral (RIBAYA-MERCADO e BLUMBERG, 2004).

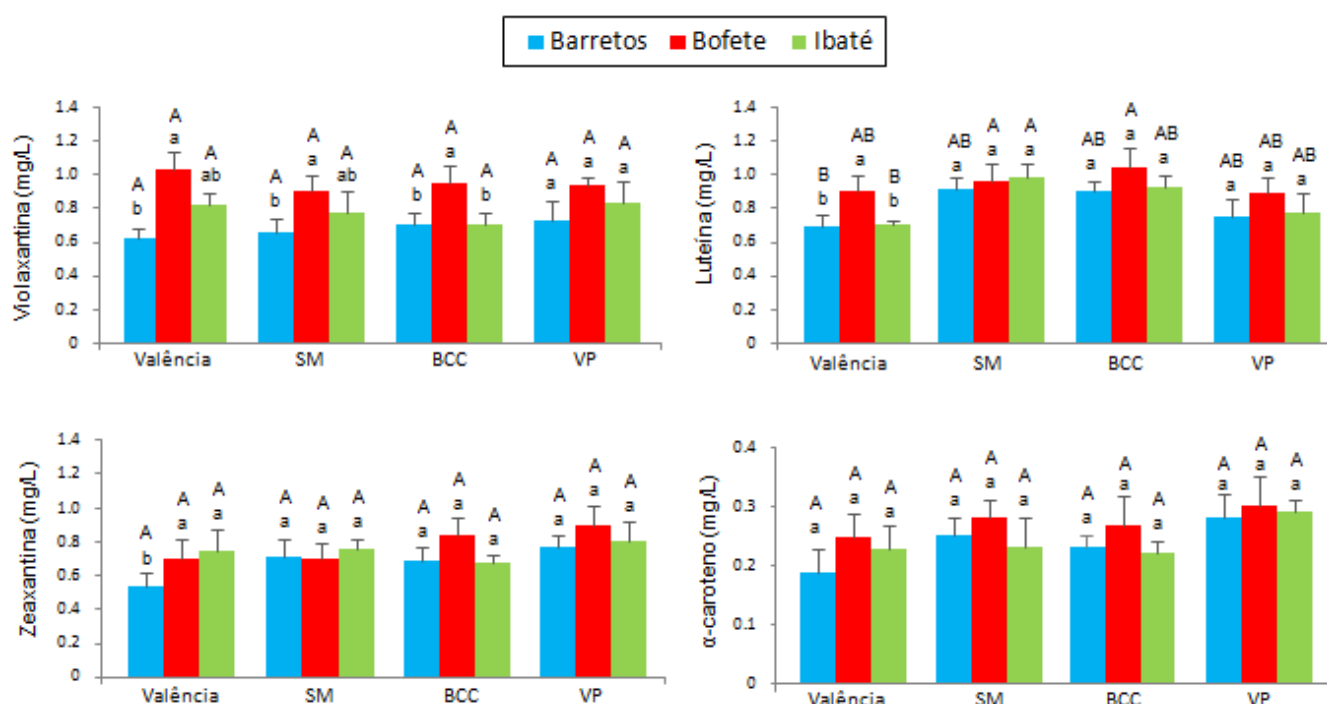


Figura 3. Teores de violaxantina, luteína, zeaxantina e α -caroteno de quatro variedades de laranjas cultivadas em três cidades do Estado de São Paulo, Brasil.

Colunas e barras representam médias $\pm$ EP, Valência: Barretos e Ibaté (n=12), Bofete (n=10); SM e BCC: Barretos, Bofete e Ibaté (n=6); VP: Barretos e Ibaté (n=6), Bofete (n=4). Letras minúsculas iguais indicam que não diferiram significativamente entre as cidades de cultivo de determinada variedade no teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Letras maiúsculas iguais não diferiram significativamente no teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Zeaxantina, carotenóide que proporciona os mesmos benefícios a saúde humana que a luteína (RIBAYA-MERCADO e BLUMBERG, 2004) foi um dos carotenóides neste estudo que não sofreu alteração com as diferenças genéticas das variedades Valência, SM, BCC e VP, visto que entre estas, os teores médios compreendido na faixa de 0,54 a 0,90 mg/L não diferiram ($p > 0,05$) entre si. E este carotenóide na variedade Valência, como outros já citados, também obteve os menores teores significativo ($p \leq 0,05$) nas laranjas cultivadas em Barretos (Figura 3).

O α -caroteno foi o único presente nas laranjas de polpa clara e vermelha que não sofreu influência de fatores genéticos e ambientais, visto que os teores médios

encontrados de 0,19 a 0,30 mg/L não apresentaram diferenças estatísticas ($p>0,05$) entre as variedades e entre as cidades de cultivo (Figura 3).

Carotenóides sob efeito da variabilidade genética e condições ambientais

Os conteúdos de carotenóides totais e ou proporções relativas sofreram grande influência da variabilidade genética e condições ambientais, e este comportamento está de acordo com diversos trabalhos (MOULY et al., 1999; LEE, 2001; LEE e CASTLE, 2001; FANCIULLINO et al., 2006; XU et al., 2006; MELÉNDEZ-MARTÍNEZ, 2007; LATADO et al., 2008; FANCIULLINO et al., 2008; MAIANI et al., 2009; DHUIQUE-MAYER et al., 2009; MOURA, 2010; BERNARDI et al., 2010).

As variações de teores de alguns carotenóides entre as três cidades de cultivo podem ter ocorrido devido aos fatores ambientais como localização geográfica, sazonalidade, ritmo circadiano, temperatura, disponibilidade de água, exposição ao sol, nutrientes do solo, altitude, composição atmosférica, entre outros (GOBBO-NETO e LOPES, 2007), não podendo assim, afirmar qual destes foi responsável pelas alterações, mas sim considerá-los de uma forma conjunta. De uma maneira geral, neste trabalho, os menores teores de carotenóides foram encontrados nas laranjas cultivadas em Barretos, cidade situada em uma menor altitude quando comparada a Bofete e a Ibaté, e caracterizada por apresentar o clima tropical com elevadas temperaturas e significativa amplitude térmica diária. Já os maiores teores foram característicos das laranjas cultivadas em Bofete, situada em altitude intermediária em relação a Barretos e Ibaté, com temperaturas mais amenas, e como a cidade de Barretos, também apresenta significativa amplitude térmica diária.

Há poucos estudos sobre a influência das condições ambientais na biossíntese e no acúmulo de carotenóides em frutas cítricas. Dos poucos trabalhos neste sentido, encontra-se o de Dhuique-Mayer et al. (2009), que relataram que de

seis variedades de frutas cítricas, as laranjas doces foram as que mais sofreram com influência ambiental, pois quando cultivadas em climas tropicais e subtropicais apresentaram menores teores de carotenóides totais do que quando cultivadas em clima mediterrâneo, e neste clima também houve aumento de teores de violaxantina, β -criptoxantina e β -caroteno; dados estes semelhantes aos descritos por Mouly et al. (1999) em estudo com laranjas Valência.

Avaliação dos parâmetros de cor

Os parâmetros de cor *CIELab* dos sucos de laranjas estão apresentados na Tabela 2.

As laranjas de polpa vermelha SM, BCC e VP apresentaram valores de L^* (36,8 a 39,1) menores ($p \leq 0,05$) que os obtidos pelas laranjas Valência (40,6 a 41,9) (Tabela 2), perfil este também observado no trabalho de Lee (2001), em que a laranja BCC apresentou em média um valor de 41,7, enquanto a laranja clara, 46,0. Com isso, pode-se dizer que os sucos das variedades de polpa vermelha são mais escuros que os sucos obtidos de laranjas de polpa clara.

Sobre o parâmetro a^* (saturação da cor vermelha) verificou-se que seus valores apresentaram correlação positiva com os teores de carotenóides totais ($r = 0,6876$, $p < 0,0001$). As laranjas Valência apresentaram valores médios negativos deste parâmetro (-1,6 a -0,2), e significativamente menores ($p \leq 0,05$) quando comparados aos obtidos pelas variedades SM, BCC e VP (2,7 a 9,6) (Tabela 2), característica também já descrita por Lee (2001), concluindo-se assim que as laranjas de polpa vermelha, realmente apresentam uma coloração mais avermelhada, e isso se deve a presença do licopeno, carotenóide vermelho que está ausente nas laranjas Valência, e possivelmente, pelos teores elevados de β -caroteno e β -criptoxantina, pigmentos que variam do amarelo ao alaranjado.

Já em relação ao parâmetro b^* (saturação da cor amarela) que também apresentou correlação positiva com os teores de carotenóides totais ($r = 0,5565$,

$p < 0,0001$), observou-se que os maiores valores significativos ($p \leq 0,05$) foram obtidos pelas laranjas VP cultivadas em Bofete e Ibaté, e o menor, pela laranja Valência cultivada em Barretos. Os valores das demais laranjas não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) entre si, mesmo as laranjas vermelhas apresentando os maiores valores quando comparadas as laranjas Valência (Tabela 2). Não é de conhecimento a contribuição exata de cada carotenóide na cor dos sucos de laranjas, porém, ao analisar a relação existente entre os carotenóides analisados e os valores do parâmetro b^* , pode-se sugerir que nas laranjas de polpa clara o pigmento amarelo violaxantina contribuiu para este parâmetro, e nas laranjas de polpa vermelha, além desta contribuição, pode-se novamente considerar os teores elevados dos carotenóides β -caroteno e β -criptoxantina, sendo isto provável, pois houve uma forte correlação positiva entre os valores dos parâmetros a^* e b^* ($r = 0,8073$, $p < 0,0001$).

O parâmetro *Chroma*, que define a vivacidade (próximo de 60) ou opacidade da cor (próximo de zero) (ARIAS et al., 2000), apresentou forte correlação positiva significativa ($p < 0,0001$) com o parâmetro a^* ($r = 0,8297$) e parâmetro b^* ($r = 0,9856$). Os maiores valores ($p \leq 0,05$) foram encontrados nas laranjas VP de Bofete e Ibaté, as demais de polpa vermelha apresentaram teores mais elevados que as laranjas claras, porém, sem diferença estatística ($p > 0,05$) (Tabela 2), portanto, estes dados indicam que laranjas de polpa vermelha apresentam uma coloração um pouco mais viva, brilhante do que as laranjas de polpa clara. Já o parâmetro Hue apresentou forte correlação negativa significativa ($p < 0,0001$) com o parâmetro a^* ($r = -0,916$) e parâmetro b^* ($r = -0,6777$), e observou-se que laranjas claras apresentaram valores significativamente ($p \leq 0,05$) maiores que os encontrados nas laranjas vermelhas (Tabela 2). Segundo Shewfelt et al. (1988), o parâmetro Hue mostra a localização da cor em um diagrama, onde o ângulo 0° representa vermelho puro; 90° , o amarelo puro; 180° , o verde puro e o 270° , o azul puro, portanto, com nossos dados pode-se dizer que as variedades de laranjas de polpa vermelha que obtiveram um valor

médio de 78,2°, apresentaram uma tonalidade mais alaranjada, já nas laranjas Valência, o valor médio foi de 94,8°, ou seja, muito próximo do que se refere ao amarelo puro.

CONCLUSÃO

As diferentes variedades e condições ambientais das cidades de cultivo das laranjas analisadas, não influenciaram de forma significativa os conteúdos das flavanonas glicosídicas, diferente do observado para os carotenóides.

Os teores de carotenóides não diferiram significativamente entre as variedades de laranjas de polpa vermelha, porém estas apresentaram o licopeno, carotenóide vermelho não presente nas laranjas claras, e também mostraram ter maiores concentrações de carotenóides totais, β -caroteno, β -criptoxantina e luteína do que a variedade Valência. A localização geográfica e/ou as condições climáticas da cidade de Barretos não favoreceram os conteúdos de alguns carotenóides presentes nas laranjas. E, em relação aos parâmetros de cor, observou-se que os sucos das laranjas de polpa vermelha apresentaram coloração mais escura, com maior saturação da cor vermelha e amarela, além de maior vivacidade quando comparados aos sucos das laranjas claras.

Tabela 2. Valores médios dos parâmetros de cor CIELab das laranjas analisadas.

		L^*	a^*	b^*	Chroma	Hue
Valência	Barretos	40,6 ^a _{AB} ± 0,5	-1,6 ^b _D ± 0,2	12,6 ^b _{DE} ± 0,6	12,2 ^b _D ± 0,6	98,2 ^a _A ± 1,5
	Bofete	41,3 ^a _{AB} ± 0,7	-1,0 ^{ab} _D ± 0,4	15,2 ^a _{CDE} ± 1,1	15,1 ^{ab} _{CD} ± 1,2	95,3 ^{ab} _{AB} ± 2,1
	Ibaté	41,9 ^a _A ± 0,6	-0,2 ^a _D ± 0,3	15,2 ^a _{CDE} ± 0,8	15,4 ^a _{CD} ± 0,8	91,1 ^b _{BC} ± 1,2
SM	Barretos	38,9 ^a _{BC} ± 0,7	3,6 ^a _{BC} ± 0,6	15,8 ^b _{CD} ± 0,7	16,3 ^a _{CD} ± 0,9	77,5 ^a _{DE} ± 1,5
	Bofete	38,4 ^a _{BC} ± 0,3	3,7 ^a _{BC} ± 0,2	17,1 ^a _{CD} ± 0,4	17,5 ^a _{CD} ± 0,4	77,6 ^a _{DE} ± 0,7
	Ibaté	38,0 ^a _{BC} ± 0,6	4,7 ^a _{BC} ± 0,4	17,8 ^a _{CD} ± 0,4	18,4 ^a _C ± 0,5	75,4 ^a _{DE} ± 1,1
BCC	Barretos	38,8 ^a _{BC} ± 0,8	2,7 ^a _C ± 0,8	14,6 ^b _D ± 0,8	13,9 ^a _{CD} ± 1,5	82,4 ^a _D ± 2,6
	Bofete	38,8 ^a _{BC} ± 0,9	3,3 ^a _C ± 0,9	17,0 ^a _{CD} ± 1,0	15,7 ^a _{CD} ± 2,0	83,2 ^a _{CD} ± 2,8
	Ibaté	39,1 ^a _{BC} ± 0,7	3,1 ^a _C ± 0,6	16,4 ^a _{CD} ± 0,8	16,8 ^a _{CD} ± 0,8	79,7 ^a _{DE} ± 1,8
VP	Barretos	37,6 ^a _C ± 0,3	3,0 ^c _C ± 0,2	19,9 ^c _{BC} ± 1,2	20,1 ^c _{BC} ± 1,2	81,6 ^a _D ± 0,9
	Bofete	38,1 ^a _{BC} ± 0,6	9,6 ^a _A ± 0,6	28,6 ^a _A ± 1,2	33,7 ^a _A ± 2,0	70,3 ^c _E ± 0,7
	Ibaté	36,8 ^a _C ± 0,5	6,3 ^b _{AB} ± 0,3	23,1 ^b _B ± 0,6	24,9 ^b _B ± 0,7	75,9 ^b _{DE} ± 0,4

Média ± EP. Valência: Barretos e Ibaté (n=18), Bofete (n=15); SM e BCC: Barretos, Bofete e Ibaté (n=9); VP: Barretos e Ibaté (n=9), Bofete (n=6). Valência: Barretos e Ibaté (n=18), Bofete (n=15); SM e BCC: Barretos, Bofete e Ibaté (n=9); VP: Barretos e Ibaté (n=9), Bofete (n=6).

Letras minúsculas iguais na mesma coluna indicam que não diferiram significativamente entre as cidades de cultivo de determinada variedade no teste de Tukey (p≤0,05). Letras maiúsculas iguais na mesma coluna, não diferiram significativamente no teste de Tukey (p≤0,05).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AOAC. Official methods of analysis of the association of official analytical chemists. 18th ed. Washington, CC: AOAC, 2005.

AGARWAL, S.; RAO, A.V. Tomato lycopene and its role in human health and chronic diseases. **Canadian Med. Assoc. J.**, v.19, n.6, p.739-744, 2000.

ARIAS, R.; LEE, T.C.; LOGENDRA, L.; JANES, H. Correlation of lycopene measured by HPLC with the L*, a*, b* color readings of a hydroponic tomato and the relationship of maturity with color and lycopene content. **J. Agric. Food Chem.**, v.48, n.5, p.1697-1702, 2000.

ATURKI, Z.; BRANDI, V.; SINIBALDI, M. Separation of flavanone-7-O-glycoside diastereomers and analysis in citrus juices by multidimensional liquid chromatography coupled with mass spectrometry. **J. Agric. Food Chem.**, v.52, n.17, p.5303-5308, 2004.

BENAVENTE-GÁRCIA, O.; CASTILLO, J. Update on uses and properties of citrus flavonoids: new findings in anticancer, cardiovascular, and anti-inflammatory activity. **J. Agric. Food. Chem.**, v.56, n.15, p.6185-6205, 2008.

BERNARDI, J.; LICCIARDELLO, C.; RUSSO, M. P.; CHIUSANO, M. L.; CARLETTI, G.; RECUPERO, G. R.; MAROCCO, A. Use of a custom array to study differentially expressed gens during blood orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck) ripening. **J. Plant. Physiol.**, v.167, n.4, p.301-310, 2010.

BOCCO, A.; CUVELIER, M.E.; RICHARD, H.; BERSET, C. Antioxidant activity and phenolic composition of citrus peel and seed extracts. **J. Agric. Food Chem.**, v.46, n.6, p.2123-2129, 1998.

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

CANTUTI-CASTELVETRI, I.; SHUKITT-HALE, B.; JOSEPH, J.A. Neurobehavioral aspects of antioxidants in aging. **Int. J. Dev. Neurosci.**, v.18, p.367-381, 2000.

CLINTON, S.K. Lycopene: chemistry, biology, and implications for human health and disease. **Nutr, Rev.**, v.56, n.2, p.35-51, 1998.

CORTÉS, C.; ESTEVE, M.J.; FRÍGOLA, A.; TORREGROSA, F. Identification and quantification of carotenoids including geometrical isomers in fruit and vegetable juices by liquid chromatography with ultraviolet-diode array detection. **J. Agric. Food Chem.**, v.52, n.8, p.2203-2212, 2004.

DHUIQUE-MAYER, C.; FANCIULLINO, A.L.; DUBOIS, C.; OLLITRAULT, P. Effect of genotype and environment on citrus juice carotenoid content. **J. Agric. Food Chem.**, v.57, n.19, p.9160-9168, 2009.

FANCIULLINO, A.L.; CERCOS, M.; DHUIQUE-MAYER, C.; FROELICHER, Y.; TALON, M.; OLLITRAULT, P.; MORILLON, R. Changes in carotenoid content and biosynthetic gene expression in juice sacs of four orange varieties (*Citrus sinensis*) differing in flesh fruit color. **J. A. Food Chem.**, v.56, n.10, p.3628-3638, 2008.

FANCIULLINO, A.L.; DHUIQUE-MAYER, C.; LURO, F.; CASANOVA, J.; MORILLON, R.; OLLITRAULT, P. Carotenoid diversity in cultivated citrus is highly influenced by genetic factors. **J. Agric. Food Chem.**, v.54, n.12, p.4397-4406, 2006.

FRASER, P.D.; BRAMLEY, P.M. The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. **Prog. Lipid Res.**, v.43, n.3, p.228-265, 2004

GAMA, J.J.T.; SYLOS, C.M. Major carotenoid composition of Brazilian Valencia orange juice: identification and quantification by HPLC. **Food Res. Int.**, v.38, p.899-903, 2005.

GATTUSO, G; BARRECA, D.; GARGUILLI, C.; LEUZZI, U.; CORISTI, C. Flavonoid composition of citrus juice, **Molecules**, v.12, n.8, p.1641-1673, 2007.

GIL-IZQUIERDO, A.; GIL, M.I.; FERRERES, F.; TOMAS-BARBERAN, F.A. In vitro availability of flavanoids and other phenolics in orange juice, **J. Agric. Food Chem.**, v.49, n.2, p.1035-1041, 2001.

GIOVANNUCCI, E. Tomatoes, tomato-based products, lycopene and cancer: A review of the epidemiological literature. **J. Nat. Canc. Instit.**, v.91, n.4, p.317-331, 1999.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N.P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Quim. Nova**, v.30, n.2, p.374-381, 2007.

GROSS, J.; GABAI, M.; LIFSHITZ, A. A comparative study of the carotenoid pigments in juice of Shamouti, Valencia and Washington oranges, three varieties of *Citrus Sinensis*. **Phytochemistry**, v.11, p.303-308, 1972.

KATO, M.; IKOMA, Y.; MATSUMOTO, H.; SUGIURA, M.; HYODO, H.; YANO, M. Accumulation of carotenoids and expression of carotenoid biosynthetic genes during maturation in citrus fruit. **Plant. Physiol.**, v.134, n.2, p.1-14, 2004.

KELEBEK, H.; CANBAS, A.; SELLI, S. Determination of phenolic composition and antioxidant capacity of blood orange juices obtained from cvs. Moro and Sanguinello (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) grown in Turkey. **Food Chem.**, v.107, n.4, p.1710-1716, 2008.

KRINSKY, N.I.; JOHNSON, E.J. Carotenoid actions and their relation to health and disease. **Mol . Aspects Med.**, v.26, p.459-516, 2005.

KRIS-ETHERTON, P.M.; HECKER, K.D.; BONANOME, A.; COVAL, S.M.; BINKOSKI, A.E.; HILPERT, K.F.H.; GRIEL, A.E.; ETHERTON, T.D. Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. **Am. J. M.**, v.113, n.9, p.71- 88, 2002.

LATADO, R.R.; VOIGT, V.; NISHIMURA, D.S.; LEAO, H.C.; SYLOS, C.M. Laranjas de polpa vermelha. Caracterização de frutos e do suco dos frutos. Anais do XX Congresso Brasileiro de Fruticultura. 54th Annual Meeting of the Interamerican Society for Tropical Horticulture. Vitória/ES, 12-17 de Out., 2008.

LEE, H.S. Characterization of carotenoids in juice of red Navel orange (Cara Cara). **J. Agric. Food Chem.**, v.49, n.5, p.2563-2568, 2001.

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

MANACH, C.; SCALBERT, A.; MORAND, C.; RÉMÉSY, C.; JIMÉNEZ, L. Polyphenols: food sources and bioavailability. **Am. J. Clin. Nutr.**, v.79, n.5, p.727-747, 2004.

LIU, Q.; XU, J.; LIU, Y.Z.; ZHAO, X.L.; DENG, X.X.; GUO, L.L.; GU, J.Q. A novel bud mutation that confers abnormal patterns of lycopene accumulation in sweet orange fruit (*Citrus sinensis* L. Osbeck). **J. Exp. Bot.**, v.58, n.15-16, p.4161-4171, 2007.

MAIANI, G.; CASTÓN, M.J.P.; CATASTA, G.; TOTI, E.; CAMBRODÓN, I.G.; BYSTED, A.; GRANADO-LORENCIO, F.; BEGOÑA OLMEDILLA-ALONSO, B.; KNUTHSEN, P.; MASSIMO VALOTI, M. BÖHM, V.; MAYER-MIEBACH, E.; BEHSNILIAN, D.; SCHLEMMER, U. Carotenoids: actual knowledge on food sources, intakes, stability and bioavailability and their protective role in humans. **Mol. Nutr. Food. Res.**, v.53, n.2, p.194-218, 2009.

MANTHEY, J.A.; GUTHRIE, N.; GROHMANN, K. Biological properties of citrus flavonoids pertaining to cancer and inflammation. **Curr.Med. Chem.**, v. 8, n.2, p.135-153, 2001.

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

MERKEN, H.M.; BEECHER, G.R. Measurement of food flavonoids by high-performance liquid chromatography: A review. **J. Agric. Food Chem.**, v. 48, n.3, p. 576-599, 2000.

MOULY, P.P.; GAYDOU, E.M.; LAPIERRE, L.; CORSETTI, J. Differentiation of several geographical origins in single-strength Valencia orange juices using quantitative comparison of carotenoid profiles. **J. Agric. Food Chem.**, v.47, n.10, p.4038-4045, 1999.

MOURA, L.M. **Compostos bioativos em frutas cítricas: quantificação, avaliação da atividade antioxidante, parâmetros de cor e efeito da pasteurização.** 2010. 142f. Tese (Doutorado em Alimentos e Nutrição) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara-SP, 2010.

MOURA, L.M.; SYLOS, C.M. The effect of the manufacturing process on the citrus juice on the concentrations of flavanones. **Alim. Nutr.**, v.19, n.4, p.379-384, 2008.

PROTEGGENTE, A.R.; SAIJA, A.; De PASQUALE, A.; RICE-EVANS, C.A. The Compositional Characterisation and Antioxidant Activity of Fresh Juices from Sicilian Sweet Orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck) Varieties. **Free Radic.Res.**, v.37, n.6, p.681-687, 2003.

RAO, A.V.; RAO, L.G. Carotenoids and human health. **Pharmacol Res.**, v.55, n.3, p.207-216, 2007.

RAPISARDA, P.; TOMAINO, A.; CASCIO, R.; BONINA, F.; PASQUALE, A.; SAIJA, A. Antioxidant effectiveness as influenced by phenolic content of fresh orange juices, **J. Agric. Food Chem.**, v.47, n.11, p.4718-4723, 1999.

RIBAYA-MERCADO, J.; BLUMBERG, J. Lutein and zeaxanthin and their potential roles in disease prevention. **J. Am. Coll. Nutr.**, v.23, n.6, p.576-587, 2004.

RODRIGO, M.J.; MARCOS, J.F.; ZACARIAS, L. Biochemical and molecular analysis of carotenoid biosynthesis in flavedo of orange (*Citrus sinensis* L.) during fruit development and maturation. **J. Agric. Food Chem.**, v.52, n.22, p.6724-6731, 2004.

RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. A guide to carotenoid analysis in foods. Washington DC: ILSI Press, 2001.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B.; KIMURA, M.; AMAYA-FARFAN, J. **Fontes brasileiras de Carotenóides: tabela brasileira de composição de carotenóides em alimentos**. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 2008. 98p.

ROUSEFF, R.L. Liquid chromatographic determination of naringin and neohesperidin as a detector of grapefruit juice in orange juice, **J. Assoc. Offic. Anal. Chem.**, v.71, p.798-802, 1988.

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. **J. Sci. Food Agric.**, v.83, n.5, p.430-439, 2003.

SAUNT J: **Citrus varieties of the world**. Sinclair International Ltd., Norwich, England; 2000.

SHAMI, N.J.I.E.; MOREIRA, E.A.M. Licopeno como agente antioxidante. **Rev. Nutr.**, v.17, n.2, p.227-236, 2004.

SLATERRY, M.L.; BENSON, J.; CURTIN, K.; MA, K.; SCHAEFFER, D.; POTTER, J.D., Carotenoids and colon cancer. **Am J Clin Nutr.**, v.71, p.575-582, 2000.

SHEWFELT, R.L.; THAI, C.N.; DAVIS, J.W. Prediction of changes in color of tomatoes during ripening at different constant temperatures. **J. Food Sci.**, v.53, n.5, p.1433-1437, 1988.

TIBBLE, D.L. Further evidence of the cardiovascular benefits of diets enriched in carotenoids. **Am. J. Clin Nutr.**, v.68, p.521-522, 1998.

VINUEZA, J.C.; FARIA, J.B.; CÉSAR, T.B. Hesperidina diminui o colesterol sanguíneo de ratos alimentados com gordura saturada. **Alim.Nutr.**, v.19, n.4, p.473-479, 2008.

XU, C.J.; FRASER, P.D.; WANG, W.J.; BRAMLEY, P.M. Differences in the carotenoid content of ordinary citrus and lycopene-accumulating mutants. **J. Agric. Food Chem.**, v.54, n.15, p.5474-5481, 2006.

CONCLUSÕES GERAIS

As variedades de laranjas de polpa vermelha em comparação a variedade de polpa clara (Valência):

- Mostraram ter sucos menos ácidos e uma cor mais escura, com maior saturação da cor vermelha e de maior vivacidade.
- Não apresentaram diferenças significativas nas concentrações de ácido ascórbico, compostos fenólicos totais, narirutina, hesperidina, violaxantina, zeaxantina e α -caroteno.
- Para os flavonóides totais, apenas as laranjas VP cultivadas em Barretos e Ibaté apresentaram os maiores teores significativos.
- Obtiveram os maiores teores de carotenóides totais, β -caroteno, β -criptoxantina e luteína, e estes não diferiram entre as laranjas de polpa vermelha.
- O licopeno foi identificado apenas nas laranjas vermelhas.
- Os maiores teores de alguns carotenóides foram obtidos pelas laranjas cultivadas em Bofete, cidade que esta localizada em uma altitude intermédiana em relação a Barratos e Ibaté, e caracterizada por apresentar temperaturas amenas.
- Já, os menores conteúdos de ácido ascórbico, carotenóides totais, β -caroteno, β -criptoxantina e violaxantina foram obtidos pelas laranjas de Barretos, cidade que localiza-se em uma menor altitude e apresenta temperaturas elevadas.
- Os valores das capacidades antioxidantes foram maiores quando determinados pelo ABTS, porém os dois métodos, ABTS e DPPH, correlacionaram-se entre si.
- A variedade SM foi a que apresentou as maiores capacidades antioxidantes, e foi o ácido ascórbico que mais contribuiu para estas, seguido pelos carotenóides totais e compostos fenólicos totais.