



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA**

**INSTITUTO DE QUÍMICA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**LIDÉRCIA CAVALCANTI RIBEIRO CERQUEIRA E SILVA**

**“DESENVOLVIMENTO DE ESTRATÉGIAS ANALÍTICAS PARA  
DETERMINAÇÃO DE FLAVANONAS E PSORALENO POR CLAE-  
DAD EM SUCOS DE LARANJAS DE DIFERENTES PROCEDÊNCIAS”**

**Salvador**

**2009**

**LIDÉRCIA CAVALCANTI RIBEIRO CERQUEIRA E SILVA**

**“DESENVOLVIMENTO DE ESTRATÉGIAS ANALÍTICAS PARA  
DETERMINAÇÃO DE FLAVANONAS E PSORALENO POR CLAE-  
DAD EM SUCOS DE LARANJAS DE DIFERENTES PROCEDÊNCIAS”**

**Tese apresentada ao Programa de Pós-  
Graduação em Química, Instituto de  
Química, Universidade Federal da Bahia,  
como requisito para a obtenção do grau de  
Doutor em Química.**

**Orientador: Prof. Dr. Jorge Maurício David**

**Salvador**


**2009**

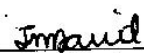
TERMO DE APROVAÇÃO

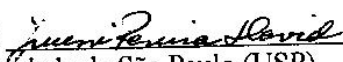
LIDÉRCIA CAVALCANTI RIBEIRO CERQUEIRA E SILVA


DETERMINAÇÃO DE ESTRATÉGIAS ANALÍTICAS PARA DETERMINAÇÃO  
DE FLAVONAS E PSORALENO POR CLAE-DAD EM SUCOS DE LARANJAS  
DE DIFERENTES PROCEDÊNCIAS

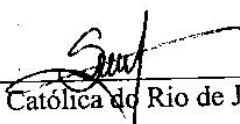
Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Química,  
Universidade Federal da Bahia, pela seguinte banca examinadora:

Prof. Dr. André Luís Bacelar Silva Barreiros   
Doutorado em Química, Universidade Federal da Bahia (UFBA)  
Universidade Federal de Sergipe

Prof. Dr. Jorge Mauricio David - Orientador   
Doutorado em Química Orgânica, Universidade de São Paulo (USP)  
Universidade Federal da Bahia

Profa. Dra. Juceni Pereira de Lima David   
Doutorado em Química Orgânica, Universidade de São Paulo (USP)  
Universidade Federal da Bahia

Profa. Dra. Marta Valéria Almeida Santana de Andrade   
Doutorado em Química, Universidade Federal da Bahia (UFBA)  
Universidade do Estado da Bahia

Prof. Dr. Sérgio Luis Costa Ferreira   
Doutorado em Química, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, (PUC-RJ)  
Universidade Federal da Bahia

Salvador, 16 de julho de 2009.

**BANCA EXAMINADORA**

**Prof. Dra JUCENI PEREIRA DE LIMA DAVID (UFBA)**

**Prof. Dra MARTA VALÉRIA A. SANTANA ANDRADE (UNEB)**

**Prof. Dr SÉRGIO LUIS COSTA FERREIRA (UFBA)**

**Prof. Dr ANDRÉ LUIS B. S. BARREIROS (UFS)**

**Prof. Dr JORGE MAURÍCO DAVID**

(Universidade Federal de Bahia)

Orientador e Presidente da Banca

**Salvador – Ba**

**2009**

*Jamais considere seus estudos como uma obrigação, mas como uma oportunidade invejável para aprender a conhecer a influência libertadora da beleza do reino do espírito, para seu próprio prazer pessoal e para proveito da comunidade à qual seu futuro trabalho pertencer.*

**Albert Einstein**

## Dedicatória

A meus filhos João José e Maria Catarina  
que são as razões da minha vida  
e deram mais brilho à minha vida

A meu pai Apúlio que  
jamais deixou de confiar em mim e  
mesmo tendo partido sei que olha por mim  
deixando seu exemplo de amor

A minha mãe Olga  
pelo exemplo de luta pela vida

## **Agradecimentos**

**A Deus pela vida e pela existência do saber**

**Ao meu marido, José Dantas por me compreender e apoiar em tempo integral  
no caminho que decidir seguir.**

**A meus irmãos Lucyvera, Márcio, Efigênia e Ivanete pela compreensão e ajuda  
durante o nosso convívio.**

**Ao Prof. Dr. Jorge Maurício David**

**que não foi apenas orientador mas amigo.**

**Passando sempre seus conhecimentos de forma**

**gentil e precisa. Pela ética, pelo bom humor, apoio**

**e amizade sincera. Muito obrigada pelo convívio durante**

**todos esses anos.**

**A Profa. Dra Juceni Pereira de Lima David**

**que tem sempre o olhar voltado à pesquisa**

**pela oportunidade, amizade, confiança**

**e por me incentivar a alcançar**

**esta etapa da minha vida.**



Ao Programa de Pós-Graduação em Química, pela oportunidade de realizar o curso de Doutorado.

A banca examinadora pelas valiosas contribuições que foram dadas a este trabalho.

Ao Prof. Dr. Sérgio Luis Ferreira Costa pela colaboração neste trabalho.

A Prof. Maria de Lourdes e Silva Santos, pela amizade e apoio durante a construção deste trabalho, pelo olhar de amiga e ao mesmo tempo de mãe que sempre dedicou a mim.

Ao colega e amigo Pedro Sanches Reis, pelo prazer de ajudar e a curiosidade em buscar o conhecimento. A Hugo Brandão, Mileno Motta, Luciano Suzart e Clayton por serem amigos e me ajudarem sempre.

A Rafael Borges pela contribuição nesse trabalho e também pela amizade.

As colegas e amigas, Alessandra Guedes, Rosemary Carvalho e Edna Maura Prata pelos momentos de descontração.

Aos colegas do laboratório de Produtos Naturais da Faculdade de Farmácia e do laboratório de Produtos Naturais do Instituto de Química que embora o tempo de convivência tenha sido curto foi suficiente para alicerçar uma amizade.

Aos funcionários do Programa de Pós Graduação do Instituto de Química, Cristóvão e Paulo pela atenção e prestatividade durante todos esses anos.

Ao Instituto de Química da Universidade Federal da Bahia, representado por seus professores, pelo aprendizado adquirido.

A Faculdade de Farmácia e ao Departamento do Medicamento, pela oportunidade concedida para cursar o Doutorado.

A Fundação de Apoio a Pesquisa do Estado da Bahia – FAPESB, pelo incentivo financeiro que contribuiu para o êxito deste trabalho.

## RESUMO

Este trabalho foi desenvolvido no âmbito do PRONEX – NQA e descreve o estudo através da técnica da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a detector de arranjo de diodos - CLAE-DAD nas análises de amostras de sucos de laranja obtidos por processos extrativos diversificados (espremidos a mão, extração em condições industriais com posterior comercialização em longo prazo e obtido através de máquinas tipo *fresh-in-squeeze*) para a identificação de flavonóides e psoraleno. Os diversos sucos foram submetidos às etapas de extração líquido-líquido e posterior análises por CLAE-DAD. Estes procedimentos permitiram identificar e quantificar algumas flavanonas e psoraleno presentes nos sucos cítricos. Dentre as flavanonas se determinou hesperidina, naringina, naringenina e poncirina. As faixas de concentrações destes compostos variaram de 17,8 - 245 mg 100 g<sup>-1</sup> para hesperidina, 0,01 – 0,08 mg 100 g<sup>-1</sup> para naringina, 0,05 – 0,170 mg 100 g<sup>-1</sup> para naringenina e de 0,06 – 0,36 mg 100 g<sup>-1</sup> para poncirina. Quanto ao psoraleno, em algumas amostras dos sucos, as concentrações estavam abaixo do limite de quantificação (< 0,02) e variou de < 0,02 – 0,05 mg 100 g<sup>-1</sup>. Estes resultados sugerem que o modo de obtenção dos sucos e os critérios de extração dos constituintes podem influenciar tanto nos teores dos flavonóides no suco como nas detecções de suas concentrações através da técnica aplicada. Para exames das informações geradas foram empregadas metodologias estatísticas multivariadas por meio de Análises de Componentes Principais (PCA) e Análise de Agrupamentos Hierárquicos (HCA) executando o estudo exploratório dos dados para avaliar tendências e discriminar amostras dos sucos de laranja quanto a sua origem, tipos de tratamentos de extração e características químicas para os teores de flavonóides e psoraleno.

Palavras chave: flavonóides, flavanonas, psoralenos, suco de laranja

## ABSTRACT

This work was developed under the scope of PRONEX - NQA and describes the study by the technique of High Efficiency Liquid Chromatography coupled to a diode array detector - HPLC-DAD for analysis of samples of orange juices obtained by extractive processes diversified (squeezed manually, extraction in industrial conditions with subsequent marketing and obtained by fresh-squeeze machine ) for presence of flavonoids and psoralen. Juices were subjected to various stages of liquid-liquid extraction and subsequent analysis by HPLC-DAD. These procedures allowed to identify and quantify some flavanones and psoralens found in citrus juices. The flavanones determined were hesperidin, naringin, naringenin and poncirina. The ranges of concentrations of these compounds ranged from 17.8 to 245 mg 100 g<sup>-1</sup> for hesperidin, 0.01 to 0.08 mg 100 g<sup>-1</sup> for naringin, 0.05 to 0.170 mg 100 g<sup>-1</sup> for naringenin and 0.06 to 0.36 mg 100 g<sup>-1</sup> for poncirina. Psoralen concentrations in some samples of the juices were below the limit of quantification (<0.02) and ranged from <0.02 to 0.05 mg 100 g<sup>-1</sup>. These results suggest that mode of production of juices and criteria for the extraction of constituents can influence the levels of flavonoids in the juice as its concentration on detections using the technique applied. Two multivariate statistical methods were employed to examination of the information generated, Principal Component Analysis (PCA) and Hierarchical Cluster Analysis (HCA), running the exploratory study data to assess trends and to discriminate samples of orange juice as its origin, types treatments of extraction and chemical characteristics for the flavonoids and psoralen.

Keywords: flavonoids, flavanones, psoralens, orange juice.

## LISTA DE FIGURAS

		n <sup>o</sup>
Figura 1	Algumas espécies cítricas	06
Figura 2	Flavonóides de uso terapêutico	12
Figura 3	((Representação estrutural de: a) naringina b) neohesperidosídeo c) hesperidina d) eriocitrina e) poncirina f) naringenina	13
Figura 4	Núcleo básico dos flavonóides compostos por dois anéis aromáticos (A e B) e um anel intermediário (C).	14
Figura 5	Algumas classes de flavonóides mais comuns.	15
Figura: 6	Flavanonas polimetoxiladas. (PMFs)	16
Figura 7	Possível rota dos compostos fenólicos da dieta (Scalbert & Williamson, 2000).	21
Figura 8	Representação estrutural das possíveis ocorrências da hesperidina	22
Figura 9	Representação de flavonóide com atividade antioxidante.	24
Figura 10	Estrutura química de alguns compostos cumarínicos	25
Figura 11	PPD em dorso da mão (a) provocado por <i>C. hystrix</i> (b).	32
Figura 12	Flavanonas glicosíadas (FGs). A. Rutinosídeo	36
Figura 13	A matriz original (X) de tamanho $n \times p$ é decomposta em duas matrizes reduzidas de tamanho $n \times d$ e $d \times p$ , sendo mais fácil de interpretar, compreender e conter toda informação relevante. As duas matrizes reduzidas da matriz original são chamadas de variáveis latentes.	43
Figura 14	Esqueleto básico das flavanonas	45
Figura 15	Estrutura da furanocumarina (Psoraleno)	45
Figura 16	Esquema do método de extração e análise CLAE/DAD em sucos de laranja.	51
Figura 17	Sistema extrator líquido – líquido para solventes menos densos que a amostra (flavanonas)	55
Figura 18	Sistema extrator líquido – líquido para solventes mais densos que a amostra (psoraleno)	56

Figura 19a	Perfil cromatográfico do padrão de hesperidina e espectro UV/DAD.	68
Figura 19b	Perfil cromatográfico dos padrões de naringina (a), poncirina (b) e naringenina (c) e seus respectivos espectros UV/DAD	70
Figura 20	Perfil cromatográfico de amostras de sucos para as flavanonas e seu espectro UV/DAD	71
Figura 21a	Sucos espremido a mão; naringina; hesperidina; poncirina; naringenina	74
Figura 21b	Suco espremido a mão e centrifugado: naringina, hesperidina, poncirina e naringenina.	74
Figura 21c	Suco industrial e centrifugado: naringina, hesperidina, poncirina e naringenina.	75
Figura 21d	Suco obtido em máquina: naringina, hesperidina, poncirina e naringenina.	75
Figura 21e	Suco industrial – Orgânico: naringina; hesperidina; poncirina; naringenina.	76
Figura 22	Perfil cromatográfico do padrão de psoraleno e espectro UV/DAD.	80
Figura 23	Perfil cromatográfico para o psoraleno nas amostras de sucos e espectro UV/DAD	81
Figura 24a	suco industrial: psoraleno	82
Figura 24b	Suco espremido a mão: psoraleno	82
Figura 25.1	Cromatograma do branco do solvente para as análises de CLAE.	84
Figura 25. 2a	Cromatograma do padrão de hesperidina, tempo de retenção (TR)	85
Figura 25.2b	Cromatograma dos padrões de flavanonas: naringina (TR =9'), poncirina (TR=17'), naringenina (22').	85
Figura 25.2c	Cromatograma do padrão de psoraleno, tempo de retenção (TR = 5')	86
Figura 27.1	Projeção do gráfico dos pesos de PC1 x PC2 que juntas descrevem 63,64% da variabilidade total da informação dos dados.	89

Figura 27.2	Projeção do gráfico dos escores de PC1 x PC2 que juntas descrevem 63,64% da variabilidade total da informação dos dados.	89
Figura 27.3	Projeção do gráfico dos pesos de PC1 x PC3 que juntas descrevem 59,81% da variabilidade total da informação dos dados.	90
Figura 28	Gráfico da variância residual do conjunto de amostras de sucos de laranja.	91
Figura 29	Gráfico da variância residual do conjunto de amostras com a exclusão de S20.	91
Figura 30	Gráfico da variância residual do conjunto de amostras com a exclusão de S20 e S37.	92
Figura 31	Projeção do gráfico dos pesos de PC1 x PC2 que juntas descrevem 67,44% da variabilidade total da informação dos dados.	93
Figura 32	Projeção do gráfico dos escores de PC1 x PC2 que juntas descrevem 67,44% da variabilidade total da informação dos dados.	94
Figura 33a	Dendograma empregando método Ward.	96
Figura 33b	Dendograma empregando método Complete Linkage	96
Figura 33c	Dendograma empregando método Uniweighted pair-group average	97
Figura 33d	Dendograma empregando método Weighted pair-group average	97
Figura 33e	Dendograma empregando método Single Linkage	98
APÊNDICE A		123
Tabela 4	Análises de flavonóides em diferentes matrizes por CLAE	123
APÊNDICE B		125
Figura 26a - 26e	Curvas analíticas para os analitos determinados nas amostras de sucos de laranja.	125

## LISTA DE TABELAS

		n
Tabela 01	Flavanonas polimetoxiladas comumente encontradas em frutos cítricos.	16
Tabela 02	Consumo de psoralenos através da alimentação nos Estados Unidos.	31
Tabela 03	Flavanonas glicosíladadas comumente encontradas em frutos cítricos	36
Tabela 05	Flavanonas objeto do estudo	45
Tabela 06	Programa de gradiente de eluição para os solventes.	58
Tabela 07	Programa de gradiente de eluição para os solventes.	59
Tabela 08	Valores encontrados para as flavanonas nas amostras de sucos de laranja. (mg.100 g <sup>-1</sup> ).	61
Tabela 09	Relação entre presença de alguns flavonóides e as espécies dos Citrus.	73
Tabela 10	Valores encontrados para psoraleno nas amostras de sucos de laranja. (mg. 100 g <sup>-1</sup> ).	77
Tabela 11	Valores obtidos para os ensaios de recuperação.	84
Tabela 12	Equação das curvas analíticas para os analitos determinados nas amostras de sucos de laranja.	86
Tabela 13	Limites de Detecção e Quantificação dos analitos.	88
Tabela 14	Pesos das variáveis das três componentes principais.	88
Tabela 15	Pesos das variáveis das três componentes principais após a exclusão das amostras S20 e S37.	92
APÊNDICE A		123
Tabela 04	Análises de flavonóides em diferentes matrizes por CLAE	123

## ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

5-MOP - 5-metoxipsoraleno, bergapteno

8-MOP – Xantotoxina

ADRAC – Adverse Drug Reactions Advisory Committee

ATT - Acidez total titulável

CL - Cromatografia Líquida

CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

CYP3A4 – Isoforma de citocromo

DAD – Detector de arranjo de diodos

DPR – Desvio padrão relativo

EEC - Official Journal of the European Communities

EM - Espectrometria de massas

FCOJ - Suco de laranja concentrado e congelado

FDA – Food and Drug Administration

FGs - Flavanonas glicosiladas

FMC - Citrus Juice Extractors

frutose e glucose, respectivamente, além de uma relação SST/ATT em g/100g de ácido cítrico anidro, mínimo de 7.0.

HDL – High density lipoprotein

HTST - High Temperature Short Time

LDL – Low density lipoprotein

MeOH – Metanol

mm – Milímetros

NFC - Suco de laranja pasteurizado

nm – Nanômetro

°Brix - a quantidade de sólidos solúveis presentes no suco, como, sacarose,

P450 – Citocromo “P” 450

PMFs - Flavonas polimetoxiladas



PPD - Fitofotodermatite

RECON - Suco de laranja reconstituído

SCCP - Comissão Europeia de Produtos Cosméticos

SKLM – Senate Commission on Food Safety

SST - Sólidos solúveis totais

TBHQ – Tetrabutylhidroquinona

UHT - Ultra High Temperature

UK – Reino Unido

USA – Estado Unido da América

USDA - United States Department of Agriculture

UV – Ultravioleta

UV-A – Ultravioleta A

UV-B – Ultravioleta B

## SUMÁRIO

<b>CAPITULO 1</b>	n
1.1 INTRODUÇÃO	1
1.2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
1.2.1 CÍTRICOS	4
1.2.2 SUCOS DE LARANJA	7
1.2.2.1 Suco de laranja fresco	9
1.2.2.2 Suco de laranja pasteurizado (Not from Concentrated Orange Juice – NFC)	10
1.2.2.3 Suco de laranja concentrado e congelado (Frozen Concentrated Orange Juice – FCOJ)	10
1.2.2.4 Suco de laranja reconstituído (– Reconstitued Orange Juice from Concentrate - RECON – RTS)	10
1.2.3 FLAVONÓIDES	11
1.2.3.1 Flavonóides do gênero Citrus	15
1.2.3.2 Relação Estrutura- Atividade antioxidante dos Flavonóides em Frutas Cítricas	20
1.2.3.3 Outras atividades biológicas relacionadas aos flavonóides	24
1.2.4 Psoralenos do gênero Citrus	25
1.2.4.1 Toxicidade em humanos	29
1.2.5 DETERMINAÇÃO DE FLAVONÓIDES E PSORALENOS	35
1.2.5.1 Flavonóides	35
1.2.5.2 Psoralenos	37
1.2.6 ANÁLISE MULTIVARIADA	38
1.2.6.1 Processamento da matriz de dados	40
1.2.6.2 Análise de componentes principais	41
1.2.6.2.1 Descrição matemática das componentes principais	42
1.2.6.3 Análise de agrupamento	43
1.3. OBJETIVOS	45
1.3.1 Objetivo geral	45
1.3.2 Objetivos específicos	46
1.4 JUSTIFICATIVA	46

<b>CAPITULO 2</b>	49
2. PARTE EXPERIMENTAL	49
2.1 MATERIAIS E EQUIPAMENTOS	49
2.1.1 Materiais utilizados	49
2.1.2 Solventes utilizados	49
2.1.3 Equipamentos utilizados	50
2.1.4 Coleta das amostras.	50
2.2.1 Preparo das amostras	52
2.2.1.1 Etapa de pré - tratamento de algumas amostras	52
2.2.2. Processo de extração	52
2.2.2.1 Otimização das extrações	53
2.2.2.2 Extração das Flavanonas	54
2.2.2.3 Extração de Psoraleno	55
2.3. ANÁLISES QUANTITATIVAS	57
2.3.1 PARÂMETROS OPERACIONAIS DO EQUIPAMENTO	57
2.3.2 CONSTRUÇÃO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO DAS FLAVANONAS E PSORALENOS	57
2.3.3 ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS	57
2.3.3.1 Flavanonas	57
2.3.3.2 Psoraleno	58
2.4 VALIDAÇÃO DO PROCEDIMENTO ANALÍTICO.	59
2.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	59
<b>CAPÍTULO 3</b>	60
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	60
3.1 AVALIAÇÃO DAS EXTRAÇÕES	60
3.1.1 Extrações de flavanonas	60
3.1.1.1 Determinação das flavanonas nas amostras de sucos de laranja	61
3.1.1.2 Fase móvel nas análises das flavanonas	66
3.1.1.3 Perfil cromatográfico das flavanonas	67
3.1.2 Extrações de psoraleno	76

3.1.2.1 Determinação de psoraleno nas amostras de sucos de laranja.	77
<b>3.1.2.2</b> Fase móvel nas análises de Psoraleno	79
<b>3.1.2.3</b> Perfil cromatográfico do psoraleno	79
3.2 VALIDAÇÃO DO PROCEDIMENTO ANALÍTICO	83
3.2.1 Exatidão	83
3.2.2 Especificidade/Seletividade	84
3.2. 3 Linearidade	86
3.2.4 Precisão (Repetitividade)	87
3.2.5 Limite de Detecção (LOD) e Limite de Quantificação (LOQ)	87
3.3 ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS (PCA).	88
3.4 ANÁLISE DE AGRUPAMENTOS HIERÁRQUICOS (HCA).	94
<b>CAPÍTULO 4</b>	99
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS	99
REFERÊNCIAS	101
APÊNDICE A	123
Tabela 4 - Análises de flavonóides em diferentes matrizes por CLAE	123
APÊNDICE B	125
Figura - 26a- 26e Curvas analíticas para os analitos determinados nas amostras de sucos de laranja	125

## CAPITULO 1

### 1.1 INTRODUÇÃO

Há intenso interesse pelos compostos fenólicos, dentre estes os flavonóides e os psoralenos devido às suas numerosas propriedades. O conhecimento dos teores e das várias formas destes nas plantas, alimentos e em especial na dieta humana é de considerável interesse.

Os benefícios dos flavonóides para a saúde humana têm sido bastante divulgados e pesquisados, no entanto poucos são os estudos que acompanham os fatores que podem interferir na estabilidade destes compostos em decorrência dos métodos de obtenção e/ou formas de acondicionamento. Os flavonóides são amplamente distribuídos nas frutas, vegetais (verduras) sucos de frutas, chás e vinhos. Dentre as frutas, destacam-se as cítricas que são consumidas em todo o mundo e são ricas em flavonóides que podem ter efeitos benéficos a saúde humana.

Dieta rica em vegetais e frutas tem sido reconhecida como fator de proteção da saúde. Por muito tempo, pesquisas nutricionais focaram principalmente em estudos sobre as gorduras, carboidratos, proteínas, vitaminas e minerais. (Del Caro, 2004). A existência de metabólitos secundários nas plantas, freqüentemente presentes em elevadas quantidades é muitas vezes ignorada. Embora muitos destes compostos não sejam essenciais para a manutenção da vida, são reconhecidos como sendo potencialmente benéficos para a saúde humana.

Flavonóides compreendem um dos maiores e mais amplamente distribuído grupo de metabólitos secundários nas plantas (Rice-Evans et al., 1997). São encontrados em quase todas as plantas fotossintetizadoras, conseqüentemente todos os humanos os consomem através dos alimentos. Estes são divididos em vários subgrupos em razão da formação de diferentes compostos e propriedades biológicas. Possuem também distintas fontes de ingestão, logo existe diferença na biodisponibilidade destes compostos no organismo o que acarreta em ações biológicas *in vivo* muitas vezes diferenciadas (Erlund, 2002).

Neste trabalho, os flavonóides hesperidina, naringina, naringenina e poncirina foram selecionados porque estão presentes em concentrações significantes nas frutas cítricas, sendo a sua ingestão razoavelmente elevada, já que regularmente os

produtos cítricos fazem parte da dieta, ou pelo uso da fruta *in natura* ou através dos vários modos de preparo dos sucos (Tadini; Tribess, 2004).

Os sucos de laranja são os mais consumidos em todo o mundo, sendo estes a principal fonte de flavonóides da dieta. Nestes sucos, as flavanonas glicosiladas (hesperidina, naringina, poncirina e naringenina) são predominantes destas frutas. A hesperidina contribui com os maiores valores, principalmente na espécie de laranja doce (*Citrus sinensis*) (Justesen, 1997).

A ingestão diária de flavanonas apresenta, de acordo com estudos epidemiológicos, atividades biológicas associadas a estes compostos tais como, antioxidante, antiinflamatórias, antialérgicas, inibidoras de enzimas (oxidoredutases, kinases, isomerasas, transferases, ligases ases) influência sobre o sistema sensorial (olfato, neuroestimulatório), efeito analgésico, anestésico local, atividade antiviral (Alonso, 2005; Moreno-Alvarez, 2004; Havsteen, 2002; Hertog, 1992).

As espécies do gênero cítrus comumente contêm apenas uma classe de flavonóides e esta característica é utilizada na diferenciação dos sucos cítricos (Mouly, 1998). Entretanto, as plantas em geral possuem uma grande quantidade de compostos químicos com potencialidades diversas, dentre estes se encontra os psoralenos (Ojala, 2001) um outro grupo de metabólitos secundários presentes também nas frutas cítricas (Clifford, 2000). Esses compostos estão dotados de propriedades antimicrobianas e são produzidas pelas plantas quando estas são infectadas por microorganismos fitopatogênicos (vírus, bactérias e fungos) ou, quando estão sob ação de fatores causadores de estresse, como exemplo: frio, clima árido, ação da luz ultravioleta, métodos de processamentos dos alimentos, entre outros (Souza, 2005).

Alguns destes psoralenos fazem parte da dieta do ser humano como de animais. São encontrados em vegetais da família Umbelliferaeae como a cenoura, o aipo, a salsa e a chicória; bem como nas frutas, principalmente as cítricas. Nestas, estão presentes em várias espécies, em diferentes níveis de concentrações e em partes como nas cascas, polpa (albedo) e sementes.

A ação mais complexa dos psoralenos é atribuída por sua influencia sobre a inibição da isoforma do citocromo P450. Existe relato na literatura que o psoraleno diminui a capacidade de metabolização de alguns fármacos, por conseguinte altera a biodisponibilidade destas drogas (Widmer, 2005). Estes compostos são utilizados para o tratamento de algumas desordens dermatológicas (psoríase, vitiligo e

micoses). Porém, a presença destes compostos, em concentrações elevadas através das fontes de alimentos, é responsável por danos à saúde, tais como: fitofotodermatites, carcinogenicidade e mutagenicidade (Lourenço, 2001)

Neste trabalho buscou-se analisar diversos sucos de laranja procedentes de várias regiões e obtidos por processos variados, tais como: espremidos a mão (SOE), industrializados e obtidos em máquinas tipo “*fresh-in-squeeze*” para os constituintes flavonoídicos e psoraleno aplicando-se a técnica da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD) para a identificação e caracterização tanto das flavanonas como para o psoraleno presentes nos sucos cítricos.

## 1.2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 1.2.1 CÍTRICOS

As espécies cítricas são intensamente cultivadas e apreciadas e seus frutos os mais consumidos em todo o mundo. A cadeia cítrica contempla as frutas *in natura*, a produção de sucos (concentrados, reconstituídos, pasteurizados e frescos), de óleos essenciais e pellets<sup>1</sup>, de polpa seca – os dois últimos voltados ao uso industrial. Os principais mercados para o produto são os Estados Unidos, Japão, Alemanha, Reino Unido, França e Rússia. Da produção brasileira, 70% destinam-se ao processamento de sucos industrial, 29,4% a obtenção de sucos espremidos a mão e/ou por máquinas tipo *fresh-in-squeeze* e apenas 0,6% *in natura*, (Neves, 2006).

Os cítricos contêm uma ampla variedade de nutrientes importantes além da vitamina C, como exemplo a vitamina A, carotenos de várias classes ( $\beta$ -caroteno, luteína, zeaxantina, criptoxantina) folatos, fibras, vitaminas do complexo B, elementos, principalmente cálcio, potássio, sódio e fósforo. Além destes, contêm grupos de metabólitos considerados, não nutricionais ou bioativos, tais como os glucaratos, cumarinas, monoterpênos, triterpênos e outros compostos (Argudo, 2004).

Como componente bioativo entende-se aquelas substâncias presentes nos alimentos responsáveis por alguma atividade biológica, sendo encontrados em frutas e verduras comestíveis, as quais podem proporcionar um benefício para a saúde e/ou prevenir o aparecimento de enfermidades crônicas. Já os componentes nutricionais ou nutrientes são aqueles necessários para o desenvolvimento normal do metabolismo e sua ausência ou níveis escassos produzem uma enfermidade deficitária específica para o devido nutriente (Gomes e Azevedo, 2005).

Dentre os bioativos fenólicos alguns possuem propriedades antioxidantes (Manthey e Grohmann, 2001). Os flavonóides são exemplos desta classe de substâncias, porém são considerados pertencentes ao metabolismo secundários e são encontrados principalmente no albedo, e nas partes sólidas dos cítricos (Braddock e Goodrich, 2006). Os principais flavonóides presentes nos cítricos são a

---

<sup>1</sup> Aglomeração de pós-finos de substâncias em pequenas unidades esféricas (Santos, 2004).



hesperidina, naringina, dihidrochalconas e flavonas polimetoxiladas. Na casca das espécies cítricas estão presentes, furanocumarinas, limonóides além de outros componentes da casca (estabilizantes e a própria cascas para consumo direto) pectina, geléias, purês, gomos (vendidos em latas ou sacos plásticos, prontos para comer). Nas sementes podem ser obtidos biocidas, óleo comestível além de concentrado protéico. Outros produtos também podem ser gerados a partir dos resíduos cítricos como álcool, vinho e vinagre (Ferreira, 2005).

Os citros compreendem um grupo de plantas da família Rutaceae dos gêneros *Fortunella*, *Citrus* e *Poncirus* (Lorenz, H.; Sartori.; Bacher, L. B.; Lacerda, M., 2006) ou híbridos representados principalmente por laranjas (*Citrus sinensis* e *C. aurantium*), tangerina (*C. reticulata* e *C. deliciosa*), limões (*C. limon var. criolo*), limas ácidas como o Thaiti (*Citrus latifolia*) e o Galego (*C. aurantifolia*), e doces como lima da Pérsia (*C. limettioides*), pomelo (*C. paradisi*), cidra (*C. medica*), laranja-azedada (*C. aurantium*) e toranjas (*C. grandis*) (Figura 01). São originárias principalmente das regiões subtropicais e tropicais do sul da Ásia (Índia e China), porém também se origina na Austrália e África. Foram levadas para a Europa na época das Cruzadas e chegaram ao Brasil trazido pelos portugueses, no século XVI (Quintero et al., 2003; Matos Junior et al., 2005).

As laranjas doces recebem o nome latino de *Citrus sinensis*, e as azedadas de *Citrus aurantium*. Existem muitas variedades de laranjas doces, sendo as mais conhecidas às variedades: Pêra, maturação semitardia; Natal, tardia; Valência, tardia; baía e baianinha semiprecoce; lima, piralima e hamlin, semitardia. As laranjas de umbigo como a baía e baianinha não são processadas para produção de suco. As laranjas azedadas são usadas na obtenção de óleos essenciais para as indústrias farmacêuticas e alimentícias a partir de suas folhas e cascas (Yamanaka, 2005).

Quatro grupos comercialmente importantes de laranja são usados na produção de sucos de laranja: *Citrus sinensis* ou laranja doce, *Citrus reticulata* ou mandarinas e tangerinas, *Citrus aurantium* ou laranja amargo-azedada, e os híbridos deliberados ou acidentais de laranja doce e tangerina como Murcott, Temple, e Topaz. Muitas variedades de *C. sinensis* tais como Hamlim, Navel, Parsons, Brown, Pêra, Shamouti, Valência são cultivadas em todo o mundo (Ooghe; Detavernier, 1997).



Figura 01 - Algumas espécies cítricas

As árvores cítricas atingem em média quatro metros de altura, a copa é densa e de formato normalmente arredondado. As folhas são aromáticas, assim como as flores, pequenas e brancas (Matos Junior et al., 2005). O clima exerce grande influência sobre o vigor e longevidade das plantas quanto à qualidade e quantidade de frutos. Os frutos produzidos em climas frios têm melhor coloração da casca e teores mais altos de açúcares e ácidos que acentuam o sabor. Em climas quentes os frutos são menos coloridos interna e externamente com mais baixos teores de açúcares e principalmente acidez. Os citros desenvolvem-se melhor em regiões de clima mais ameno, desde que os solos sejam adequados e o regime de chuvas atinja cerca de 1.200 mm anuais, bem distribuídos durante o ano. A altitude mais adequada aos pomares varia de 20 a 500 m e o regime pluviométrico de 1.000 a 1.800 mm. Dentre os elementos climáticos a temperatura exerce influência sobre os citros, pois, além de ter efeito acentuado sobre a qualidade do fruto, foi o fator que determinou a distribuição geográfica das plantas na grande faixa de 40° ao norte e ao sul do equador (EMBRAPA, 2006). As plantas cítricas são exigentes em relação à textura dos solos, preferindo os areno-argiloso.

Os maiores produtores de laranja são o Brasil e os Estados Unidos, que juntos representam cerca de 45% do total mundial. Destacam-se ainda: África do Sul, Espanha e Israel, com a produção de laranjas e tangerinas para o mercado *in natura*, e o México, com a lima ácida Tahiti, além do novo parque citrícola emergentes na Ásia, como a China (Lima, 2006).

### 1.2.2 SUCOS DE LARANJA

A Europa Ocidental representa cerca de 30% do consumo mundial de sucos cítricos, com média de 24 litros por habitante/ano, observando-se o maior índice na Alemanha: (41 litros/ano) seguido pela Europa Oriental, Ásia e América do Sul. Na Finlândia a ingestão média de naringenina e hesperidina encontra-se em torno de 8,3 mg/dia e 28,3mg/dia, respectivamente (Erlund, 2002). Entende-se como suco de frutas, um sistema complexo que consiste de uma “mistura” aquosa de vários componentes orgânicos voláteis e instáveis, responsáveis pelo sabor e aroma do produto, além de açúcares, minerais, vitaminas e pigmentos (FURG, 2006). Foi na década de 30 que a indústria de sucos, em particular a de suco de laranja, começou

a desenvolver-se, quando o consumo anual passou nos EUA, de menos de 0,5 litros para cerca de 5 litros “*per capita*”.

O desenvolvimento da indústria de suco se deu paralelamente ao aumento do consumo, acelerando-se com a segunda guerra: em 1940 já era comercializado o suco concentrado embalado a quente (“*hot pack*”) e, em 1944, iniciou-se a comercialização do suco concentrado congelado, o qual tomou rapidamente o lugar do suco embalado a quente e do suco concentrado, por ser de qualidade superior (Corrêa Neto, 1999).

A qualidade do suco de laranja é influenciada por fatores microbiológicos, enzimáticos, químicos, físicos e o estágio de maturação dos frutos, o que compromete suas características organolépticas (aroma, sabor), consistência, estabilidade da turbidez, separação de fases sólido/líquido e nutricionais (vitaminas). Em conjunto, esses fatores e as alterações durante o acondicionamento, distribuição e estocagem irão influenciar a vida-de-prateleira<sup>2</sup>, além dos processos tecnológicos de obtenção dos sucos. Tendo em vista que alguns extratores são projetados de modo a extrair o máximo de suco, sem incorporar componentes da casca, nem óleo essencial. Devido muitas vezes a escolha do tipo de extrator as flavanonas glicosílicas estão em baixos teores nos sucos, pois as mesmas se encontram predominantemente concentradas na pele (casca) (Coll et al., 1998).

Assim, a atividade enzimática, o teor de hesperidina e a viscosidade são mantidos em níveis baixos (Graumlich; Marcy; Adams 1986; Rodriguez; Viégas, 1980).

As empresas, principalmente as multinacionais, têm desenvolvido estratégias para o mercado interno no segmento de sucos prontos para beber. Estes produtos são apenas pasteurizados e não concentrados (empacotados em menos de 72 horas após colheita) têm validade reduzida e seu sabor oscila em função da maturação e da espécie de laranja utilizada. Outra estratégia utilizada pelas empresas para aumentar o consumo interno, reduzir o preço além de aumentar a praticidade para o consumidor é a disseminação de máquinas espremedoras de suco de laranja do tipo *fresh-in-squeeze*, em supermercados e lanchonetes. Este

---

<sup>2</sup> Período de armazenamento em que produtos com alta qualidade inicial permanecem adequados para consumo em determinadas condições de temperatura, umidade relativa, luz e outras, sofrendo pequenas, mas bem estabelecidas alterações, que são até certo ponto considerados aceitáveis pelo fabricante, consumidor e pela legislação alimentar vigente (Sivieri, K; Oliveira, M. N, 2002; SENAI, 2007).

suco tem melhor aceitação pelo consumidor, pois seu sabor é semelhante ao suco espremido na hora (Faverst; Pereira; David, 1996).

O Regulamento Técnico Geral para fixação dos Padrões de Identidade e Qualidade para Polpa de Frutas do Ministério da Agricultura e do Abastecimento, caracteriza o suco de laranja industrial como um líquido límpido ou turvo, extraído do fruto da laranjeira (*Citrus sinensis*), através de processo tecnológico adequado, não fermentado, submetido a um tratamento que assegura sua apresentação e comercialização até o momento do consumo.

O suco de laranja *in natura* é considerado uma das melhores fontes de vitamina C da dieta. No entanto, o ritmo de vida acelerado da sociedade atual associado à praticidade de preparo e armazenamento tem levado ao aumento do consumo de sucos e refrescos industrializados, porém pouco se conhece sobre a estabilidade destes produtos (Silva et al., 2005).

Existem diferentes tipos de suco de laranja, as primeiras etapas de processamento industrial são semelhantes para todos os tipos de sucos, em extratores tipo FMC - *Citrus Juice Extractors* separa-se o suco, as sementes, a casca e o bagaço, em uma só operação, o extrato é enviado ao sistema de filtração, para separação da polpa. A partir desta etapa, podem-se ter os diferentes tipos de suco de laranja na indústria, que podem ser divididos em sucos de laranja fresco, suco de laranja pasteurizado (NFC), suco de laranja concentrado e congelado (FCOJ) e suco de laranja reconstituído (RECON) (Tadini; Tribess, 2004).

### **1.2.2.1 Suco de laranja fresco**

O suco de laranja fresco (recém extraído) é obtido a partir da extração da fruta, sendo a seguir envasado em embalagens cartonadas ou plásticas. Este suco não sofre nenhum tipo de tratamento térmico e tem vida-de-prateleira muito limitada. Deve ser mantido sob refrigeração, distribuído e comercializado rapidamente, tendo vida útil de cerca de 2 dias (Tadini; Tribess, 2004). De acordo com os dados do *United States Department of Agriculture - USDA* e seus padrões de análises, em 100g de suco de laranja fresco, em média, são encontrados, 0,17 mg de eriodictiol, 11,26 mg de hesperidina e 2,19 mg de naringenina (USDA, 2006).

### **1.2.2.2 Suco de laranja pasteurizado (Not from Concentrated Orange Juice – NFC)**

O suco fresco é submetido à pasteurização e vendido como suco de laranja pronto para beber. A pasteurização do suco tem como finalidade destruir microorganismos e inativar a enzima pectinaesterase, tornando-o estável durante seu processamento e armazenamento. O processo de pasteurização pode ser feito de duas maneiras, por UHT (*Ultra High Temperature*) em temperatura de 150° C, por um tempo curto, resfriado até 20°C, envasado, comercializado à temperatura ambiente e por pasteurização HTST (*High Temperature Short Time*) em temperatura de 95°C por 20 segundos, depois resfriados e envasado em garrafas de vidro e mantido sob refrigeração com um tempo de prateleira de 35 dias, em média (Tadini; Tribess, 2004; Pinto, 2006).

### **1.2.2.3. Suco de laranja concentrado e congelado (Frozen Concentrated Orange Juice – FCOJ)**

O suco de laranja fresco é bombeado para tanques de alimentação dos evaporadores, onde é retirada grande parte do conteúdo de água, até que o suco atinja teor de sólidos solúveis totais de aproximadamente 65° Brix. O suco concentrado e congelado possui extensa vida-de-prateleira, mas pode perder atributos de qualidade durante seu processamento e estocagem (Pinto, 2006; Tadini; Tribess, 2004). Em consonância com os dados do USDA, e seus padrões de análises em 100 g deste tipo de suco de laranja em média, são encontrados, 26,21 mg de hesperidina e 3,27 mg de naringenina (USDA, 2006).

### **1.2.2.4 Suco de laranja reconstituído (Reconstitued Orange Juice from Concentrate - RECON – RTS)**

O suco de laranja concentrado e congelado pode ser reconstituído, originando o RECON, que tem seu teor de sólidos solúveis totais de 65° Brix reduzido para aproximadamente 11° Brix. Esta etapa é realizada pela adição de água em processo industrial, após o qual o produto é pasteurizado, podendo ser adicionado aromas e/ou essências de laranja e/ou de frutas cítricas e açúcar. Este suco é

acondicionado em embalagens cartonadas ou embalagens plásticas e comercializado como suco pronto para beber (Pinto 2006; Tadini; Tribess, 2004).

### 1.2.3 FLAVONÓIDES

Estima-se que diariamente o homem ingere de 10 a 2000 mg de flavonóides, dependendo dos hábitos alimentares e de acordo com a região que ele habita (De Wiel, Golde, Harte H, 2001). As frutas cítricas e verduras são as principais fontes de obtenção desses compostos (Justesen, et al, 2001; Middleton et al., 2000; Martinez-Valverde, et al., 2000; Horowitz & Gentili, 1997).

O uso dos flavonóides na terapêutica tem levantado várias questões quanto ao seu uso e também a respeito da biodisponibilidade. Em 1936, Rusziank e Szent-Gyorgi demonstraram seus efeitos benéficos sobre a regularização da permeabilidade vascular alterada, assim como sua atuação sinérgica com a vitamina C. O termo flavonóides foi atribuído a partir de 1952 por Geissman e Hinreier (De Wiel, et al., 2001; Bruneton, 2001). Confere-se a estes compostos uma diversidade de atividades farmacológicas que visivelmente não tem relação entre si. Entre as quais, podem-se enfatizar as suas propriedades antiinflamatórias (Theohrides et al., 2001; Benavente - Garcia et al.,1997), diuréticas (Wang, 2000), antiespasmódicas (Murota, Terraio, 2003), antibacterianas (Plaper et al., 2003; Marcucci et al., 2001;), antiulcerativas (Middleton et al., 2000; Rice-Evans et al., 1997), antivirais (Chiang et al., 2003), antifibrótica (Zitron, et al.,2005; QI et al., 2001; Osman et al.,1999), estrogênicas (Lampe, 1999; Piskula, 1999), antioxidantes (Kelebek et al., 2008; Gardana, et al., 2007; Riso et al., 2005; Wilmsen et al., 2005; Boadi, Yere, Adunyah, 2003), antineoplásicas (Lopez-Lazaro, 2002; Marchand et al., 2000) e outras (Havasteen 2002; Garcia, González e Santa Maria, 2002).

A atribuição das diversas propriedades aos flavonóides, sem que houvesse um estudo farmacológico prévio de seus respectivos mecanismos de ação e certificação da sua biodisponibilidade, induziu ao desuso destes compostos por um longo período. A *Food and Drug Administration* (FDA) aboliu do mercado dos EUA mais de 200 preparados contendo flavonóides até que suas eficácias fossem comprovadas. Devido às exigências, foram aprofundadas as pesquisas para

reavaliar as propriedades e elucidar seus mecanismos de ação farmacológicos (Setchell e Cassidy, 1999).

Posteriormente, a partir dos anos 80, voltou a existir o interesse por estas substâncias, utilizando algumas de origem semi-sintéticas, obtidas a partir de flavonóides contidos em frutas cítricas, com pequenas modificações estruturais. Assim, foram introduzidos na terapêutica compostos como a hidrosmina, diosmina (Figura 02). Estes foram indicados para o tratamento de distúrbios venosos causadores de varizes, hemorróidas e de outras patologias vasculares (Wang, 2000).

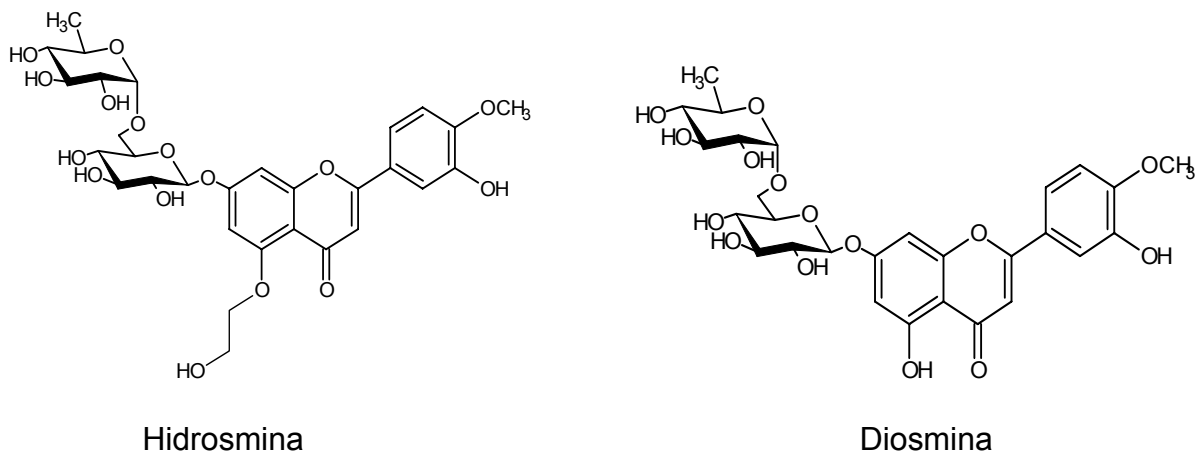


Figura 02 – Flavonóides de uso terapêuticos

As atividades benéficas dos flavonóides para a saúde humana têm sido bastante divulgadas e pesquisadas, no entanto poucos são os estudos que acompanharam os fatores que podem intervir na estabilidade destes compostos em decorrência dos métodos de obtenção dos alimentos, principalmente os sucos de frutas e/ou formas de acondicionamento ou até mesmo as interferências que possam existir em consequência das condições de cultivo dos vegetais.

Os flavonóides são muito específicos e diversos, uma vez que sua biossíntese está sob rígido controle genético, sua distribuição pode ser considerada característica para várias frutas, podendo ser usados para propostas taxonômicas. Por exemplo, uma fruta em particular pode conter dezenas de flavonóides ainda não identificados, assim, estes podem ser vistos como a “impressão digital” para cada fruta ou suco (Ooghe, 1994a).



Perfis polifenólicos são usados por muitos laboratórios para controle de qualidade, os quais representam a impressão digital dos sucos cítricos e podem ser usados para caracterizar variedades ou substâncias aditivadas, tais como polpa lavada, podendo ser aplicada à técnica da cromatografia líquida (CL) com detector no ultravioleta para caracterizá-los (Mouly; Gaydon; Auffray, 1998).

Em toranja (branca, rosa e vermelha), limões e limas, analisadas verificou-se que as flavanonas constituem mais de 90% dos flavonóides cítricos, obtendo – se um total de 27 mg/100g na toranja branca, e 18 mg/100g nas toranjas rosa e vermelha. Os perfis de flavanonas nestas variedades puderam ser caracterizados pela presença da naringina, (Figura 03.a) uma flavanona glicosilada e neohesperidosídeo (figura 03.b) que é responsável pelo sabor amargo. O conteúdo total de flavanonas em limões pode chegar a 26 mg/100g, havendo a predominância da hesperidina e eriocitrina, (Figura 03.c e 03. d) enquanto nas limas o total atinge 17 mg/100g de flavanonas representada em maior proporção pela hesperidina e também existem registros da presença de poncirina e naringenina (Figura 03. e e 03.f) (Peterson et al., 2006).

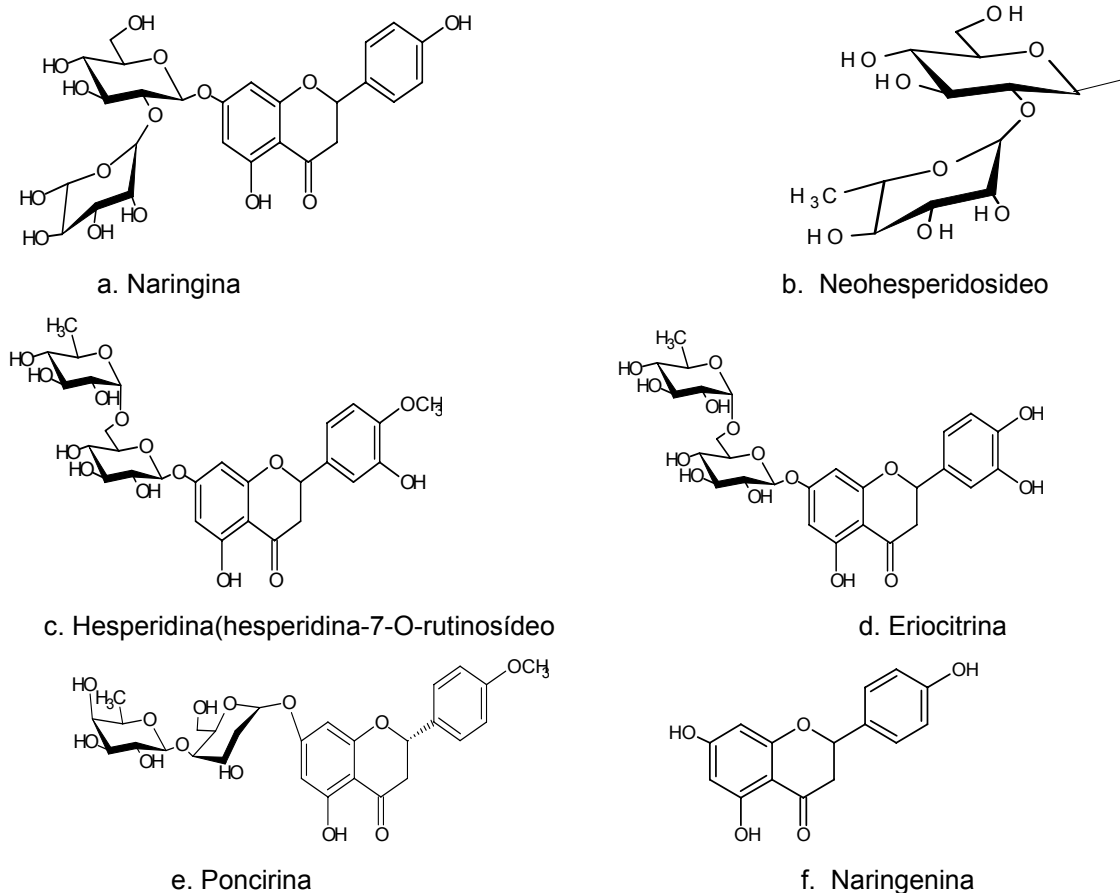


Figura 03 – Representação estrutural de: a) naringina b) neohesperidosídeo c) hesperidina d) eriocitrina e) poncirina f) naringenina

Estruturalmente, os flavonóides são substâncias aromáticas com 15 átomos de carbono ( $C_{15}$ ) no seu esqueleto básico, sendo compostos fenólicos do tipo  $C_6-C_3-C_6$ , onde os dois anéis  $C_6$  são normalmente aromáticos (anéis A e B) e conectados por uma cadeia de três carbonos que geralmente contém um heteroátomo de oxigênio (anel C) (Figura 04) núcleo básico dos flavonóides compostos por dois anéis aromáticos (A e B) e um anel intermediário (C).

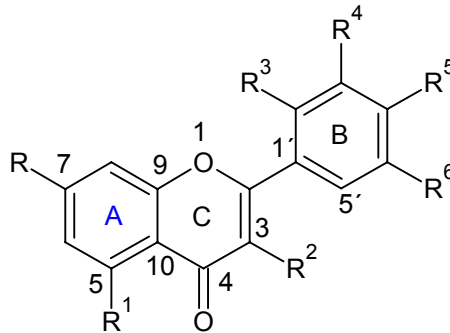


Figura: 04. Núcleo básico dos flavonóides compostos por dois anéis aromáticos (A e B) e um anel intermediário (C).

De acordo com as características químicas e biossintéticas, os flavonóides são separados em diversas classes: flavonas, flavonóis, dihidroflavonóides (flavanonas e flavanonóis), antocianidinas, isoflavanóides, auronas, neoflavanóides, biflavonóides, catequinas flavanas e seus precursores metabólitos conhecidos como chalconas podendo ocorrer como agliconas livres e glicosiladas e como derivados metilados (Havsteen, 2002). Com exceção das chalconas e auronas todos os flavonóides possuem um heterocíclico de seis membros (anel C) (Lopes et al., 2003). O esqueleto  $C_{15}$  dos flavonóides é biogeneticamente derivado do ácido cinâmico ( $C_6-C_3$ ) e três unidades de acetato ( $C_6$ ).

As classes dos flavonóides variam em sua estrutura característica ao redor do anel C (Peterson; Dwyer, 1998) e são quimicamente classificados de acordo com a presença ou não do anel central, de uma dupla ligação no anel e de um grupo hidroxila a ele ligado na posição C-3. E presença ou não de carbonila (Marcucci et al., 2001).

O anel C condensado com o anel A pode ser tanto um anel  $\gamma$ -pirano no caso das flavonas (A) e dos flavonóis (B) ou seu dihidroderivado no caso das flavanonas (C) e dos flavanonóis. A posição do anel benzênico substituinte B divide a classe dos flavonóides em flavonóides (anel B na posição 2), isoflavanóides (anel B na

posição 3) e neoflavonoides (anel B na posição 4) As chalconas são os precursores dos flavonoides (A) e as antocianinas são extremamente relacionadas aos flavonóides diferindo dos mesmos por possuírem o anel C com carga positiva (B) e duas insaturações(Havsteen, 2002) (Figura 05).

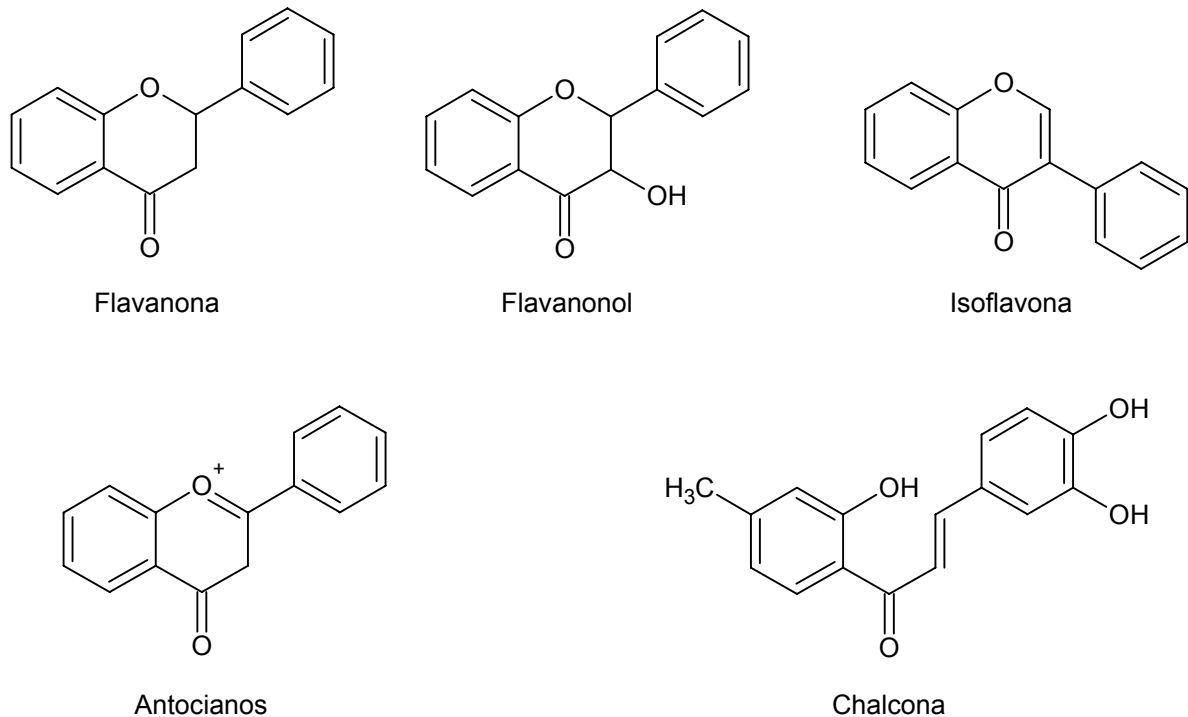


Figura 05 – Algumas classes de flavonóides mais comuns.

A maioria dos flavonóides, especialmente as flavanonas, absorve radiação eletromagnética na faixa do ultravioleta (UV) e visível [240-285 nm (banda II) 300-400 nm (banda I)] e sua presença nas plantas deve estar relacionado a esta propriedade (Rice-Evans; Miller; Paganda, 1996). A presença destes, nas superfícies das partes das plantas serve como um dispositivo de proteção para as folhas dos danos causados pela radiação UV-B (Onylagha; Grotewold, 2004).

### 1.2.3.1 Flavonóides do gênero Cítrus

Entre os metabólitos secundários presentes na casca e na polpa dos cítricos encontram-se os flavonóides, que constituem o grupo mais importante dos compostos fenólicos porque são considerados micronutrientes na dieta animal e

compõem uma ampla classe de substâncias de origem natural, cuja síntese não ocorre na espécie humana (Moreno-Alvarez; Carvalho, 2004).

O número de agliconas e flavonóides glicosídeos comumente encontrados em plantas comestíveis são bastante elevados, mas os tipos de flavonóides obtido a partir de diferentes fontes de dietas variam. Há relatos de que cerca de 8150 flavonóides tenham sido identificados em plantas (Anderson, O; Markan, K. R, 2006). Destes, elevada quantidade é de possíveis combinações de flavonóides agliconas e diferentes açúcares.

Os principais flavonóides cítricos pertencem ao grupo das flavanonas, sendo predominantes a naringina e a hesperidina (Figura 03a e 03c) para os quais se tem verificado sua biodisponibilidade desde a dieta à sua atividade antioxidante (Desiderio; Ross; Sinnibaldi, 2005). Além destes constituintes, os sucos de laranjas contêm pelo menos 6 flavonas polimetoxiladas (PMFs) (sinensetina, hexametoxiflavona, neobiletina, heptametoxiflavona, scutelareina e tangeritina) com as concentrações mais elevadas nas variedades Pêra e Natal (Pupin; Dennis; Toledo, 1998a; b) figura 06 (Tabela 01). Algumas das flavonas e os flavonóis se têm encontrado em baixas concentrações em comparação com as flavanonas, as quais têm mostrado ser potentes antioxidantes.

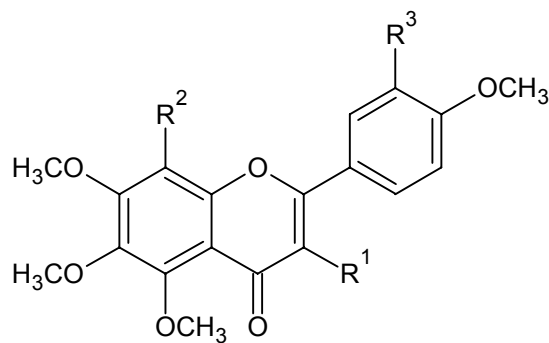


Figura 06 – Flavanonas polimetoxiladas. (PMFs).

Tabela 01 – Flavanonas polimetoxiladas comumente encontradas em frutos cítricos.

Nome	Abreviatura	$R_1$	$R_2$	$R_3$
<b>Sinensetina</b>	SIN	H	H	OCH <sub>3</sub>
<b>Hexametoxiflavona</b>	HEX	OCH <sub>3</sub>	H	OCH <sub>3</sub>
<b>Neobiletina</b>	NOB	H	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>
<b>Scutelareina</b>	SCU	H	H	H
<b>Heptametoxiflavona</b>	HEP	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>
<b>Tangeritina</b>	TAN	H	OCH <sub>3</sub>	H

O total do conteúdo de flavonóides (flavonas, flavonóis e flavanonas) no suco de laranja, oscila de um mínimo de 4,98 mg/100g a 42,47 mg/100g. (Iha et al., 2000; Pupin et al., 1998b). As flavanonas e os limonoides são responsáveis pelos sabores amargos dos cítricos, sendo a naringenina e a neohesperidina os componentes majoritários (Moreno-Alvarez & Carvalho, 2004) e os mais consumidos principalmente através das laranjas.

Os valores médios dos teores de hesperidina e naringenina obtidos em suco de laranja espremidos a mão são de 12,54 mg/100g (mínimo de 2,64 e máximo 39,20 mg/100g) e de 2,19 mg/100g (mínimo de 0,01 e máximo 6,37 mg/100g), respectivamente (USDA, 2006). Já nos sucos industriais os valores médios para hesperidina e naringenina, são respectivamente, de 26,21 mg/100g (mínimo de 15,35 e máximo de 32,29) e de 3,27 g/100g (mínimo de 2,56 e máximo de 4,38 g/100g) (Scalbert, 2000; USDA, 2006). Contudo, a quantidade de hesperidina (hesperetin-7-rutinosídeo) e narirutina (naringenina-7-rutinosídeo) em sucos de laranja, submetidos a processamento está na faixa de 200 a 590 mg/L e 16 a 84 mg/L, respectivamente (Clifford, 2000; Manach, et al., 2003; Pupin, et al., 1998b), 125-250 mg/L (Moreno-Alvarez & Carvalho, 2004). Em sucos de laranja estas flavanonas glicosiladas estão presentes em concentrações mais elevadas de que as flavonas polimetoxiladas com valores típicos de 0,1 mg L<sup>-1</sup>. Na ingestão de um copo (150mL) de suco, este pode conter 25 a 80 mg de flavanonas agliconas. Quando o consumo faz-se através da fruta inteira este valor é capaz de atingir cinco vezes mais a quantidade destas agliconas. Estes níveis são bastantes altos comparados com a média da ingestão de flavonóides os quais estão estimados em cerca de 25mg/dia nos países Europeus (Hertog et al., 1993; Justesen et al., 1997).

Dentre as três subclasses, a presença das flavanonas sobrepõe-se aos demais flavonóides de citrus. Esta subclasse ocorre como mono, diglicosídeos, não glicosilados e como aglicona metoxilada.

As flavanonas são os constituintes responsáveis pelo paladar dos citros, atribuindo um sabor azedo ou, muitas vezes, torná-os desprovidos deste sabor. Em geral, os flavonóides contribuem para a qualidade dos frutos e dos sucos. A influência é percebida através dos sabores (gosto) do alimento e que pode interferir no valor nutricional do produto a depender das condições agronômicas da planta e condições sazonais (Rodriguez; Viégas, 1980)

A hesperidina e a naringina, estão presentes no suco de laranjas doces (pêra e tangerinas) e são encontrados na membrana da casca, não são solúveis em soluções aquosas neutras e são levemente solúveis em soluções ácidas no suco cítrico, contribuindo neste caso com 10 a 25% da turbidez. Aparecem na forma de filmes, cristais ou flocos nos sucos concentrados ou reconstituídos e as concentrações de hesperidina geralmente diminuem com a maturação do fruto. A naringina é uma substância extremamente amarga, encontrada principalmente nos pomelos (Ooghe et al., 1994b).

A hesperidina durante o processamento do suco se deposita nos trocadores de calor, principalmente nos evaporadores dos extratores, reduzindo sua capacidade. Quando a película atinge certa espessura, começa a se soltar, causando o aparecimento de pontos brancos no suco, o que constitui defeito (Yamanaka, 2005). Os vários processos de preparação dos sucos podem diminuir o conteúdo dos flavonóides em até 50%, ou por se perder com tratamentos de higienização ou mesmo devido à remoção premeditada (Polydera, et al., 2005).

Em estudos experimentais foi observado que os flavonóides presentes em alimentos podem alterar os processos fisiológicos, ligando-se aos receptores dos fármacos, conseqüentemente, estes compostos podem exercer atividades biológicas (Jacobson et al., 1996).

As pesquisas, as quais envolvem estes compostos, explicam que provavelmente os flavonóides inibem as enzimas que liberam os fármacos no trato digestivo, antes de alcançar a corrente sanguínea. Isto é, em condições biológicas regulares, partes dos fármacos ingeridos são atacados pelas enzimas localizadas nas células da mucosa gastrointestinal e, como conseqüência, menor quantidade do fármaco alcança a circulação sanguínea. Contudo, quando a inibição de tais enzimas é ocasionada pela ação dos flavonóides isto faz com que ocorra uma elevação das taxas do fármaco na corrente sanguínea em razão das enzimas estarem impedidas pelos flavonóides de exercer o seu papel biológico na metabolização dos fármacos.

No caso das frutas cítricas se tem estudado tanto o efeito dos flavonóides como também das furanocumarinas sobre os <sup>3</sup>citocromos, em especial a naringina e os psoralenos, os quais são responsáveis pelo efeito inibitório apreciável sobre o citocromo P-450, especialmente no trato gastro digestivo, como também a nível hepático.(Ratia, 2007; Ho, Ping-Chuen; Saville, 2001; Ameer & Weintraub, 1997; Bailey, Arnold, & Spence, 1998; Bailey, Spence, Munoz, & Arnold, 1991; Guo & Yamazoe, 2004).

A naringina, que após a digestão sofre hidrólise transformando-se em naringenina, influencia na metabolização de alguns fármacos (ex. o grupo das dihidroperidinas) e reduz a atividade da variante do citocromo P450, a CYP3A4, promovendo o aumento do tempo de meia-vida destes fármacos no organismo (Fuhr; Klittich; Staib, 1993).

Este efeito é atribuído a naringina por ela ser inibidora ativa de CYP3A, em condições *in vitro* (Campbell et al., 2006; Moon; Wang; Morris; 2006). Entretanto, estudos feitos com amostras de sucos de laranja azeda e sucos de uva demonstraram que tanto a naringina como a naringenina, presentes nestas fontes, não foram as responsáveis primárias pelo efeito inibitório, mesmo em condições *in vivo* (Edwards; Bernier, 1996). Outros flavonóides presentes nas frutas tais como, narirutina, quercetina, kaemferol, hesperidina, neohesperidina, didimina e poncirina também interagem com drogas (Kiani; Imam, 2007). Do mesmo modo as diferentes espécies cítricas, além da toranja e laranja são capazes de interagir com as drogas (Honda, 2004).

Outras classes de substâncias distintas dos flavonóides, a exemplo, os psoralenos são também considerados os responsáveis pelos efeitos inibitórios dos citocromos (Sica, 2006; Girennaver et al., 2006).

Os distintos métodos de obtenção dos sucos, frescos e processados, e muitas vezes os distintos grupos de flavonóides usados pelos investigadores, colaboram para os variados resultados em relação aos diferentes comportamentos que estes

---

<sup>3</sup> É uma fração microssômica onde existe um sistema complexo de enzimas oxidases, cujo elemento central é o citocromo P-450, residente habitual das membranas do reticulo endotelial liso, que está constituído por um grupo de proteínas integradas as membranas que contém ferro. Este complexo enzimático, cujo nome se deve a sua capacidade de absorver a luz de 450 nm de longitude de ondas, elimina certas substâncias hidrófobas, cuja o perigo reside na sua capacidade para ficarem retidas formando parte das membranas biológicas (Ratia, 2007).

compostos tem sobre a inibição das enzimas (Dahan; Altman, 2004; Takanaga, et al., 2000).

### **1.2.3.2 Relação Estrutura- Atividade Antioxidante dos Flavonóides em Frutas Cítricas**

A dieta humana necessita de importantes nutrientes, tais como vitamina C e E, carotenóides e flavonóides, essenciais para a manutenção da saúde. Pesquisas epidemiológicas com dietas ricas de frutas cítricas demonstram que existe uma relação inversa entre a ingestão de frutas e a incidência de doenças coronarianas e alguns tipos de câncer (Di Majo et al., 2005; Hertog, 1997).

Os polifenóis são absorvidos em diversos locais do aparelho digestório. O mecanismo e os eventos que precedem à absorção dos flavonóides têm sido matéria de bastante debate podendo ocorrer diretamente no intestino ou em partes deste, como o duodeno e colón.

Os diferentes locais de absorção são resultantes das várias fontes de ingestão destes compostos e das várias formas estruturais dos flavonóides, portanto mecanismos enzimáticos distintos ocorrem em regiões do aparelho digestório pela interferência da microflora intestinal responsável pela etapa de metabolização e absorção dos alimentos. Diferentes enzimas intestinais são produzidas pelas bactérias e estas são responsáveis pela hidrólise dos flavonóides. As bactérias provocam a ruptura dos anéis aromáticos em consequência há formação de compostos simples, geralmente de maior biodisponibilidade e atividade por ação das enzimas bacterianas (Erlund, 2002).

Os flavonóides durante o curso de absorção, são conjugados no intestino e fígado mediante reações de metilação, conjugação, sulfatação ou suas combinações. Estes conjugados são transportados através do plasma aos distintos tecidos e órgãos. A eliminação se procede, sobretudo através da urina e bÍlis. Os flavonóides que seguem a rota biliar são secretados no duodeno, onde são submetidos a ação das enzimas bacterianas, especialmente a  $\beta$ -glucorinidases e posteriormente reabsorvidos. Este reaproveitamento entero-hepática prolonga a presença destes compostos no organismo. A absorção e metabolização dos flavonóides são influenciadas por fatores tais como lipossolubilidade ou



hidrossolubilidade das moléculas, a união com açúcares ou ácidos orgânicos, o grau de polimerização (Alonso, 2005) (Figura 07).

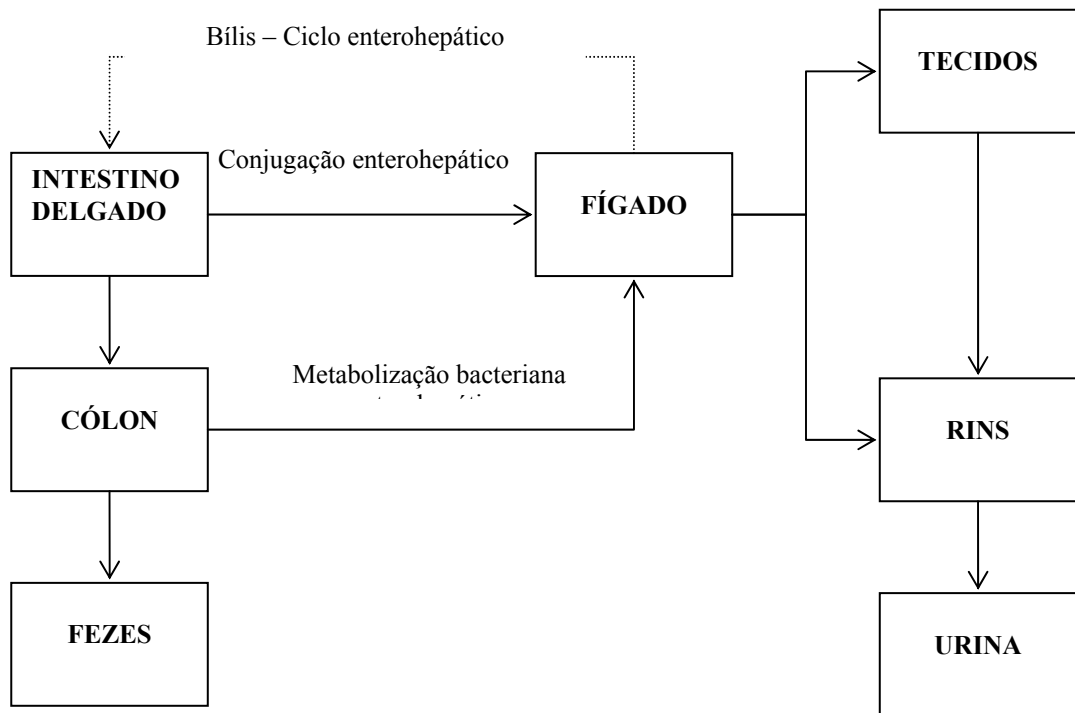
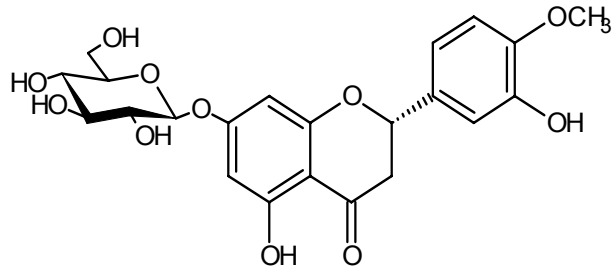


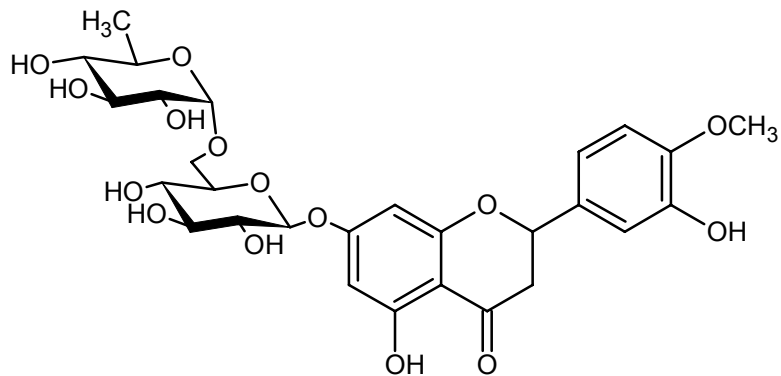
Figura 07 – Possível rota dos compostos fenólicos da dieta (Scalbert & Williamson, 2000).

Como exemplo, pode-se destacar a hesperidina que é ingerida a partir de frutas e sucos cítricos, e tem a sua biodisponibilidade limitada devido à ligação ao grupo rutinosídeo. Tanto a hesperidina como também a naringina são absorvidas a partir do trato gastro intestinal após a ingestão, mas, sua biodisponibilidade por via oral é muito baixa, ou seja, menos de que 20%.

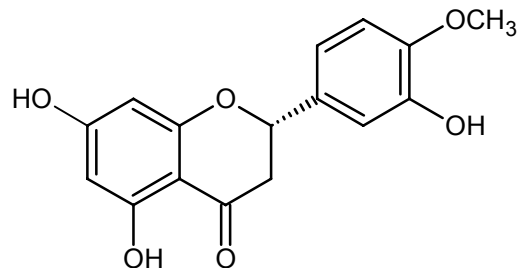
Em ensaios clínicos, foi demonstrado que a remoção da fração raminosídeo, após a adição da enzima hesperidina, que a converte em hesperitina-7-glicosídeo, torna a hesperidina mais biodisponível. Este estudo demonstrou mudança no sítio de ação, o qual deixa de ser no cólon para acontecer em nível de intestino delgado (Nielsen et al., 2005) (Figura 08). Entretanto, há considerável variação inter-indivíduos na dose – resposta, tais variabilidades na absorção ou no metabolismo podem ser atribuídas em parte às variações dos transportes enzimáticos, bem como devido às diferenças genéticas entre os indivíduos e variáveis nas práticas agrônômicas (Spencer. et al., 2008).



Hesperitina (7-glicosídeo)



Hesperidina (hesperitina 7-rutinosídeo)



Aglicona

Figura 08 – Representação estrutural das possíveis ocorrências da hesperidina

Estudos das propriedades antioxidantes dos flavonóides tem permitido a caracterização das principais classes, principalmente em fontes de alimentos como as frutas cítricas, onde ocorrem naturalmente. Interesses comerciais já buscam o desenvolvimento de plantas como fontes de antioxidantes os quais podem ser empregadas como alimentos ou como nutracêuticos<sup>4</sup> (Rice-Evans, 1997).

<sup>4</sup> Produto isolado ou purificado de alimentos, o qual é vendido sob forma medicinal não usualmente associado com alimentos ou substâncias sem histórico de consumo no País, ou alimentos com substâncias já consumidas, e que, entretanto venham a ser adicionadas ou utilizadas em níveis muito superiores aos atualmente observados nos alimentos utilizados na dieta regular – Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA, 1999.

Métodos de determinação de atividade antioxidante para os principais flavonóides, polifenóis totais e os seus potenciais antioxidantes demonstram que o coeficiente de correlação é mais elevado para polifenóis totais do que para os principais flavonóides (como marcadores de 100% de frutas cítricas) (Gorinstein et al., 2006).

O comportamento antioxidante e oxidante de algumas flavanonas comuns em cítrus e a relação estrutura-atividade como antioxidante ou oxidante, pode ser avaliado através de ensaios de inibição e descolorimento de carotenóide (método baseado na oxidação de carotenóide por radicais de peróxidos, produzidos a partir de ABAP [2,2'-azo-bis (2-amidinopropane)]) e que permitem verificar a existência de propriedade antioxidante que os flavonóides possuem quando usados através da ingestão de alimentos (Di Majo et al., 2005; Antolovich et al., 2002).

A atividade antioxidante dos flavonóides depende da estrutura química dos compostos. Tais informações auxiliam na busca e identificação de alimentos ricos nesses componentes, promovendo inclusive o desenvolvimento de alimentos seguros e aditivos com propriedades antioxidantes na dieta. Porém, deve-se considerar que estes compostos, quando em altas concentrações, ou em particular condições ambientais, podem atuar como oxidantes, induzindo as reações de radicais livres. (Kuskoski; Asuero; Troncoso, 2005).

A capacidade antioxidantes dos cítricos pode ser influenciada em razão da variedade cítrica utilizada (Kelebek et al., 2008). Além da forma como estes são empregados na alimentação, se *in natura*, nas condições de sucos, pois, na categoria de sucos estes são mais eficazes como antioxidante de que na forma de vinhos cítricos (Kelebeck et al., 2009)

As propriedades antioxidantes de alguns flavonóides são determinadas pela presença de grupos catecólicos no anel B, a dupla ligação 2,3 em conjugação com a carbolina em 4- e a presença de ambos os grupos hidroxilados na posição 3, 5 e 7 (Moreno-Álvarez & Carvalho, 2004) (Figura.09).

Um outro indício da atividade antioxidante dos flavonóides é que estes restauram a oxidação do ácido ascórbico. Este comportamento pode estar atribuído à facilidade dos flavonóides de atuar como receptores de radicais livres e também remover íons catalíticos por complexação (Thompson & Williams, 1976).

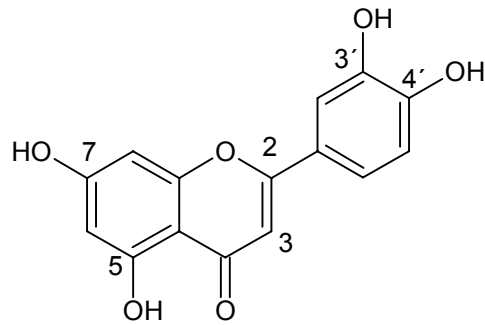


Figura 09 - Representação de flavonóide com atividade antioxidante.

### 1.2.3.3 Outras atividades biológicas relacionadas com flavonóides

São atribuídos aos flavonóides múltiplos efeitos biológicos tais como antiinflamatórios, antialérgicos, inibidores de enzimas (oxidoredutases, kinases, isomerases, transferases, ligases), influência sobre o sistema sensorial ( (Havesten, 2002; Manthey et al., 1999) e efeitos radioprotetores, proteção contra o aumento da pressão sanguínea ou o aumento do colesterol (Belajová & Suhaj, 2004; Jagetia & Reddy, 2002).

Indivíduos com concentrações de colesterol-LDL plasmático moderadamente elevadas e taxas de triglicérides plasmáticas normais, após dieta com ingestão diária de suco de laranja (250 até 750mL diário, durante 4 semanas) tiveram suas taxas de colesterol-HDL aumentadas em, 21%, folatos 18%, e a razão de colesterol HDL-LDL decresceram em 16% (Kuskoski et al., 2000).

As maiores concentrações das flavanonas são encontradas na casca das frutas cítricas, porém, durante o processamento do suco existe significante perda destas.

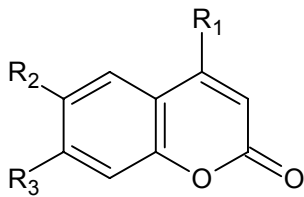
Para preservar estes componentes, recomenda-se o controle da obtenção dos sucos ou até mesmo adicionar estas substâncias bioativas à bebida para melhorar a saúde humana (Evans, 2006; Manthey et al., 1999).

A literatura registra que cerca de 3-5% da população é alérgica para estas substâncias no sangue (Havsteen, 2002). Importante razão para a baixa toxicidade dos flavonóides agliconas é a baixa solubilidade em água e o rápido catabolismo dos núcleos piranos no fígado. O que muitas vezes pode ser um problema para aplicações médicas destas substâncias. A meia-vida dos flavonóides no sangue tem sido determinada como sendo de 1 a 2 horas (Delaney et al., 2002)

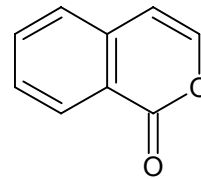
### 1.2.4 Psoralenos do gênero Citrus

As furanacumarinas são metabólitos secundários muito comuns presentes em diferentes partes de plantas como raízes, folhas e frutos, mas também podem ser encontrados em fungos e bactérias, embora sintetizadas, principalmente, nas folhas estas, ocorrem em níveis mais altos nas frutas, seguido pelas raízes e caule. Cerca de 1300 diferentes estruturas já foram identificadas de fontes naturais, especialmente em plantas verdes (Souza, 2005).

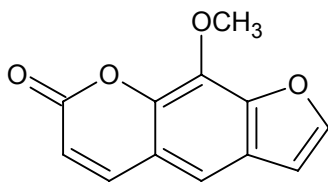
A cumarina *per se* é o esqueleto básico de todos os outros derivados e é considerado quimicamente como a fusão dos anéis benzeno e 1,2-pirona (primeiro átomo numerado do ciclo é o oxigênio sem dupla ligação), e podem ser classificadas como segue: cumarinas simples, furanocumarinas, piranocumarinas, cumarinas com substituintes no anel pirona e cumarinas miscelâneas, (cumarinas diméricas como o dicumerol) (Figura 10) (Clifford, 2000; Costa, 1994; Ojala, 2001).



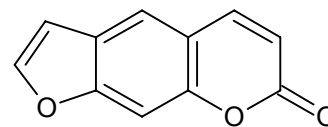
a. cumarina simples



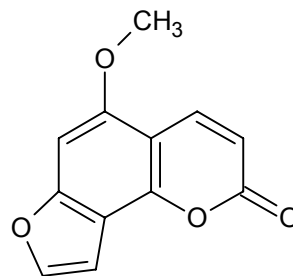
b. piranocumarina (isocumarina)



c. 1 furanocumarina linear (5-metoxipsoraleno)



c. 2 Psoraleno



d. furanocumarina angular (isobergapteno)

Figura. 10 – Estrutura química de alguns compostos cumarínicos

Estruturalmente são lactonas do ácido o-hidroxi-cinâmico (2H-1-benzopiran-2-onas), sendo o representante mais simples a cumarina (1,2-benzopiranona) (Simões et al, 2000; Vilegas et al., 1999).

Ocorre como cristais prismáticos, incolor com odor de fragrância característica e de sabor amargo, aromático e picante. Quando em estado livre é solúvel em álcool e em outros solventes orgânicos como éter e solvente clorados, com os quais pode ser extraída. São moléculas bastante pequenas e com baixa polaridade (Bruneton, 1995; Mondello; Dugo, G. Dugo, 2002)

Dentre as classes de cumarinas encontram-se as furanocumarinas, que são substância que se constituem na condensação de um anel furânico (anel de 05 membros) ao núcleo cumarínico, e se subdividem em lineares e angulares com substituintes ligados às posições dos demais anéis benzenóides (C<sub>5</sub>, C<sub>6</sub>, C<sub>7</sub>, e C<sub>8</sub>). Figura 12 c1 c2, 120d (Lourenço, 2001; Souza, 2005)

As furanocumarinas lineares (ou psoralenos) figura 12 c1 c2, são encontrados em várias plantas das famílias Umbelliferae, Rutaceae e Moraceae. Ocorre ainda em plantas de outras famílias como, Amaranthaceae, Guttiferae, Compositae, Cyperaceae, Dipsacaceae, Gooddeniaceae, Pittosporaceae, Rosaceae, Samydaceae, Solanaceae (Ojala, 2001).

Destacam-se algumas espécies que fazem parte da dieta do ser humano e de outros animais. São encontradas em vegetais como cenoura, aipo, salsa, coentro, alcachofra, alface e a chicória, frutas cítricas, figo e certas especiarias, como o chá verde, anis, funcho e a canela. (Schalatter et al., 1991; Diawara et al., 1997a; Diawara & Kulkosky, 2003). Também podem ser aditivados em perfumes e outros cosméticos. (Solis, Dotson, Trizana. 2000; Gonçalves et al., 2005). Durante uma época, os psoralenos eram componentes dos óleos de bronzear na Europa (Ferreyra, 2007). Em 25 de setembro de 2000, a *Commission Directive 95/34/EC adding to annex II*, restringiu o uso de psoraleno em protetores solares e produtos para bronzeamento a concentrações iguais ou inferiores a 1mg/kg.

As furanocumarinas lineares (psoralenos) são mais fototóxicos em comparação aos angulares (angelicanos). As reações mais severas ocorrem com 5-metoxipsoraleno (5-MOP; bergapteno) isolado de *Citrus bergamia* (Rutaceae), a laranja bergamota e 8-MOP (xantotoxina) isolado da *Fagara xanthoxyloides* (Rutaceae). Somente 1 mg de 8-MOP por centímetro quadrado são necessários

para produzir bolhas após  $2.4 \text{ J/cm}^2$  (em menos que 10 minutos no verão do Colorado) (*Electronic textbook of dermatology—Botanical Dermatology, Phytophotodermatitis* <<http://telemedicine.org/botanica/bot5.htm>> acesso: 06.12.2007).

Psoralenos são compostos fotoativados, com faixa de comprimento de onda ultravioleta A (UV-A) situada entre 320 e 400 nm. Apresentam quatro zonas de absorção no UV 205 -225 nm ( $\log \epsilon$  4,0), 240 – 255 nm (4,06 - 4,45), 260 - 270 nm (4,18 - 2,26) e 298 - 316 nm (3,85 - 4,13). O psoraleno apresenta bandas em 213, 245 e 296 nm, enquanto que o bergapteno em 222, 248 - 266 e 314 nm (Lourenço, 2001).

Considera-se estes compostos como fitoalexinas e que podem ser definidas como compostos antimicrobianos que são sintetizados e acumulados em plantas após exposição a algum tipo de estresse biológico e ou ambiental. Funcionam como toxinas naturais para proteger as plantas dos animais, insetos e microorganismos. (Guo, & Yamazoe, 2004). Estas fitoalexinas são formadas como resposta às injúrias traumáticas durante os processos de murchação (desvigoramento), doenças ou mesmo secagem das plantas. Elas acumulam-se sobre as superfícies das plantas, principalmente sobre as cascas de frutas, sementes, inibindo o crescimento e reprodução de patógenos (Ojala, 2001). Estas cumarinas em especial, atuam no metabolismo tomando parte na regulação do crescimento das plantas.

De acordo com o Anexo II do Council Directive, 1988 (88/388/EEC) o limite geral permitido do uso de psoralenos no alimento e em bebidas não alcoólicas é de até 2mg/kg. Entretanto, em bebidas alcoólicas e caramelos o limite permitido é de 10 mg/kg e em goma de mascar é de 50 mg/kg.

Os dados mais recentes sobre concentrações de psoralenos em alimentos obtidos pela Comissão do Senado sobre Segurança em Alimentos – DFG (2006) registram valores para alguns produtos, tais como, bebidas não alcoólicas - 8  $\mu\text{g/g}$ , sorvetes – 8 $\mu\text{g/g}$ , bombons – 27  $\mu\text{g/g}$ , produtos de padaria – 29  $\mu\text{g/g}$ , gelatina e pudim – 5 – 90  $\mu\text{g/g}$ , goma de mascar – 43  $\mu\text{g/g}$  e açúcar glacê – 1 – 130  $\mu\text{g/g}$ .

Concentrações de psoralenos em frutas e vegetais podem variar consideravelmente dependendo da cultivar, parte da planta, condições de estocagem, localização geográfica, impacto da poluição atmosférica e processos de produção dos alimentos (DFG, 2007).

A lima Pérsia do Arizona contém seis vezes mais 5-metoxipsoraleno (5-MOP) em relação ao mesmo cítrico cultivado na Florida. Quanto à localização na planta, a concentração de bergapteno na polpa da lima está em torno de 1 mg/g, enquanto que na pele encontra-se entre 20 -130 mg/g ( Dercks; Trumble; Winter, 2005 ).

A concentração de psoraleno na casca da lima chega a ser cem vezes maior do que na polpa desta fruta (Nigg, et al., 1993). A laranja de seville apresenta concentrações que variam de 0,7 mg/kg na fruta fresca até 36 mg/kg, na casca (DFG, 2006).

Existem relatos que os psoralenos são predominantemente compostos antifúngicos. Estes compostos são achados como constituintes em plantas saudáveis, mas a quantidade destes pode ser aumentada em condições de estresse da planta (Al-Barwani & Eltayeb, 2004)

Em vegetais, concentrações mais elevadas foram encontradas em amostras estocadas de aipo, pastinaca e salsas infectadas por microorganismos (*Sclerotinia sclerotiorum*) resultando no aumento da produção de psoraleno, 5-metoxipsoraleno e 8-metoxipsoraleno (David. 2000; Ivie et al., 1981).

Estudos experimentais demonstram que a concentração de psoralenos em aipo é rapidamente elevada até em 100 vezes a sua quantidade na presença de agente viral e que essas taxas decrescem subsequente após a eliminação do agente (Ataga et al., 1999).

Os psoralenos do gênero cítrus estão presentes na casca e na polpa. A polpa da laranja seville contém aproximadamente 13 mg/kg (DFG, 2006) e da lima 5 mg/kg. Já na casca da lima (variedade Pérsia e West-Indian) 334 - 502 mg/kg (Nigg et al., 1993). O óleo de limão, 33 mg/kg e óleo de lima, 1.700 - 46.700 mg/kg (Shu et al., 1975; Stanley & Jurd, 1971; Stanley & Vannier, 1967). Quando obtidos por prensagem a frio o óleo de lima contém cerca de 7% por peso e o óleo de laranja cerca de 0,5% (Stanley & Jurd, 1971).

De acordo com dados da indústria, o óleo de lima contém de 3 - 6% de psoralenos e a quantidade de óleo usado na produção de bebidas flavorizadas é em torno de 50 ppm, que corresponde à concentração de psoralenos de até 3 mg/L (Stanley & Vannier, 1967)

A expectativa é que as concentrações mais elevadas destes compostos sejam encontradas nos produtos nos quais foram adicionados óleos de limas ou de bergamota. Embora, as concentrações em tais óleos difiram, dependendo sobre



quais métodos foram obtidos, destilação ou <sup>5</sup> prensagem a frio (Stanley, & Jurd, 1971).

Em 1994, o relatório anual do *Committee on Toxicity Mutagenicity of chemicals in food consumer products and the environment* considerou muito baixo o potencial de mutagenicidade, devido aos baixos níveis destes na dieta (abaixo de 8 µg/ mg de psoraleno total). Já em 2007, a Comissão sobre segurança de alimentos do Senado Europeu revisou os dados e estimou que a média diária da ingestão de psoralenos via alimentos como sendo de 1,3 mg (USA) baseados no consumo de frutas cítricas, sucos cítricos, e alimentos flavorizados com 0,25% de óleos cítricos. Na Grã Bretanha o consumo máximo é de 1,2 mg/pessoa e na Alemanha a média do consumo diário via frutas é de 0,04 mg. Assumindo então que, a ingestão de alimentos flavorizados contenha somente óleos de citros obtidos por pressão a frio, a média de ingestão diária está em cerca de 1 mg/pessoa (DFG, 2007).

A exposição aos psoralenos pode ser reduzida através do controle do estresse crescente das plantas durante o processo de armazenamento e estocagem dos alimentos (Wagstaff, 1991).

Os Estados Unidos restringem em 1 ppm a concentração de psoralenos em produtos cosméticos (Frérot, 2004). Procedimento semelhante adota a Comissão Européia quanto a presença de psoralenos em produtos cosméticos, a qual estabelece em 1 mg/kg o limite máximo permitido em qualquer produto cosmético, mas não fornece advertências sobre a dieta com estes compostos (SCCP, 2005).

#### **1.2.4.1 Toxicidade em humanos**

Existe uma preocupação constante da *Food and Drug Administration* (FDA) que as novas variedades de plantas geneticamente modificadas ou aquelas que sejam mais resistentes a pragas contenham maiores quantidades de substâncias tóxicas naturais, conseqüentemente há crescente interesse nas pesquisas quanto à natureza tóxica das furanocumarinas lineares (Weber, et al., 1999). Estas substâncias se tornam mutagênicas quando são ativadas pelo sol, distingue-se neste grupo os psoralenos que possuem potencial carcinogênicos (Carrilo, 2005).

---

<sup>5</sup>Psoralenos compostos presentes no óleo de casca de cítricos prensados a frio, são essencialmente não voláteis e, conseqüentemente, não são achados nos óleos destilados. (Stanley, W.L 1971).

A fitofotodermatite (PPD) é uma erupção inflamatória cutânea resultante do contato com substâncias botânicas que são sensíveis à luz e a radiação UV-A (320-380 nm). Os psoralenos são os responsáveis pelas estatísticas porque estes são constituintes de uma variedade de plantas domésticas, por este motivo um número elevado de pessoas pode fazer-se exposto (Baugh, et al., 2007).

Existem relatos da incidência de 16 casos de fitofotodermatite causado principalmente por limão para cada 100.000 habitantes na cidade de Pelotas – Rio Grande do Sul. E em todos os verões são registrados 50 novos casos nesta cidade (Gonçalves, et al., 2005)

São também atribuídos aos psoralenos efeitos fotosensibilizantes seguidos de procarcinogenicidade (Mandalari, et al., 2006).

A principal causa de reações de fitofototoxicidade nos Estados Unidos, principalmente na Florida está sob a responsabilidade da casca (mesocarpo) da lima Pérsia, *Citrus aurantifolia*. Os hábitos de ingestão desta fruta *in natura* em locais de exposição às radiações solares durante momentos de lazer são bastante comum, além do consumo de bebidas flavorizadas contendo concentrações de óleo deste cítrico (*Electronic Textbook of Dermatology, Phytophotodermatitis* <<http://telemedicine.org/botanica/bot5.htm>> acesso:06.12.2007). A lima foi responsável pela fototoxicidade aguda em um jovem, que comprimiu a polpa desta fruta entre as mãos durante lazer na praia. Um dia após a exposição desenvolveu na região das mãos eritema e dois dias depois a formação de erupção bolhosas, hiperpigmentação e surgimento de vesículas na área afetada. (Weber, et al. 1999).

A reação clínica mais comum é a hiperpigmentação linear nas áreas de exposição ao agente que pode ser persistente por semanas e até meses. Estas lesões são inicialmente assintomáticas podendo ser associadas a queimaduras.

Variações nos padrões das reações têm influências de numerosos fatores incluindo, raça, funções da barreira da pele, duração do contato com o componente e a quantidade e intensidade de exposição à luz solar (Brancaccio & Alvarez, 2004).

O limiar para toxicidade de psoralenos em humanos foi determinado como sendo de 18 µg/g do peso fresco da planta (salsa) para desenvolvimento de dermatite aguda e de 7 – 9 µg/g para exposições repetidas ou crônicas. Isso pode variar para diferentes partes do corpo, (Diawara, et al., 1997b; Diawara & Kulkosky, 2003) outros fatores, tais como, raça, barreira funcional da pele e o tempo de

exposição em presença da luz solar também podem influenciar (Brancaccio & Alvarez, 2004).

Em estudos experimentais com ratos, (Diawara, et al., 2001) observaram que a administração de doses entre 200 até 400mg/kg por massa corpórea alterou a histologia de alguns órgãos, como o fígado, e glândulas adrenais destes animais.

Questões étnicas influenciam o consumo dos psoralenos, através da alimentação. O aumento da produção e a globalização da agricultura cítrica têm contribuído para o crescimento da disponibilidade dos psoralenos na dieta através das frutas cítricas. Durante o período de 1961 até 2003 a produção de cítricos nos Estados Unidos aumentou igualmente na mesma proporção da incidência dos casos de melanoma (em cinco vezes). Este país é a principal rota de migração das várias etnias o que também é um fator que colabora para a elevação do consumo dos psoralenos, já que os imigrantes buscam adaptar-se aos hábitos alimentares deste país (Wagstaff, 1991). Na ausência de restrições regulatórias sobre o consumo de psoralenos na dieta, as pessoas com risco elevado para melanoma devem ser aconselhadas para reduzir rigorosamente a ingestão de produtos que contenham psoralenos. Nos países desenvolvidos o avanço no consumo de laranja e outras frutas cítricas duplicaram desde 1980. (Sayre & Dowdy, 2008) tabela 02.

Tabela 02 – Consumo de psoralenos através da alimentação nos Estados Unidos.

<b>Raça</b>	<b>Dieta psoralenos (mg/pessoa/dia)</b>
Branca	1,21
Preta	2,28
Asiática	2,99
Americano nativo	3,29
Outras etnias	2,01

Qualquer raça pode ser afetada, mas a fitofotodermatite (PPD) é mais comum em pessoas magras e claras. O fator idade também influencia na ocorrência de PPD, geralmente as crianças estão mais expostas em razão do uso de alimentos contendo estes compostos e também devido aos hábitos das brincadeiras quase sempre expostas a radiações solares. Além destes grupos de riscos, indivíduos com atividades quase sempre expostas à luz solar como, jardineiros, atletas que praticam esportes expostos a radiações solares, trabalhadores da agricultura, principalmente

aqueles que convivem com o plantio de algumas verduras, como aipo, salsa, cenoura, estes estão mais vulneráveis a fitofototoxicidade (Solis, 2000).

A ingestão de 450 g de aipo, aproximadamente 45 mg de psoraleno, seguido de exposição à radiação UV-A sobre o sol, resultou em várias lesões sobre a pele tais como, bolhas, eritema e queimaduras (Ljunggren, 1990).

O aipo fresco contém entre 0,1mg/g por peso úmido de psoraleno em plantas saudáveis, mas tem em torno de 32 mg/g quando infectado com *Sclerotinia sclerotium* (doença putrefação rosa) (*Electronic Textbook of Dermatology Phytophotodermatitis* <<http://telemedicine.org/botanica/bot5.htm>>acesso: 06.12.2007). Observou-se um aumento na concentração de psoraleno após 53 dias de estocagem de aipo em temperaturas acima de 4°C resultando em visível contaminação por fungos, passando de 40 mg/kg para 566 mg/kg os níveis destes compostos (Ostertag et al., 2002).

A dose oral de psoralenos mais baixa em combinação com UVA que levou a efeitos fototóxicos detectáveis em adulto está na faixa de 14 mg 8-MOP, correspondente a cerca de 0,23 mg/kg, massa corporal de 60 kg (DFG, 2006). O fator segurança entre a possível ingestão de psoralenos da dose fototóxica está acima de 2 -10 mg, a qual é relativamente baixa (Schalatter et al., 1991).

Há o relato de um caso de fotodermatite extensa em um homem com idade de 49 anos, após a aplicação do sumo de *Citrus hystrix*, na região dorsal da mão, com o objetivo de repelir os insetos durante intenso dia de caminhada na floresta tropical. Após 24 horas da aplicação, na área onde foi aplicado o produto surgiu erupções seguidas de bolhas e a formação de vesículas (Koh & Ong, 1999) (Figura 11)



Figura 11 – PPD em dorso da mão (a) provocado por *C. hystrix* (b).

O mecanismo responsável pela toxicidade do psoraleno sobre a pele ocorre pela combinação com a radiação solar – UV-A (320 – 380 nm) que complexa com o DNA epitelial formando fotoductos a partir do complexo, DNA – psoraleno – radiação solar, resultando na reação clínica - fitofotodermatite (Brancaccio & Alvarez, 2004).

A administração sistêmica de um preparado a partir do fruto de *Ammi majus*, contendo 3% de psoralenos (xantotoxina, bergapteno e oxypeucedanino) seguida por exposição ao sol provocou severa dermatite fototóxica em um paciente que sofria de vitiligo (Clifford, 2000).

Sucos de toranja processados na Florida contêm em média de 2 - 3 ppm de 6,7-dihidroxi-bergamotina (DHB), 3 - 4 ppm de bergamotina, podendo atingir até 1,7 mg/250 mL de bergamotina (DHB) (Widmer, 2005).

Quando a ingestão acontece associada com algumas drogas à atividade do CYP 3A4 na mucosa gastrointestinal eleva os níveis na circulação de uma variedade de fármacos incluindo ciclosporina, felodipina, midazolam, nisoldipina, quinidina e terfenadina para níveis que causam efeitos colaterais (Goosen et al 2004).

Os psoralenos presentes nas frutas cítricas e outros vegetais comestíveis podem ser mais potentes inibidores de drogas do que os flavonóides, a exemplo a naringina (Ameer, 1997). Os efeitos clínicos dependem da ação combinada dos psoralenos e flavonóides com as drogas e o local de ação (Brian et al., 2005).

O reconhecimento deste fenômeno tem levado a recomendação para que pacientes que usam tais drogas evitem associá-las a toranja. Estes podem evitar fazer uso de produtos à base de toranja 72 horas antes da ingestão de drogas, (Stump; Mayo; Blum, 2006). Já que esta inibição é de caráter irreversível, (McCloskey; Zaiken; Couris, 2008).

No Brasil, existem alguns produtos que contêm suco de toranja, como, as bebidas Schweppes Citrus® e Fanta Citrus®. Os clientes devem ser orientados a estarem atentos à composição dos produtos, principalmente os cítricos, que consumir, buscando as expressões “suco de toranja” ou “suco de pomelo” (Morita, 2008).

O argumento para com o paciente, cuja condição é balanceada por terapia de droga, é que beber suco de toranja regularmente e concomitante com o uso de drogas, parece ser imprudente, devendo-se, no entanto, considerar individualmente as condições de cada paciente (Dahan & Altman, 2004).

O principal psoraleno na toranja, 6',7'-dihidroxi-bergamotina, inibe a atividade de várias isoformas do citocromo humano P-450 *in vitro* (1A2, 2A6, 2C9, 2C19, 2D6, 2E1 e 3A4) (Clifford, 2000).

Os psoralenos, presentes no suco de toranja, interage com a felodipina por mecanismo comum, ou seja, pela interação do CYP3A4 intestinal (Malhotra, et al., 2001).

As conseqüências da associação do suco de toranja com fármacos sobre a disponibilidade dos níveis das drogas no sangue foram acidentalmente descobertas durante um estudo farmacêutico para avaliar a interação entre felodipina (Plendil) uma droga prescrita para tratamento da hipertensão e o etanol. O suco de toranja foi utilizado para mascarar o sabor do etanol em estudo duplo-cego (Bailey, 1989).

Experimentos que compararam suco de toranja controle, com suco de toranja no qual foi removido mais que 99% dos psoralenos sobre a absorção da felodipina – bloqueador do canal de cálcio e ciclosporina – imunossupressor, demonstrou que houve aumento nos níveis de absorção após o consumo de suco de toranja, o qual continha psoraleno (Paine, et al., 2006).

Efeito de matriz pode interferir na biodisponibilidade dos psoralenos a partir de alimentos, tornando-os menos disponível quando comparadas àquelas administradas por via oral em uma forma isolada, conforme estudos que derivam à dose fototóxica. Os psoralenos não são limitados apenas à toranja, mas também a outros cítricos (Guo, et al., 2000).

Diferenças nos teores de psoralenos nos vegetais e frutas, além da quantidade de ingestão destes compostos contribuem para o potencial de interação com os fármacos, o que pode desencadear uma variabilidade na fase farmacocinética do medicamento no organismo. Existem dados contraditórios na literatura a respeito da autêntica interferência dos psoralenos presentes nos cítricos com os medicamentos (Ho et al, 2000).

O Comitê Assessor sobre Reações Adversas de Drogas – ADRAC da Austrália, 2002, acredita que a laranja de seville (laranja amarga - *Citrus aurantium*) seja a exceção e que estas interações não ocorrem com outras frutas cítricas.

A exposição do homem aos psoralenos é freqüente, podendo se realizar por contato com as plantas que os contem ou pelo uso de cosméticos e também por via oral através da ingestão das frutas e vegetal (Velásquez et al, 1988)

Alguns derivados cumarínicos possuem uma variedade de atividades biológicas, incluindo antibiótica, antiinflamatória, fitotóxica, inibição da germinação de sementes, inibição do crescimento de plantas e microorganismos, dermatites, e também podem causar danos ao fígado e carcinogêneses. Os psoralenos têm sido usados no tratamento de doenças da pele como psoríase, condições de despigmentação da pele (leprose, vitiligo e leucodermia), micoses fúngicas, dermatites polimorfas, urticária, verrugas e eczema (Ojala, 2001; Couvé – Privat et al., 2007).

### 1.2.5. DETERMINAÇÃO DE FLAVONOÍDES E PSORALENO

#### 1.2.5.1. Flavonóides

Técnicas cromatográficas como Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), tornaram-se bastante úteis na identificação e quantificação dos flavonóides presentes em matrizes biológicas, bem como uma ferramenta para identificar a adulteração de sucos (Havsteen, 2002; Ooghe, et al., 1994a).

Um exemplo de aplicação da CLAE-DAD é para a análise de falsificação de sucos de laranja. A identificação dos flavonóides pode ser realizada através da comparação do tempo de retenção das amostras com valores conhecidos (padrões) e com base no espectro gerado (Ooghe et al., 1994a; Rúbio; Escobar; Lima, 2002).

Dados da literatura apresentam trabalhos que aplicaram a técnica de CLAE – UV, para quantificar e identificar flavanonas. Os pesquisadores através desta técnica quantificaram e identificaram 6 flavonas polimetoxiladas (PMFs) as quais foram identificadas como sinensetina, quercetogetina, neobiletina, heptametoxiflavona, scutelareina e tangeritina. (Pupin; Dennis; Toledo, 1998a; Ooghe, et al., 1994b ).

Também por CLAE, Mouly; Gaydon; Auffray, (1998); Pupin; Dennis; Toledo, (1998a; 1998b) puderam separar simultaneamente e identificar flavanonas glicosiladas (FGs) (narirutina, naringina, hesperidina, neohesperidina, didimina, poncirina) figura 12, (Tabela 03) e as flavanonas sinensetina, hexamethoxiflavona, neobiletina, scuteilareina, heptmetoxiflavona e tangeritina presentes em sucos cítricos.

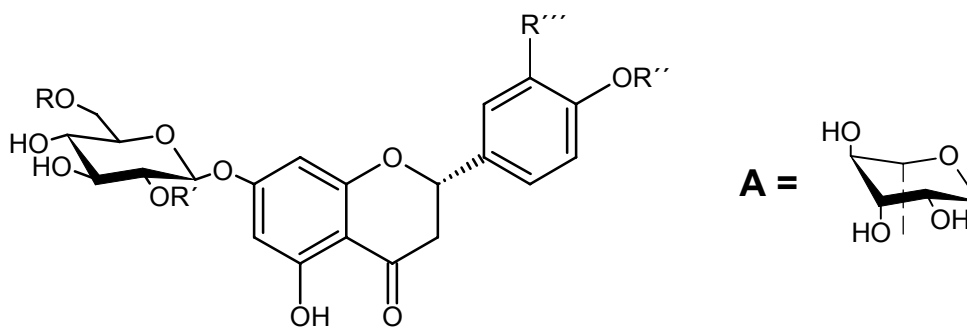


Figura 12 – Flavanonas glicosiladas (FGs). A. Rutinosídeo.

Tabela 03 – Flavanonas glicosiladas comumente encontradas em frutos cítricos

Nome	Abreviatura	R	R'	R''	R'''
<b>Narirutina</b>	NAT	A	H	H	H
<b>Naringina</b>	NAR	H	A	H	H
<b>Hesperidina</b>	HES	A	H	CH <sub>3</sub>	OH
<b>Neohesperidina</b>	NEH	H	A	CH <sub>3</sub>	OH
<b>Didimina</b>	DID	A	H	CH <sub>3</sub>	H
<b>Poncirina</b>	PON	H	A	CH <sub>3</sub>	H

Os perfis cromatográficos permitem a caracterização de sucos cítricos através de compostos considerados como marcadores polifenólicos, como exemplo a hesperidina e naringina.

A técnica de CLAE permitiu a caracterização de três tipos de sucos de laranja: espremido a mão, espremido a mão concentrado e congelado e de polpa lavado concentrado e congelado. Nestes, a narirutina e hesperidina foram usadas como marcadores flavonoídicos. As concentrações encontradas foram respectivamente, 16 -142 mg L<sup>-1</sup> e 104 - 537 mg L<sup>-1</sup> em sucos espremidos a mão e 62 - 84 mg L<sup>-1</sup> e 531 - 690 mg L<sup>-1</sup> para os sucos concentrados e congelados (após diluição ate 12° Brix). Enquanto que para os sucos concentrados e congelados de polpa lavada o nível de narirutina variou de 155 - 239 mg L<sup>-1</sup> e hesperidina de 1089 -1200 mg L<sup>-1</sup> (Pupin, 1998b).

A tabela 04, APÊNDICE A, apresenta algumas referências com respectivas aplicações do método CLAE em matrizes, cítricas (frutos, sucos, subprodutos, resíduos cítricos industriais), maçã, alface, alho, aipo, cebola, chicória, oxicoco,



tomilho, manjeriço, cebolinha, coentro, agrião, salsa, alecrim, artemísia, melissa, bebidas, cevada, framboesa, extratos vegetais e matriz biológica, urina.

Os alimentos são matrizes complexas, e os compostos vegetais de interesse geralmente estão presentes nestes em baixas concentrações, dificultando assim suas análises.

As estruturas dos flavonóides conferem estabilidade durante o processo de extração e purificação, devido à alta ressonância que conferem os anéis benzênicos. Estes podem ser extraídos inicialmente com solventes orgânicos sem perder suas propriedades estruturais e são muito estáveis ao calor e as reações de oxidação. Estas características possibilitam que estes compostos resistem também à maioria dos tratamentos térmicos que se empregam na produção dos alimentos (Moreno-Alvarez & Carvalho, 2004).

Existem diversos processos de extração dos flavonóides em matrizes cítricas. Emprega-se extração com solventes diversos: metanol, tetrahydroquinona (TBHQ), ácido acético, éter, clorofórmio, acetonitrila, etc. Além deste método pode-se empregar os processos de centrifugação com soluções de oxalato de amônio, sonicação, liofilização, evaporação, filtração, aquecimento, agitação (Calabrò et al., 2004; Manthey et al., 1999; Manthey; Grohmann, 2001; Manthey, 2004; Marcucci et al., 2001; Mouly; Gaydon; Auffray 1998; Nogata et al., 2006; Ting Wu; Guan; Jiannong, 2005).

### **1.2.5.2 Psoraleno**

Os psoralenos podem ser encontrados em todas as partes de uma planta, freqüentemente como misturas.

A utilização da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a um detector com arranjo de fotodiodo (CLAE-DAD) possibilita detectar em pouco tempo à presença de tipos diferentes de psoralenos em produtos vegetais, sem a necessidade de isolamento prévio (Singleton, et al., 2002).

O acoplamento de diferentes tipos de detectores à técnica de CLAE, tais como arranjo de diodos (CLAE-DAD) e à espectrometria de massa (CLAE-EM) produz informações estruturais importantes dos metabólitos (Ojala, 2001).

São vastos os estudos de psoralenos em plantas e alimentos. A determinação de psoralenos em sucos cítricos por CLAE-DAD e CLAE-EM permite a identificação e a caracterização dos produtos cítricos. A partir do registro destes compostos nos sucos cítricos torna-se possível verificar a autenticidade e possíveis adulterações destes produtos (Saita; Fujito; Mori, 2004).

Em estudos experimentais os 15 principais psoralenos presentes em óleos de citros foram separados e quantificados por CLAE-DAD através da comparação em termos de linearidade e dos limites de detecção dos compostos presentes (Frérot & Decorzant, 2004).

#### 1.2.6 ANÁLISE MULTIVARIADA

Uma característica interessante dos métodos modernos de análise em laboratórios químicos é o grande número de variáveis que podem ser medidas em uma única análise. De posse de tal quantidade de dados, há necessidade de ferramentas para tratá-los e extrair informações químicas mais significantes para discussão e interpretação dos mesmos (Miller & Miller, 2000). Muitas vezes a quantidade de dados envolve o risco que a caracterização dos distintos resultados sejam mascarados (disfarçados) (Reinhard et al., 2008).

Os avanços das técnicas analíticas proporcionaram a obtenção de um maior volume de resultados, que conseqüentemente, exigiram métodos mais complexos, para o tratamento dos dados experimentais (Beebe et al., 1998). Diferentes métodos são englobados pela quimiometria, tais como a otimização de experimentos, otimização e validação de métodos analíticos, planejamento de experimentos, ajuste de curva, processamentos de sinais, análise de fatores e a análise multivariada (Brown, 1995; Johnson, 2002; Neto et al., 2001). Análise multivariada surgiu como uma importante ferramenta permitindo a extração de uma quantidade maior de informações que dificilmente seria gerada empregando métodos univariados (Beebe et al., 1998).

De todos os ramos da Química clássica, a Química Analítica talvez tenha sido a mais afetada pela incorporação da instrumentação química associada a computadores (Miller & Miller, 2000). Por essa razão, esse ramo vem utilizando cada

vez mais a Quimiometria para desenvolver e avaliar métodos analíticos, assim como os seus resultados.

Entre os métodos utilizados, está a análise multivariada de dados, por sua versatilidade, uma vez que permite a realização de análises não destrutivas dos dados e estipula parâmetros para classificá-los. Outras áreas da Química, como a orgânica e a inorgânica, utilizam-se também dos métodos multivariados de análise acoplados à espectrometria para processar grande quantidade de dados, os quais antes só poderiam ser analisados qualitativamente. Sistemas químicos de reação de natureza multivariada dependentes muitas variáveis (pressão, pH, solvente, temperatura, etc), podem ser otimizados de forma sistemática por análise multivariada (Neto et al., 2001; 2006).

Os dados multivariados são, em geral, organizados em matrizes através de vetores em linhas e colunas, para facilitar a sua manipulação (Miller & Miller, 2000). A análise desses dados pode empregar técnicas multivariadas de dados divididas em uma classificação de variáveis dependentes ou método supervisionado, e variáveis independentes ou métodos não supervisionados, julgadas a partir da necessidade da pesquisa e a natureza dos dados:

1 - as variáveis podem ser divididas com base em alguma teoria sobre a sua dependência e independência;

2 - caso possa, definir quantas variáveis serão tratadas como dependentes e independentes em uma única análise;

3 - como são medidas as variáveis, sejam dependentes e independentes.

O método supervisionado pode ser definido como aquele no qual uma variável ou conjunto de variáveis é modelado como a variável dependente a ser predita ou explicada por outras variáveis conhecidas como independentes. A análise de regressão múltipla, análise de correspondência múltipla e análise discriminante são exemplos da técnica supracitada.

Em contrapartida, o método não supervisionado é aquele no qual nenhuma variável ou grupo de variáveis é definida como independente ou dependente, sendo que a análise pode ser feita simultaneamente entre todas as variáveis do conjunto. Técnicas multivariadas como a análise fatorial, análise de agrupamento, análise de

correlação canônica e análise de componentes principais são exemplos de técnicas interdependentes (Hair et al., 2006; Beebe et al., 1998).

A desvantagem principal dos métodos supervisionados é que estes são limitados a testar hipótese predita, ou seja, se tiver algum conhecimento prévio que possa conduzir a uma hipótese, esses métodos ajudarão a aceitá-la ou rejeitá-la. Nunca revelarão ao pesquisador o inesperado e nunca o conduzirão a hipóteses novas, ou a divisórias dos dados (Domany, 2003).

Por outro lado, uma alternativa são os métodos não supervisionados de análise. Estes visam à análise exploratória dos dados, introduzindo com pouco conhecimento ou polarização externa, “deixando os dados falarem”, isto é, explorando a estrutura dos dados na base das correlações e das similaridades que estão atuando nela (Domany, 2003).

#### 1.2.6.1 Processamento da matriz de dados

As técnicas de processamento procedem para o processo propriamente dito dos dados, possibilitando sua aplicação, melhorando os resultados ou evitando conclusões incorretas e absurdas.

Padronizar medidas é dá importância à *a priori* as variáveis em um problema, ou seja, após a padronização as variáveis têm igual grau de relevância. Ela é a primeira etapa do tratamento multivariado de dados

O nome em geral, escalonamento, é usado porque se referi a unidade da medida dos valores e a origem da escala, sendo aplicado nas variáveis ou objetos ou em ambos (Ottos, 1999).

As técnicas mais comuns de padronização são (Ottos, 1999):

(1) *Centralização na média* – a nova origem da escala de cada medida é centralizada na média das medidas pela **Equação 1**:

$$y_{ik} = x_{ik} - X_k \quad \text{(Equação 1)}$$

em que,  $y_{ik}$  é a coluna referência centrada,  $x_{ik}$  é linha de referência  $i$  e a coluna  $k$  antes de centrar e  $X_k$  é a média da coluna  $k$  igual soma de todos os valores dividido pela sua quantidade.

(2) *Escalonado* – é a medida da linha de referência dividida pelo desvio padrão da coluna de referência (**Equação 2**)

$$y_{ik} = x_{ik} / s_k \quad \text{(Equação 2)}$$

em que,  $s_k$

$$s_k = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_{ik} - X_k)^2}{n-1}}$$

(3) *Auto-escalado* – é a combinação das técnicas de centralização na média e o escalonado (**Equação 3**).

$$y_{ik} = (x_{ik} - X_k) / s_k \quad \text{(Equação 3)}$$

### 1.2.6.2 Análise de componentes principais

Entre os métodos quimiométricos mais utilizados para classificação exploratória de dados multivariados, está a análise de componentes principais (*Principal Component Analysis* - PCA). Esta, por sua vez, é uma técnica de análise multivariada de dados utilizada para redução de multidimensões, baseada na projeção linear do espaço original das variáveis  $X$ 's, que possui  $m$  dimensões em um subespaço de  $k$  dimensões ( $k < m$ ), sendo possível serem representadas em gráficos de baixa dimensionalidade, normalmente bi ou tridimensionais (Ferreira et al., 2002; Ferreira, et al., 1999; Sena et al., 2000).

Assim, a correlação entre as variáveis originais agrupa aquelas que são mais correlacionadas dão uma nova variável denominada de componente principal (*principal component* - PC). As novas variáveis representadas agora pelas PC's são mais informativas e em menor número do que os descritores originais.

Através da combinação das propriedades lineares dos descritores originais e por estarem mutuamente ortogonais, as componentes principais são definidas em ordem decrescente a partir da quantidade de variância que são capazes de explicar. Ou seja, a informação contida numa componente principal não está presente em outra, e a variância que elas descrevem é uma medida da quantidade de informação que as mesmas contêm (Ferreira et al., 1999). As relações entre os compostos não são alteradas nessa transformação. Como os novos eixos são ordenados por sua importância - a ordem de variância citada acima - pode-se visualizar a estrutura do conjunto de dados em gráficos de baixa dimensionalidade, como por exemplo, PC1 X PC2, PC1 X PC3, dentre outros.

#### 1.2.6.2.1 Descrição matemática das componentes principais

Matematicamente, a matriz de dados  $\mathbf{X}$  produto de duas matrizes menores - uma de escores  $\mathbf{T}$  (score) e a outra de pesos  $\mathbf{L}^T$  (*loading*), conforme a **(Equação 4)** (Ottos, 1999):

$$\mathbf{X} = \mathbf{T} \cdot \mathbf{L}^T \quad \text{(Equação 4)}$$

representada pela figura 13 em que  $\mathbf{X}$  é a matriz de dados originais constituídas por  $n$  linhas (objetos) e  $p$  colunas (variáveis);  $\mathbf{T}$  é a matriz de escores com  $n$  linhas e  $d$  colunas (número de PC's);  $\mathbf{L}^T$  é a matriz de pesos (*loading*) com  $d$  colunas e  $p$  linhas. Nesse contexto, os escores são as novas coordenadas de cada objeto no novo sistema de eixos e a informação de quanto cada descritor original contribui está contida nos pesos. Os escores  $\mathbf{T}$  expressam as relações entre os objetos enquanto os pesos  $\mathbf{L}^T$  mostram as relações entre as variáveis. As colunas em  $\mathbf{T}$  são vetores de escores e as linhas em  $\mathbf{L}^T$  são chamados de vetores de pesos. Ambos vetores são ortogonais, i. e.,  $\mathbf{p}_i^T \mathbf{p}_j = 0$  e  $\mathbf{t}_i^T \mathbf{t}_j = 0$ , para  $i \neq j$  (Ferreira et al., 1999; Ottos, 1999; Sagrado, 2002).

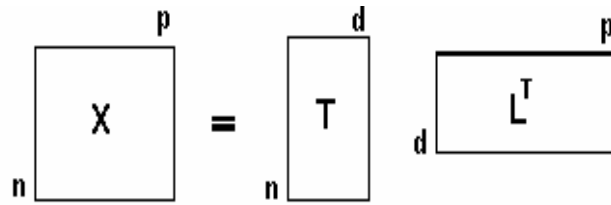


Figura 13 – A matriz original ( $X$ ) de tamanho  $n \times p$  é decomposta em duas matrizes reduzidas de tamanho  $n \times d$  e  $d \times p$ , sendo mais fácil de interpretar, compreender e conter toda informação relevante. As duas matrizes reduzidas da matriz original são chamadas de variáveis latentes.

### 1.2.6.3 Análise de agrupamento

Esta técnica não supervisionada é um procedimento usado para a divisão de um grupo dos objetos em classes, de modo que os objetos similares estejam na mesma classe. Assim como a PCA, é uma técnica exploratória de dados na qual o conjunto de objetos é agrupado matematicamente sem nenhuma suposição feita sobre as suas variáveis (Miller & Miller, 2000).

O agrupamento entre os objetos é feito procurando a similaridade entre eles junto ao espaço de variáveis, ou seja, o aglomerado deve então exibir elevada homogeneidade interna (dentro dos agrupamentos) e elevada heterogeneidade externa (entre os agrupamentos) (Miller & Miller, 2000; Beebe et al., 1998).

Existem muitas maneiras de procurar agrupamentos entre dois pontos no espaço  $n$ -dimensional com coordenadas  $(x_1, x_2, \dots, x_n)$  e  $(y_1, y_2, \dots, y_n)$ . Os três métodos que dominam as aplicações dessa técnica multivariada são: medidas correlacionais, medidas de distância e medidas de associações (Beebe et al., 1998).

Entre tais maneiras, a matemática mais simples consiste em agrupamentos entre os pontos mais próximos, usando a medida da distância entre eles. Na verdade, uma medida de dissimilaridade, em que os valores maiores denotam menor similaridade entre os objetos, pode ser convertida em medidas de similaridade mediante simples transformação ((Equação 5):

$$S_{ki} = 1 - \frac{d_{ki}}{d_{\max}} \quad \text{(Equação 5)}$$

em que,  $S_{ki}$  e  $d_{ki}$  são a similaridade e a distância entre os pontos  $k$  e  $i$ , respectivamente, e  $d_{max}$  é a distância entre os pontos mais afastado de todos os pontos. Deste modo, as similaridades expressam uma escala que vai de um (identidade) a zero (nenhuma identidade) (Miller & Miller, 2000).



## 1.3 OBJETIVOS

### 1.3.1 Objetivo geral

Este trabalho tem como objetivo desenvolver e adaptar métodos analíticos para a determinação de algumas flavanonas (Figura 14 – Tabela 05) e psoraleno (9-metoxifuranocumarina) (Figura 15) presentes em sucos de laranja de modo a contribuir na avaliação da qualidade e segurança destes produtos produzidos no país.

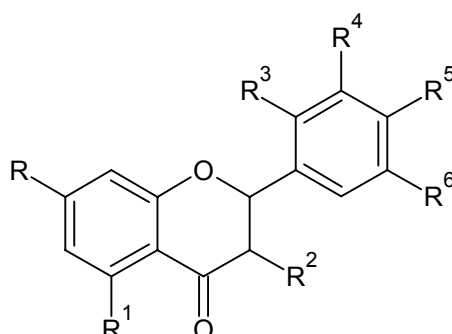
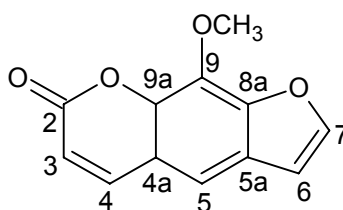


Figura 14 – Esqueleto básico das flavanonas

Tabela 05 – Flavanonas objeto do estudo

	<b>R</b>	<b>R<sub>1</sub></b>	<b>R<sub>2</sub></b>	<b>R<sub>3</sub></b>	<b>R<sub>4</sub></b>	<b>R<sub>5</sub></b>	<b>R<sub>6</sub></b>
<b>Naringina</b>	-Rut	-OH	-H	-H	-H	-OH	-H
<b>Naringenina</b>	-OH	-OH	-OH	-H	-H	-OH	-H
<b>Hesperidina</b>	-Rut	-OH	-H	-H	-OH	-OCH <sub>3</sub>	-H
<b>Poncirina</b>	-Rut	-OH	-H	-H	-H	-OCH <sub>3</sub>	-H



9-metoxifuranocumarina

Figura 15 – Estrutura da furanocumarina (Psoraleno)

### 1.3. 2 Objetivos específicos

- Preparar amostras a partir de diferentes matrizes (sucos obtidos por esmagamento a mão, sucos industriais, sucos obtidos em máquina tipo *fresh-in-squeeze* e sucos obtidos por práticas agrônômicas orgânicas);
- Quantificação dos flavonóides (hesperidina, naringina, poncirina e naringenina) presentes nos vários tipos de sucos de laranja;
- Comparação dos teores dos flavonóides encontrados nos vários tipos de sucos de laranja;
- Quantificação do psoraleno presente nos vários tipos de sucos de laranja;
- Avaliar os teores de psoraleno encontrados nos vários tipos de sucos de laranja.
- Utilização de técnicas e estatísticas multivariadas por meio de Análise de Componentes Principais (PCA) e análise de agrupamentos hierárquicos (HCA) a fim de avaliar tendências e discriminar amostras de sucos de laranja quanto a sua origem, tipos de tratamentos de extração e características químicas para os teores de flavonóides e psoraleno.

## 1.4 JUSTIFICATIVA

Os compostos fenólicos estão presentes nas plantas e alguns dos seus derivados são considerados benéficos para a saúde, entre estes destacam-se os flavonóides encontrados principalmente nas frutas cítricas que apresentam várias propriedades tais como antioxidantes, antiinflamatórias e antiviral (Havesten, 2002; Manthey, et al. 1999).

As frutas cítricas são as principais fontes de flavonóides e as mais consumidas em todo o mundo, sendo o Brasil o maior produtor deste tipo de fruta como também dos seus derivados, os sucos, e possui o maior parque citricultor. A ingestão diária destes compostos é bastante significativa através de sucos frescos (esmagados a mão) ou já elaborados por meios tecnológicos adequados, os sucos industrializados que estão disponíveis nas redes de supermercados de todos os

países. De acordo com dados de mercado, o consumo mundial de sucos cítricos é, em média, de 24 litros por habitante/ano.

O Regulamento Técnico Geral para fixação dos Padrões de Identidade e Qualidade para Polpa de Frutas do Ministério da Agricultura e do Abastecimento juntamente com os padrões de Comércio Exterior utilizam os índices: teores mínimos de ácido ascórbico e de sólidos solúveis totais (SST), de 25 mg% e de 10,5° Brix (a quantidade de sólidos solúveis presentes no suco, como, sacarose, frutose e glucose, respectivamente, além de uma relação SST/acidez total titulável (ATT), em g/100g de ácido cítrico anidro, mínimo de 7,0) como parâmetros para avaliar a qualidade dos sucos de laranja (Brasil, 2000). Contudo, os flavonóides, em especial a hesperidina por ser considerada como marcador flavonoídico em frutas cítricas, não é quantificada e identificada nos sucos de laranja.

A identificação e caracterização dos flavonóides em sucos cítricos e um prévio estabelecimento dos teores destes compostos, além de contribuir para a saúde, podem também valorizar os sucos produzidos na região podendo inclusive gerar informações através da elaboração de um selo com indicativos adicionais para a qualidade dos sucos produzidos na região. E através deste garantir valores confiáveis para serem utilizados como informações complementares nos rótulos dos produtos.

Um outro grupo de compostos fenólicos presentes nas várias espécies cítricas como laranja, tangerina, lima e limão são os psoralenos. Estes são constituintes comuns às espécies da família Rutaceae (Gray et al., 1978). Estas substâncias representam uma grande parte dos resíduos não voláteis dos óleos cítricos e a concentração destes varia de 1% nas laranjas doces até 10-15% no óleo de lima e limão. O psoraleno é utilizado para terapias de uso tópico ou oral da pele no tratamento de desordens tipo: vitiligo, psoríase, e micoses fúngicas, onde em concentrações terapêuticas apresenta efeitos benéficos, mas, de modo geral, a ingestão destes compostos através dos alimentos produzem efeitos deletérios para a saúde humana e os animais (Diawara et al., 1997a; Guo et al., 2000; Fukuda et al., 2000). Os psoralenos são considerados substâncias tóxicas com efeitos carcinogênicos e mutagênicos sobre às células animais (Dugo, et al., 1996)

De acordo com o Anexo II do Council Directive, 1988 (88/388/EEC) o limite geral permitido do uso de psoralenos nos alimentos e em bebidas não alcoólicas é de até 2mg/kg<sup>-1</sup>. Constantemente, o *Food and Drug Administration* (FDA) examina

os dados disponíveis sobre os efeitos destas substâncias para determinar como estas informações podem ser mais bem aproveitadas nos rótulos dos produtos que as contenham (Ellis et al., 1998). Assim, a quantificação e identificação do psoraleno em produtos cítricos principalmente nos sucos frescos e obtidos por esmagamento (SFOE), industrializados, obtidos em máquinas tipo *fresh-in-squeeze* e de cultivos em condições orgânicas poderão servir de parâmetros de segurança e confiabilidade para os usuários.

## CAPÍTULO 2

### 2 . PARTE EXPERIMENTAL

#### 2.1 MATERIAIS E EQUIPAMENTOS

##### 2.1.1 Materiais utilizados

Para as extrações líquido-líquido das flavanonas e do psoraleno foi construído dois sistemas em vidro com capacidade de 1000mL, cada, com a finalidade de viabilizar a operacionalização da metodologia das extrações. Na elaboração do sistema levou-se em consideração o princípio das diferenças de densidade dos solventes utilizados, acetato de etila (flavanonas) e diclorometano (psoraleno).

A preferência das flavanonas, hesperidina, naringina, naringenina e poncirina neste estudo, basearam-se nos teores destes compostos presentes nas frutas cítricas, principalmete nas espécies comumente utilizadas na obtenção dos sucos (*C. sinensis*, *C. reticulata*, *C. aurantium*). Enquanto que a escolha do psoraleno para os ensaios levou-se em consideração o fato de que este composto não possui relatos de seu conteúdo nos sucos cítricos produzidos no país e, portanto contribuir com informações consideradas relevantes para o segmento da citricultura brasileira.

Os padrões de hesperidina, naringina, naringenina, poncirina e psoraleno utilizados durante a investigação foram de marca Acros Organics, New Jersey, USA.

##### 2.1.2 Solventes utilizados

Os solventes orgânicos, acetato de etila e diclorometano utilizado nas extrações, foram de grau P. A como também os eluentes, metanol e ácido acético empregados em CLAE - DAD, de grau HPLC/Espectro UV - visível (J T Backer, USA). E a água ultra pura.

As soluções-padrão, assim como suas diluições, foram acondicionadas em frascos vedados com tampas de rosca, seladas com filme de PVC e protegidas da luz por folhas de papel alumínio. Estas soluções foram armazenadas sob refrigeração (4°C). Os padrões de flavanonas e psoraleno foram acondicionados em frasco protegido de luz e armazenados também sob refrigeração.

### 2.1.3 Equipamentos utilizados

Rota evaporador e banho-maria Fisaton, centrífuga Ependoff. A separação cromatográfica consistiu de uma bomba de solvente modelo SCL-10ADVP, equipado com um detector de UV-VIS SPD-M10A (Shimadzu) Corp., Kyoto, Japão. Sistema SIL-10AVP com loop. Utilizou-se de uma coluna Purospher STAR RP-18 Lichrocart com 55 X 4mm de diâmetro endcapped 3µm (Merck, Alemanha) e CLAE (Shimadzu), Corp. Kyoto, Japão. Degaseificador DGU-12AM, misturador FCV-10ALVP, detector com arranjo de diodos SPD-M20A, forno para coluna CTO-20ASVP e controlador de sistema SCL-10AVP (Kyoto, Japão), pré-coluna Supelco 4,0mm. Para a filtração das amostras empregou-se cartuchos com membranas Millipore com poros de 0,22 µm de diâmetro (SUPELCO, USA).

### 2.1.4 Coleta das amostras

Trinta e três (33) amostras de sucos de laranja industrial foram adquiridas nas cidades de Salvador e São Paulo, totalizando noventa e nove litros de sucos. Destes, 03 amostras eram de sucos obtidos a partir de frutas em condições de cultivo orgânico, conforme informações dos fabricantes. As seis (06) amostras de sucos de laranja espremidos a mão (SOE) foram preparados a partir da laranja Pêra (*Citrus sinensis*) e compradas em supermercados de Salvador. As três (03) amostras dos sucos obtidos através de máquinas tipo *fresh-in-squeeze* também foram de laranja Pêra e adquiridas em lojas de conveniências de postos de combustíveis da cidade de Salvador. As amostras de sucos foram codificadas, para preservar a identidade do fabricante. Não havia informação em nenhuma marca de suco quanto à espécie e/ou variedade cítrica utilizada no preparo do suco. No estudo foi utilizado um total de 42 amostras de sucos de laranja. O estado de São Paulo foi escolhido por ser este o principal produtor de citrus do país e deter uma variedade de indústrias de produção de sucos de laranja permitindo se trabalhar com um número razoável de diferentes marcas destes sucos. Figura 16.

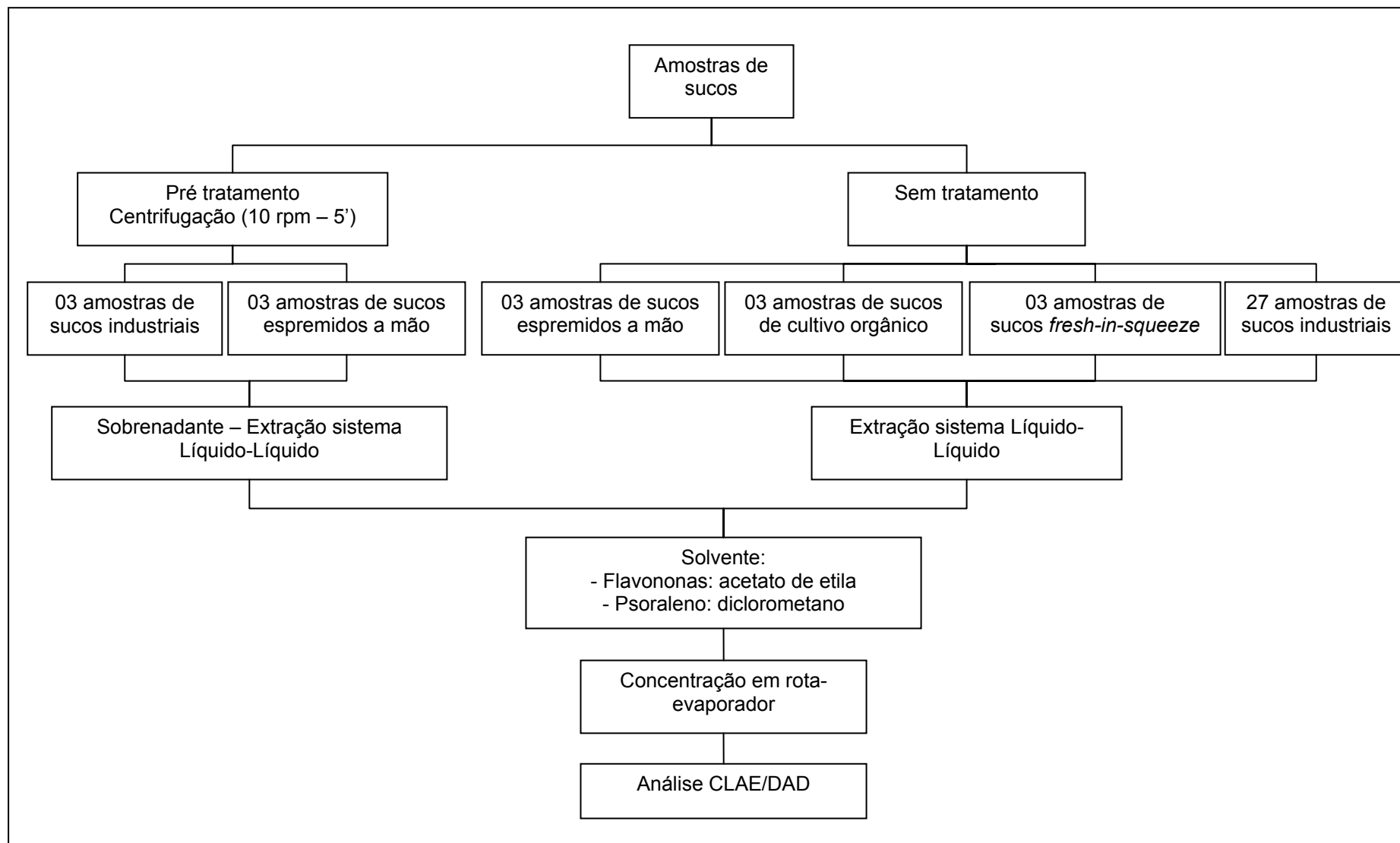


Figura 16 – Esquema do método de extração e análise CLAE/DAD em sucos de laranja.

## 2.2.1 Preparo das amostras

### 2.2.1.1 Etapa de pré - tratamento de algumas amostras

Foram escolhidas aleatoriamente 03 amostras de sucos laranja industrial e também 03 amostras de sucos espremidos a mão para proceder a um pré-tratamento por meio de processo de centrifugação, antes da implementação das extrações dos analitos. A principio executou-se várias tentativas com o intuito de verificar as melhores combinações entre o tempo e a velocidade em rotações por minuto (*rpm*) capaz de conseguir a separação de sobrenadante límpido e que demonstrasse visível afastamento entre os materiais particulados sólidos mais densos daqueles constituintes com densidades inferiores. Este equilíbrio foi estabelecido com o tempo de cinco (5) minutos e uma velocidade em rotações de 10 *rpm*. Após a etapa de centrifugação, recolheu-se o sobrenadante em balões com capacidade compatível ao volume da alíquota e submeteu-se a etapa da extração líquido – líquido. Procedimentos de pré-tratamentos, tais como filtração, hidrolise e centrifugação para amostras líquidas antes de serem submetidas a operações de extrações dos analitos são recomendados por pesquisadores, em especial para flavanonas ( Caristi et al.,2006; Gorinstein et al., 2006; Manach et al., 2003; Tura et al., 2002; Leuzzi et al., 2000; Ooghe et al., 1997) e psoralenos (Widmer, 2005; Manthey et al, 2005). Este tratamento prévio foi conduzido tanto para as extrações das flavanonas como também para o psoraleno e aplicou-se em seis amostras de sucos de laranja, industriais e espremidos a mão.

### 2.2.2. Processo de extração

A técnica utilizada para proceder às extrações dos analitos foi líquido – líquido, extração contínua, baseado-se nas diferenças de densidades existentes entre o solvente e a fase estacionária (amostra). Neste sistema o solvente foi passado continuamente e de forma dinâmica, através de (ou sobre) o líquido estacionário, a amostra. A seletividade do solvente e a constante passagem deste sobre a fase estacionária provocam o arraste dos analitos investigados e contidos na matriz. Considerou-se conclusivo o processo de extração após se estabelecer através



de parâmetros como o tempo e a velocidade de gotejamento do soluto concentrado que estes permanecessem constante por tempo maior ou igual a cinco minutos.

### **2.2.2.1 Otimização das extrações**

Estudos preliminares foram realizados visando escolher alguns parâmetros como tempo de extração e a relação matriz/solvente para permitir e determinar o melhor rendimento dos analitos (hesperidina, naringina, naringenina, poncirina e psoraleno) presentes na matriz (suco de laranja). Para tanto, diferentes proporções de alíquotas dos sucos e volumes de solventes, acetato de etila e diclorometano, para extrair respectivamente, as flavanonas e psoraleno, foram testados no sistema extrator, a exemplo, 250 g/ 300mL, 300 g/ 300mL, 400 g/ 300mL e 400 g/ 400 mL.

A melhor relação para a extração das flavanonas foi estabelecida como sendo 400 g de suco para 300 mL de solvente (acetato de etila). Enquanto que para a extração de psoraleno determinou-se uma proporção de 400 g de suco para 400 mL de solvente (diclorometano).

Quanto ao parâmetro tempo, foram efetuados alguns testes, com o intuito de escolher a melhor relação tempo e velocidade de extração capaz de arrastar quantidade de analitos da matriz. A princípio foram avaliados tempos de extrações inferiores aos 40'. Dentre os prazos avaliados se testou o tempo máximo de 30', para a extração e verificou que não havia um fluxo de gotejamento constante do soluto concentrado sobre o balão. Durante esta tentativa foi registrado que o gotejamento do soluto alcançava 25 gotas por minuto e não se mantinha constante por pelo menos 3' o que permitiu considerar que com esse tempo e velocidade de gotejamento tornava o procedimento insuficiente para que o solvente pudesse efetuar o arraste do analito na matriz.

Após vários ensaios, em que foram submetidas algumas alíquotas dos sucos, como tentativas preliminares de exaurir o máximo a matriz, instituiu-se a duração máxima para a conclusão da extração de 40 minutos, considerando como parâmetros o fluxo de gotejamento a partir da condensação dos vapores do líquido extrator no balão reservado para recolher o soluto concentrado. Ao alcançar o tempo de extração de 30' (controlado com auxílio de cronômetro) iniciava-se o controle do gotejamento do soluto concentrado sobre o balão a uma velocidade de 10 gotas por

minuto, fixava-se então um prazo mínimo de 5' para a relação velocidade/tempo de gotejamento em permanecer constante para poder considerar concluído o procedimento da extração, o que ocorria até no máximo aos 40'. Esgotado o prazo da extração os resíduos foram transferidos para balões volumétricos, diluídos em metanol e mantidos sob condições de refrigeração até as análises de quantificação.

Este procedimento de otimização das extrações foi padronizado para todas as amostras de sucos e aplicado tanto, para as flavanonas como para o psoraleno.

### **2.2.2.2 Extração das Flavanonas**

Para a extração das flavanonas (hesperidina, naringina, naringenina, poncirina) o solvente utilizado foi o acetato de etila que é mais leve do que a solução amostra (suco de laranja). O solvente é colocado no frasco e aquecido fazendo com que os vapores passem para o topo do tubo central e sejam condensados no condensador. As gotas do condensado caem através do funil de haste longa para o fundo da solução amostra. O processo é constante e de forma dinâmica, através do líquido estacionário (400 g amostra do suco de laranja contido no extrator), até atingir uma velocidade de gotejamento de 10 gotas por minuto, durante um prazo mínimo de 5', a contar a partir dos 30' iniciais da extração e finalizado ao completar o tempo máximo de 40', conforme critérios pré estabelecidos durante a etapa de otimização do processo de extração e que foi considerado satisfatório após os ensaio de padronização da extração. (Figura 17). Concluído o processo da extração o material foi concentrado a vácuo em rotaevaporador. Em seguida transferido para balões volumétricos, diluídos em metanol, filtrados e mantidos sob refrigeração até as análises por CLAE/DAD.

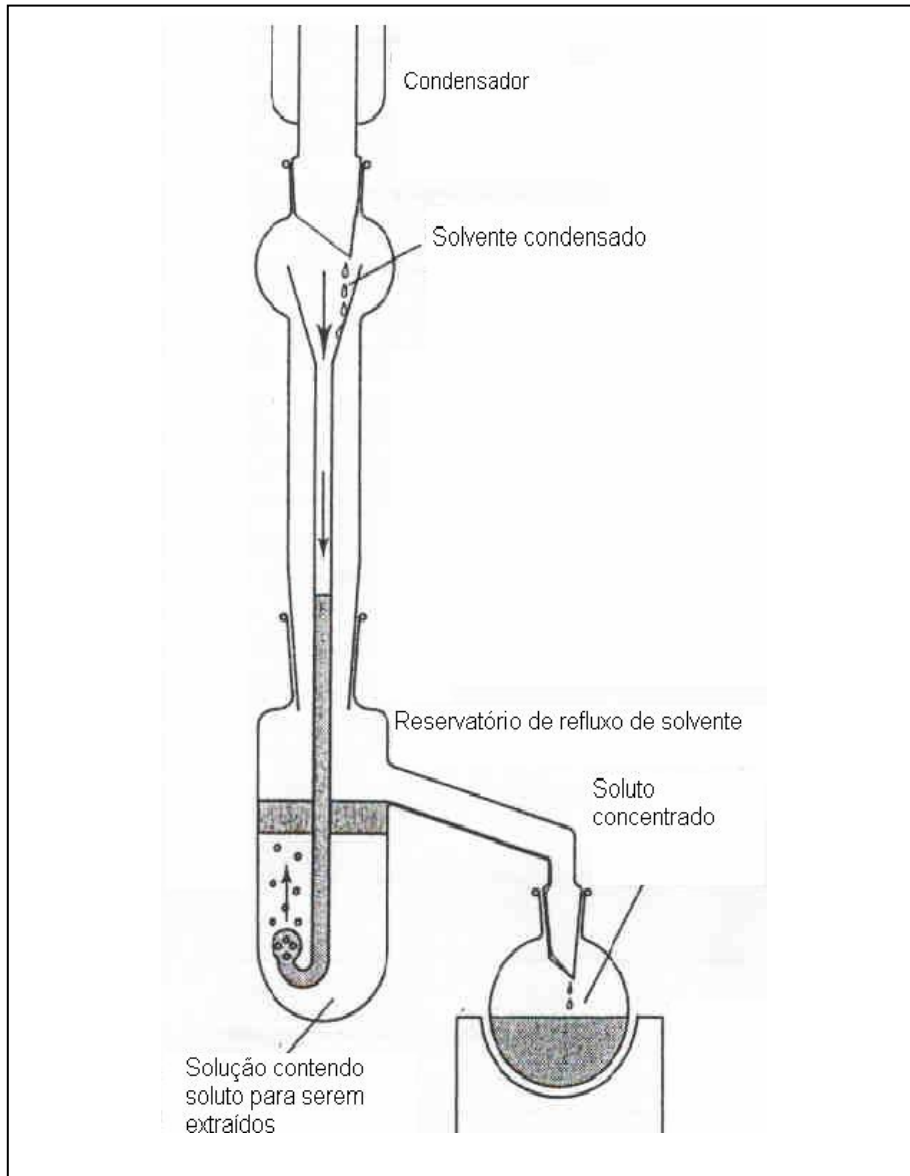


Figura 17 – Sistema extrator líquido-líquido para solventes menos denso que a amostra (flavanonas)

### 2.2.2.3 Extração de Psoraleno

Para a extração de psoraleno nos sucos de laranja, através da técnica de extração líquido-líquido, elegeu-se o diclorometano (400 mL) como solvente que é mais denso que a fase estacionária - suco de laranja (400 g). O solvente extrator é colocado no frasco de destilação e aquecido; os vapores passam para a parte superior do tubo diretamente na superfície da solução a ser extraída e, por serem mais densas, as gotículas atravessam a solução até o fundo, extraíndo na medida em que descem pelo tubo (Figura 18). A pressão hidrostática força o extrator através do braço lateral ir de volta para o frasco de destilação. A velocidade de gotejamento

foi de 10 gotas por minuto, durante um prazo mínimo de 5', a contar a partir dos 30' iniciais da extração e finalizado ao completar o tempo máximo de 40', conforme critérios pré estabelecidos durante a etapa de otimização do processo de extração e que foi considerado satisfatório após os ensaio de padronização da extração. Esgotado o tempo da extração as amostras foram concentradas a vácuo em rotaevaporador. Os resíduos foram transferidos para balões volumétricos, diluídos em metanol, filtrados e mantidos sob refrigeração até análises por CLAE/DAD.

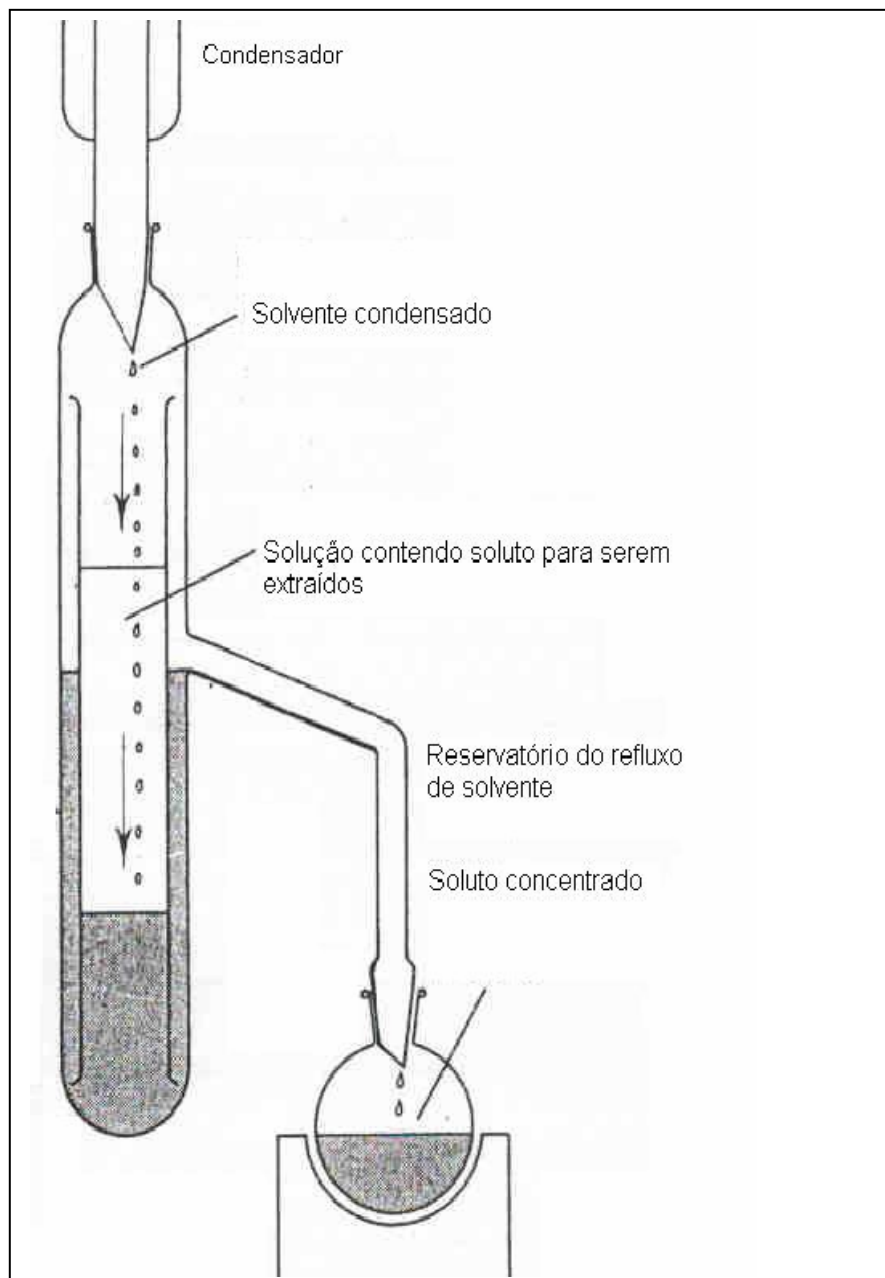


Figura 18 – Sistema Extrator Líquido-líquido para solventes mais densos que a amostra ( Psoraleno).

## 2.3. ANÁLISES QUANTITATIVAS

Visando avaliar os perfis cromatográficos em relação aos constituintes, hesperidina, naringina, naringenina, poncirina e psoraleno nas 42 amostras de sucos de laranja, industriais, espremidos a mão, obtidos através de máquina *fresh-in-squeeze* e submetidas a diferentes tratamentos extrativos, aplicou-se a técnica CLAE/DAD.

### 2.3.1 PARÂMETROS OPERACIONAIS DO EQUIPAMENTO

O sistema consistiu de uma bomba de solvente modelo SCL-10AVP, equipado com um detector UV – VIS SPD – M10A (Shimadzu) com sistema autoinjeter SIL – 10ADVP, no qual injetou-se 1 $\mu$ L da amostra.

### 2.3.2 CONSTRUÇÃO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO DAS FLAVANONAS E PSORALENO

As curvas de calibração das flavanonas e do psoraleno foram elaboradas usando uma solução padrão preparada a partir dos respectivos padrões e posteriores diluições para a obtenção de soluções com diferentes concentrações dos analitos.

A solução-padrão, assim como suas diluições, foram acondicionadas em frascos vedados com tampas de rosca e seladas com filme de PVC e protegidas da luz por folhas de alumínio. As soluções foram armazenadas sob refrigeração (4<sup>o</sup> C). Os padrões de flavanonas e psoralenos foram acondicionados em frasco protegido de luz e armazenados também sob refrigeração.

### 2.3.3 ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS

#### 2.3.3.1 Flavanonas

Para as análises das flavanonas necessitou-se de vários ensaios para buscar a melhor fase móvel e também o gradiente mais eficiente que permitisse a separação

dos analitos. Para tanto alguns testes foram aplicados com algumas fases móveis diferentes, a exemplo, ácido acético 2% e acetonitrila (v/v) (100:0 – 0 -15min, 100:30 – 15 - 45min, 70:30 – 45 - 50 min, 0:100 – 55 min) (Gorinstein, et al., 2006), ácido acético 0,01% e metanol (80/20 v/v) solvente A e 100% metanol, solvente B (Belajová et al.,). Com base em dados da literatura também foi possível escolher os tempos para as eluições dos analitos. Estes ensaios preliminares foram executados até obter-se o gradiente capaz de separar e tornar possível a identificação dos analitos através das características dos espectros resultantes e compará-los aos respectivos espectros dos padrões.

Ao fim destas e outras tentativas estabeleceu-se como fase móvel metanol: ácido acético 10% (v/v) (MeOH:CH<sub>3</sub>COOH). O fluxo foi de 0,3 mL/min. As autoinjeções foram em triplicatas e o comprimento de onda em 300 nm para hesperidina e 280 nm para as demais flavanonas. (Tabela 06)

Tabela 06 – Programa de gradiente de eluição para os solventes.

Concentração (metanol/ácido acético10%)	Tempo(minutos)
20:80	0
20:80	5
60:40	6
60:40	10
80:20	12
80:20	20
60:40	23
60:40	40
20:80	40
20:80	50

### 2.3.3.2 Psoraleno

Procedimentos investigativos com o intuito de obter a melhor fase móvel e também o gradiente mais eficiente que contribuísse para a separação do psoraleno foram testados. Utilizou-se como parâmetro modelo o gradiente linear usado por Lourenço, 2001, que foi metanol:água (40:60 → 80:20 em 20 min mantendo-se 80:20 até 25 minutos e de 80:20 → 40:60 até 27 minutos, terminando a análise em 30 minutos. Após estes ensaios foi escolhida a fase móvel metanol: água (MeOH:H<sub>2</sub>O). O fluxo foi de 0,3 mL/min. As autoinjeções foram em triplicatas e o comprimento de onda em 246 e 280 nm (Tabela 07).

Tabela 07 – Programa de gradiente de eluição para os solventes.

Concentração (metanol/água)	Tempo(minutos)
60:40	0
20:80	15
60:40	15
60:40	20

#### 2.4 VALIDAÇÃO DO PROCEDIMENTO ANALÍTICO.

O método analítico proposto neste trabalho para determinação das flavanonas bem como de psoraleno em amostras de sucos de laranja, foi validado a partir dos seguintes parâmetros: exatidão (através de ensaios de recuperação), especificidade/seletividade, linearidade, precisão (repetibilidade) e limites de detecção e quantificação.

#### 2.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.

Para as análises estatísticas dos dados foram realizadas análises exploratórias através de agrupamentos hierárquicos (HCA) e análises de componentes principais (PCA), empregando-se o programa Statistic 6.0® e unscramble 9,0. O nível de significância para rejeição da hipótese de nulidade foi sempre a 5%.

## CAPÍTULO 3

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 AVALIAÇÃO DAS EXTRAÇÕES

##### 3.1.1 Extrações das flavanonas

São diversos os métodos de extrações para os compostos flavonoídicos em sucos cítricos. Esta etapa de análise pode ser considerada como fator limitante e que geralmente permite obter resultados experimentais artificialmente baixos.

Rotineiramente amostras líquidas são filtradas e ou centrifugadas, em seguida injetadas no sistema para procedimento de separação (Gorinstein et al., 2006; Nogata et al., 2006; Manach et al., 2003; Coll et al., 1998; Bronner et al., 1995) ou mais freqüentemente os analitos são primeiro isolados usando extrações líquido-líquido (LLE). Neste tipo de extração o solvente mais aplicado é acetato de etila e éter dietil, contendo pequenas quantidades de ácidos.

A extração líquido-líquido é direcionada para isolar agliconas. Extrações com solventes de diferentes graus de polaridade para separação de flavanonas são habitualmente conduzidas, conforme dados obtidos da literatura dentre os quais, metanol (Ooghe et al., 1994; Bronner et al., 1995) água (Manach et al., 2003), acetato de etila (Wang, 1991) dimetilformamida (Ooghe et al., 1997) e em menor proporção propanol, dimetilformamida e combinações destes são freqüentemente usados (Kawaii et al., 2001). A adição de DMF também tem sido usada para melhorar a solubilidade da hesperidina, a principal flavanona da laranja.

Os procedimentos extrativos líquido-líquido demonstram vantagens em relação às injeções direta das amostras de sucos cítricos e posterior análises por CLAE/DAD (Tura et al., 2002). Algumas amostras são apenas filtradas e injetadas no sistema CLAE/DAD (Belajová et al., 2004). A aplicação de etapas como a liofilização e centrifugação auxiliam na obtenção dos resultados com melhores rendimentos. Leuzzi et al., (2000).



### 3.1.1.1 Determinação das flavanonas nas amostras de sucos de laranja

Pode-se verificar através da Tabela 08 que as concentrações das flavanonas avaliadas estão na faixa entre 0,010 e 245 mg 100 g<sup>-1</sup> de suco.

Tabela 08 – Valores encontrados para as flavanonas nas amostras de sucos de laranja. (mg 100 g<sup>-1</sup>).

AMOSTRAS	HESP	NARG	NARI	PONS
<sup>a</sup> S1	70 ± 1	0,170±0,006	0,016 ± 0,001	0,35 ± 0,02
<sup>a</sup> S2	70 ± 1	0,170±0,001	0,016 ± 0,003	0,35 ± 0,01
<sup>a</sup> S3	70 ± 2	0,170±0,001	0,016 ± 0,004	0,36 ± 0,01
<sup>b</sup> S4	46 ± 1	0,12 ± 0,01	0,020 ± 0,001	0,03 ± 0,01
<sup>b</sup> S5	46 ± 1	0,12 ± 0,01	0,020 ± 0,001	0,03 ± 0,01
<sup>b</sup> S6	46,3 ± 0,3	0,12 ± 0,01	0,020 ± 0,001	0,03 ± 0,01
<sup>c</sup> S7	109,0± 0,2	0,14± 0,03	0,080±0,001	0,21 ± 0,01
<sup>c</sup> S8	109,1±0,3	0,14 ± 0,02	0,080±0,004	0,21 ± 0,01
<sup>c</sup> S9	109,1±0,2	0,14 ± 0,03	0,083±0,005	0,21 ± 0,01
<sup>d</sup> S10	109,5 ± 0,2	0,12 ± 0,01	0,020 ± 0,001	0,17 ± 0,01
<sup>d</sup> S11	78 ± 3	0,12 ± 0,01	0,030 ± 0,001	0,20 ± 0,01
<sup>d</sup> S12	65 ± 1	0,12 ± 0,01	0,020± 0,001	0,20 ± 0,01
<sup>e</sup> S13	89 ± 1	0,12 ± 0,01	0,030 ± 0,001	0,10 ± 0,01
<sup>e</sup> S14	86 ± 2	0,12 ± 0,01	0,030 ± 0,001	0,12 ± 0,01
<sup>e</sup> S15	137 ± 2	0,12 ± 0,01	0,040 ± 0,001	0,20 ± 0,01
<sup>d</sup> S16	76 ± 1	0,12 ± 0,01	0,020 ± 0,001	0,14 ± 0,01
<sup>d</sup> S17	84 ± 1	0,12 ± 0,01	0,020 ± 0,001	0,10 ± 0,01
<sup>d</sup> S18	63 ± 1	0,12 ± 0,01	0,020 ± 0,001	0,10 ± 0,01
<sup>d</sup> S19	89 ± 1	0,12 ± 0,01	0,020 ± 0,001	0,11 ± 0,01
<sup>d</sup> S20	237 ± 1	0,12 ± 0,01	0,020 ± 0,002	0,20 ± 0,01
<sup>d</sup> S21	78 ± 1	0,12 ± 0,01	0,020 ± 0,001	0,10 ± 0,01
<sup>d</sup> S22	53,07 ± 0,04	0,12 ± 0,01	0,020 ± 0,002	0,010 ± 0,001
<sup>d</sup> S23	59 ± 3	0,12 ± 0,01	0,020 ± 0,002	0,11 ± 0,01
<sup>d</sup> S24	33 ± 1	0,12 ± 0,01	0,020 ± 0,001	0,11 ± 0,01
<sup>d</sup> S25	52 ± 1	0,12 ± 0,01	0,020 ± 0,001	0,07 ± 0,01
<sup>d</sup> S26	18,8 ± 0,2	0,12 ± 0,01	0,010 ± 0,001	0,12 ± 0,01
<sup>d</sup> S27	20 ± 1	0,12 ± 0,01	0,020 ± 0,001	0,10 ± 0,01
<sup>d</sup> S28	45,8 ± 0,4	0,12 ± 0,01	0,030 ± 0,001	0,10 ± 0,01
<sup>d</sup> S29	107,1 ± 0,4	0,12 ± 0,01	0,030 ± 0,001	0,12 ± 0,01
<sup>d</sup> S30	67,2 ± 2,0	0,12 ± 0,01	0,020 ± 0,001	0,16 ± 0,01
<sup>d</sup> S31	139 ± 1	0,12 ± 0,01	0,010 ± 0,001	0,15 ± 0,01
<sup>d</sup> S32	47 ± 1	0,12 ± 0,01	0,010 ± 0,001	0,10 ± 0,01
<sup>d</sup> S33	75,0 ± 0,1	0,12 ± 0,01	0,020 ± 0,001	0,010 ± 0,001
<sup>d</sup> S34	90 ± 1	0,12 ± 0,01	0,020 ± 0,001	0,10 ± 0,01
<sup>d</sup> S35	100,2 ± 0,3	0,12 ± 0,01	0,030 ± 0,001	0,20 ± 0,01
<sup>d</sup> S36	106 ± 2	0,12 ± 0,01	0,020 ± 0,001	0,11 ± 0,01
<sup>d</sup> S37	245 ± 14	0,12 ± 0,01	0,020 ± 0,001	0,20 ± 0,01
<sup>d</sup> S38	109 ± 1	0,12 ± 0,01	0,020 ± 0,001	0,15 ± 0,01
<sup>d</sup> S39	108 ± 1	0,12 ± 0,01	0,020 ± 0,001	0,20 ± 0,01
<sup>f</sup> S40	39 ± 2	0,106±0,002	0,011 ± 0,001	0,06 ± 0,02
<sup>f</sup> S41	38 ± 2	0,105±0,002	0,011 ± 0,001	0,06 ± 0,02
<sup>f</sup> S42	39 ± 2	0,105±0,003	0,014 ± 0,002	0,06 ± 0,01
<b>Médio</b>	<b>80</b>	<b>0,124</b>	<b>0,025</b>	<b>0,139</b>
<b>Mínimo</b>	<b>20</b>	<b>0,105</b>	<b>0,010</b>	<b>0,01</b>
<b>Máximo</b>	<b>245</b>	<b>0,170</b>	<b>0,083</b>	<b>0,36</b>

HES = hesperidina, NARG = naringenina, NARI = naringina, PONS = poncirina. <sup>a</sup>. suco espremido a mão e centrifugado; <sup>b</sup>.suco espremido a mão; <sup>c</sup>.suco industrial e centrifugado; <sup>d</sup>. suco industrial ; <sup>e</sup>. suco obtido em condições orgânicas; <sup>f</sup>. suco obtido em máquina *fresh-in-squeeze*.

A hesperidina, naringenina, naringina e poncirina apresentam concentrações nas faixas médias, (mínima, e máxima) de 80 e (20 - 245), 0,124 e (0,105 - 0,170), 0,025 (0,010 - 0,083), 0,139 e (0,01 - 0,36) mg100 g<sup>-1</sup>de suco, respectivamente.

Nas análises dos sucos de laranja espremidos a mão (SOE) as amostras, (S1; S2 e S3) que foram submetidas ao processo de centrifugação antes da extração líquido-líquido apresentaram diferença nas concentrações (70 mg 100 g<sup>-1</sup>) em todas as amostras avaliadas, quando comparadas ao mesmo tipo de suco, porém não centrifugado (S4; S5; S6) nos quais detectaram-se concentrações médias de 46,1 mg 100 g<sup>-1</sup>.

Verifica-se que a concentração média de hesperidina encontrada nestas amostras (58,15 mg 100 g<sup>-1</sup>) é 1,5 vezes superior ao valor máximo (39,20 mg 100 g<sup>-1</sup>) desta flavanona detectado pelo banco de dados dos Estados Unidos (2006; Scalbert, 2000). Voldrich et al., (2001) analisando sucos de laranja 100% puro durante o período de 1996 a 2001, quantificaram valores entre 287e 534 mg/L de hesperidina. Estes achados sugerem que o tratamento prévio de centrifugação influência nas extrações das flavanonas presentes nos sucos de laranja. E que a eficiência da extração pode exigir estágios adicionais durante o processo assim, a extração de flavanonas em sucos de laranja deve ser otimizada, uma opção é incluir a etapa da centrifugação. Trabalhos envolvendo análises de flavonóides em *citrus* e os quais buscavam informações qualitativas relatam que os rendimentos da extração podem ser influenciados por fatores tais como: solvente, temperatura, número de extrações e o processo pelo qual foi submetido. Inclusive durante a etapa de filtração, os meios filtrantes usados podem resultar em valores artificialmente baixos, devido às variações nos diâmetros de aberturas dos poros principalmente, para as flavanonas glicosilados. (Bronner, 1995).

A concentração máxima 245 mg 100 g<sup>-1</sup>(mínimo de 20 mg 100 g<sup>-1</sup>) de hesperidina encontrado para os sucos industriais é de 7,5 vezes maior em relação ao valor máximo (32,59 mg 100 g<sup>-1</sup>) desse tipo de suco catalogado no banco de dados dos Estados Unidos. A concentração média (80 mg 100 g<sup>-1</sup>) registrado nos sucos analisados foi aproximadamente 2,5 vezes superior à quantidade máxima encontrada nestes mesmos tipos de sucos de acordo os dados dos Estados Unidos (2006) e apresentou diferenças significantes quando comparada às concentrações encontradas por Leuzzi et al., (2000) que foi em média de 66,5 mg/mL para os sucos fortes obtidos por segunda pressão e de 51,3 mg/mL nos sucos concentrados.

Não houve diferença significativa nas concentrações de hesperidina entre os sucos industriais e as amostras (S7; S8 e S9) deste tipo de suco quando submetidas ao processo de centrifugação prévia antes da extração líquido-líquido onde se utilizou o acetato de etila como líquido extrator. Porém, a concentração média ( $109 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$ ) destas amostras foram superiores as encontradas na literatura, quando procedimentos de análises semelhantes foram aplicados e nos quais detectam-se concentrações na faixa de  $37,5 - 76,1 \text{ mg/mL}$  em sucos obtido por segunda pressão e de  $47,0 - 61,0 \text{ mg/mL}$  para os sucos concentrados. (Leuzzi, et al., 2000; Bronner, 1995; Desidério, 2005; Vanamala, 2006). Mouly, 1998, também submeteu os sucos industriais de laranja *Citrus sinensis*, à centrifugação prévia e encontrou valor médio para as quatro amostras analisadas de  $475 \text{ mg/mL}$ .

Pode-se observar também que a concentração máxima de hesperidina,  $245 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$  (amostra S37) achados em sucos industrializados foi 3,5 vezes superior à concentração máxima ( $70,0 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$ ) dos sucos obtidos por expressão a mão. Estes resultados podem ter sido consequência do processo de obtenção dos sucos nas indústrias, pois, segundo os dados da literatura, alguns flavonóides durante o processamento dos sucos, se depositam nos trocadores de calor, principalmente nos evaporadores dos extratores, reduzindo sua capacidade e aumentando os teores de alguns constituintes no suco, os quais geralmente estão presentes na casca e/ ou albedo do fruto, como exemplo deste fenômeno, a hesperidina (Yamanaka, 2005). Os diferentes graus e intensidades de prensagem do fruto também interferem nos teores dos flavonóides nos sucos cítricos. (Tura, 2002).

A concentração média  $0,124 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$  (mínima de  $0,105$  e máxima  $0,170 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$ ) de naringenina ficaram abaixo dos dados da literatura ( $2.10$  e  $0.00 - 6.37$ ;  $3.27$  e  $2.56 - 4.38 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$ ) (Justesen, 1998; USDA, 2006) tanto para os sucos espremidos a mãos como para os industriais. As maiores concentrações,  $0,160$ ,  $0,170 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$  (amostras, S1; S2 e S3) foram achadas nos sucos espremidos a mão e centrifugados, enquanto os menores valores,  $0,105$ ,  $0,106 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$  foram detectados nas amostras, S40; S41 e S42 de sucos obtidos em máquina tipo *fresh-in-squeeze*.

Dados da literatura para sucos de laranja espremidos a mão mostram concentração máxima desta flavanona de  $41,9 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$  (Goristein, 2006) e quando preparado a partir de frutos *Citrus sinensis* relatam uma concentração

máxima de 6,37 mg/mL (Sanchez-Moreno, 2003). A ingestão de naringenina através do suco de laranja na Dinamarca está estimada em 0,4 mg/dia (Justesen, 1997).

Para naringina os valores médios apresentados, bem como as faixas das concentrações quantificadas foram respectivamente: 0,025 e 0,010 – 0,083 mg 100 g<sup>-1</sup>. As maiores concentrações (0,083; 0,080; 0,080 mg 100 g<sup>-1</sup>) de naringina foram encontradas nas amostras de suco industrial submetidas ao processo de centrifugação (amostras, S9; S8; S7) e os menores valores foram para as amostras, S26; S31; S32; S40; S41 e S2 (0,01 mg 100 g<sup>-1</sup>). Não houve diferença nos resultados entre os sucos somente espremidos a mão, espremidos a mão e centrifugados, industrial e em máquina tipo, *fresh-in-squeeze*. Há registros de dados na literatura para sucos industriais, com concentrações médias, mínima e máxima de 2,13 e (0,20 - 7,54) mg/100mL, respectivamente, porém não existe esclarecimento quanto à espécie cítrica utilizada. (Theodoridis, 2001; Kanaze, 2003; Belajová, 2004). Em sucos espremidos a mão de *C. bergamia* verifica-se relatos de concentrações médias, mínima e máxima de 106 e (68 – 147) mg/L (Cautela, 2008). Já em sucos de *C. sinensis* e obtidos através de máquina tipo *fresh-in-squeeze* são relatados uma concentração média de 2,23 mg/mL (Kelebek, 2009).

As concentrações médias, encontradas para poncirina são de 0,139 e (mínimo de 0,01 – máximo de 0,36) mg 100 g<sup>-1</sup>. As quantidades mais elevadas (0,36; 0,21 mg 100 g<sup>-1</sup>) foram achadas nos sucos espremidos a mão e centrifugados e nos sucos industriais e centrifugados, (amostras, S3 e S9). Enquanto que os mais baixos teores foram das amostras, S22 e S33, com 0,01 mg 100 g<sup>-1</sup>, também de origem industrial.

Existem poucos relatos na literatura a respeito das concentrações desta flavanona em sucos cítricos. Em sucos de toranja obtidos por expressão a mão foi achados valores, médios de 1,04 mg/100mL (mínimo 0,49 - máximo 1,59 mg/100mL) (Kawaii, et al., 1999). Em marcas de sucos industriais, Ross et al., (2000) detectou por CLAE níveis entre 0,12 – 2,36 mg/mL, com valor médio de 0,95 mg/mL. Já em sucos de laranja não foi quantificada presença mínima desta flavanona (Kawaii, 1999; Mouly, 1998).

As amostras, S13; S14 e S15 foram de sucos industriais originários de cultivo orgânico, conforme registros nas embalagens. A concentração média de hesperidina (104 mg 100 g<sup>-1</sup>) foi superior a média geral dos 39 sucos analisados (80 mg 100 g<sup>-1</sup>)

e o valor mínimo ( $86 \text{ mg}100 \text{ g}^{-1}$ ) superior 1,2 vezes as concentrações máximas ( $70 \text{ mg} 100 \text{ g}^{-1}$ ) encontradas para os sucos obtidos por esmagamento a mão.

Manach (2003) detectou hesperidina e narirutina com concentrações de 444 mg/L e 96 mg/L, respectivamente, em sucos de laranja industrial com práticas agrônômicas semelhantes. Quanto à flavanonas, naringina, naringenina e poncirina não houve diferenças entre este suco e os demais. O teor mais elevado de hesperidina justifica-se por ser este o componente mais abundante na laranja doce (Kawaii, et al., 1999; Justesen, 1997).

Os dados das concentrações de flavonóides em frutas cítricas são muito heterogêneos devido ao emprego de diferentes técnicas e diferentes unidades de medidas usadas pelos vários autores, mg  $100 \text{ g}^{-1}$  de suco; mg/100mg de suco liofilizado; mg/100mL de suco (Kawaii 1999); mg/100 mg do produto fresco (Peterson, Beecher, 2006); mg/L de suco (Manach, 2003).

O *Departamento da Agricultura dos Estados Unidos* através de seu banco de dados expressa os resultados das concentrações dos vários constituintes presentes em sucos, inclusive os flavonóides na razão de miligrama por cem gramas (mg/100g). Neste a eriocitrina, hesperidina e naringenina, são considerados as principais flavanonas presentes nos sucos de laranja.

Comparações de dados entre os vários resultados obtidos pelos autores podem ser dificultadas devido às variações biológicas normais relacionadas a cultivar, localização de cultivo, sazonalidade, ambiente, práticas agrônômicas, processos de estocagem. Os procedimentos aplicados durante o preparo dos sucos também causam impacto sobre os níveis dos flavonóides nos sucos cítricos. Processos que combinam tratamentos com alta pressão, tratamento por aquecimento e tratamentos em períodos variáveis durante o processamento dos sucos alteram a qualidade do suco e a quantidade de naringenina e hesperidina presentes (Sánchez-Moreno, 2003). As técnicas de prensagem podem facilitar ou dificultar a solubilização resultando concentrações diferentes destes compostos nos sucos (Tura; Robards, 2002).

Muitos, se não todos destes compostos bioativos caracterizam-se pelos sabores, doce, amargos, azedos, ou adstringentes, podendo a depender destes, levar a rejeição por parte dos consumidores, como resultado, as indústrias de alimentos rotineiramente removem estes compostos durante o processamento (Drewnoswsky & Gomes-Carneros, 2000).

Em estudos de recuperação de constituintes flavonóidicos na indústria, após o processo de concentração dos sucos, foi observado que havia uma redução do teor da hesperidina em relação a outros constituintes presentes. Contudo, nos resíduos sólidos, esta flavanona estava presente como flavonóide prevalente com concentrações de até três vezes mais elevado do que outros flavonóides também analisados. As flavanonas glicosiladas encontram-se predominantemente concentradas no albedo e na pele, (casca) razão provável de predominância nos resíduos sólidos (Coll et al., 1998).

### **3.1.1.2 Fase móvel nas análises das flavanonas**

Gradientes de eluição têm sido freqüentemente usados para obter perfis de separação de flavonóides (Martinez – Valverde et al., 2000). Estes gradientes são quase sempre efetuados com a aplicação de solventes binários. Sob condições em fase reversa os compostos polares são geralmente eluídos primeiro. Desta maneira diglicosídeos, monoglicosídeos, precedem as agliconas. A fase móvel utilizada neste estudo, metanol - ácido acético 10% apresentou resultados eficientes ao separar as flavanonas hesperidina, naringina, naringenina e poncirina, resultados compatíveis aos que foram achados por Deslauriersrs, 2000.

Quando o principal objetivo do estudo é determinar os principais flavonóides na amostra o tempo da corrida recomendada é de meia hora à uma hora, para separação entre cinco e 10 componentes, Fabre & Rustan, 2001. Neste estudo o tempo máximo disponibilizado para as análises destas flavanonas foi de 50 minutos. As flavanonas possuem absorção máxima na faixa de comprimento de onda de 280 – 290 nm. A otimização das condições cromatográficas foi requerida para alcançar uma separação eficiente das quatro flavanonas presentes nos sucos de laranja.

### 3.1.1.3 Perfil cromatográfico das flavanonas

Inicialmente as condições do CLAE foram otimizadas para separação das flavanonas. A ordem de eluição das flavanonas foi confirmada pelas análises das soluções padrões individuais.

A separação das flavanonas ocorreu com prévia programação da corrida por um tempo máximo de 50 minutos, sob condições descritas, inclusive com o equilíbrio da coluna. Os espectros UV das flavanonas foram registrados na faixa de 280 e 300 nm via detector de arranjo de diodos. O comprimento de onda para naringina, poncirina e naringenina foi 280 nm e para a hesperidina 300 nm.

A identificação das flavanonas foi realizada pela caracterização dos picos da amostra em termos de tempo de retenção (RT), comparado com aqueles das soluções padrões. A pureza das substâncias examinadas pôde ser checada pelo exame dos respectivos espectros dos picos no início e término da eluição do pico. Todas as concentrações encontradas para as flavanonas estão acima dos Limites de Detecção e Quantificação.

Os espectros UV/DAD característicos de naringina, hesperidina, poncirina e naringenina são mostrados na figura 19 e apresentam os respectivos perfis cromatográficos destes padrões.

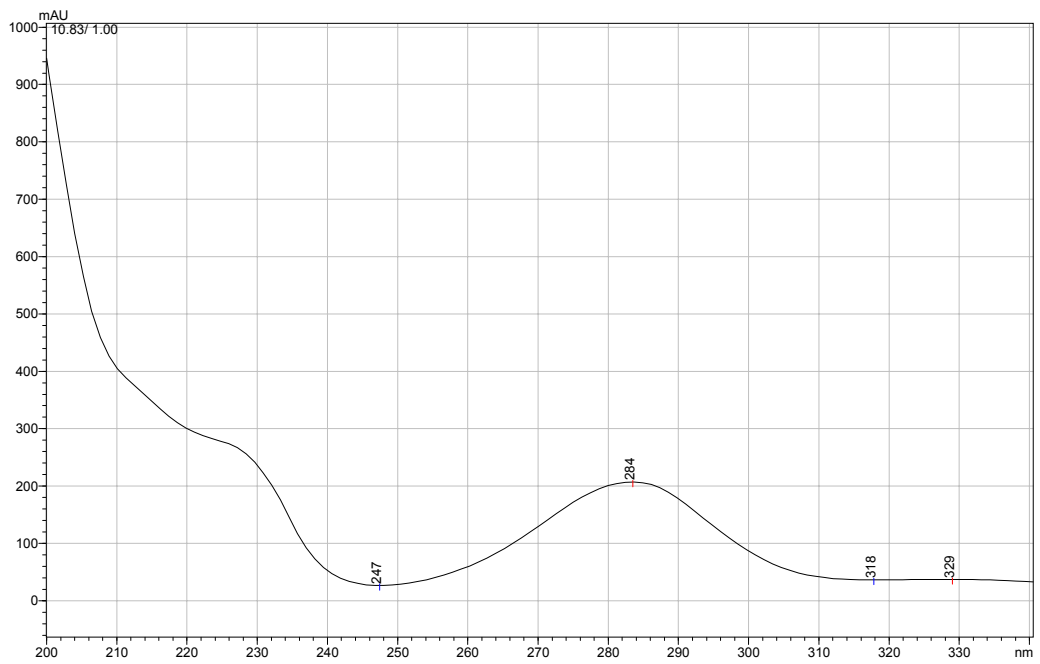
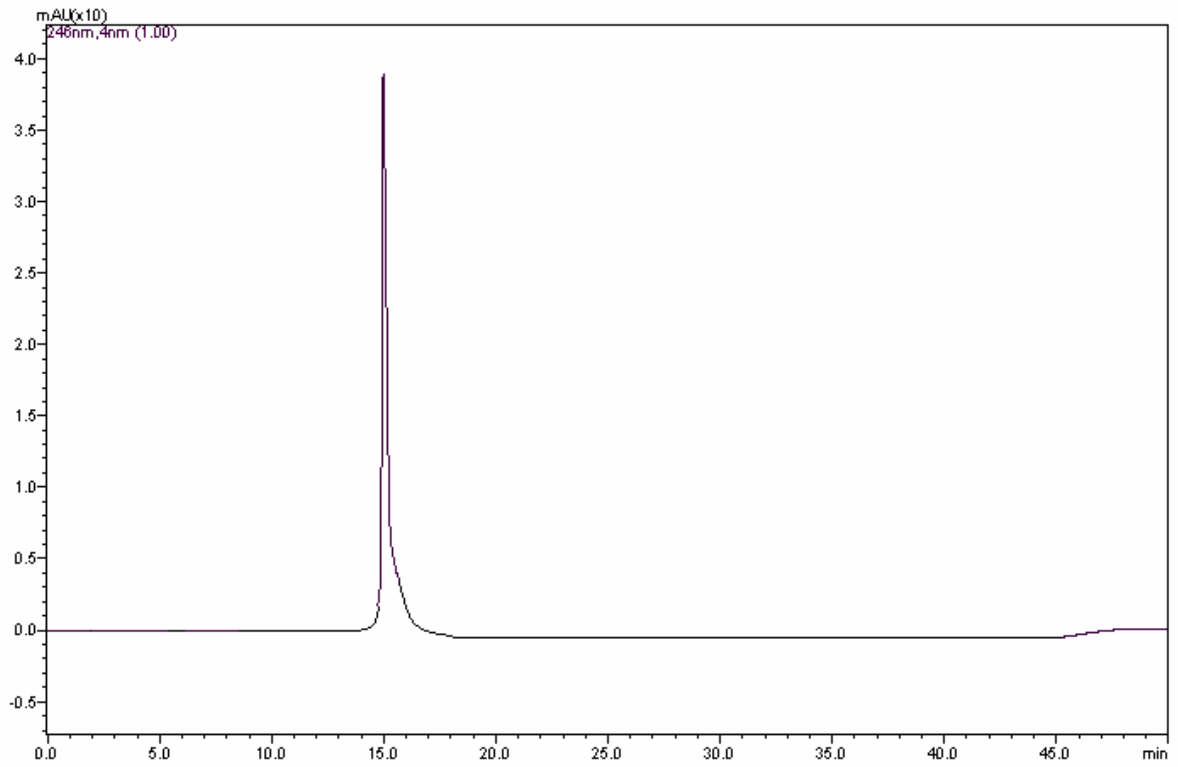
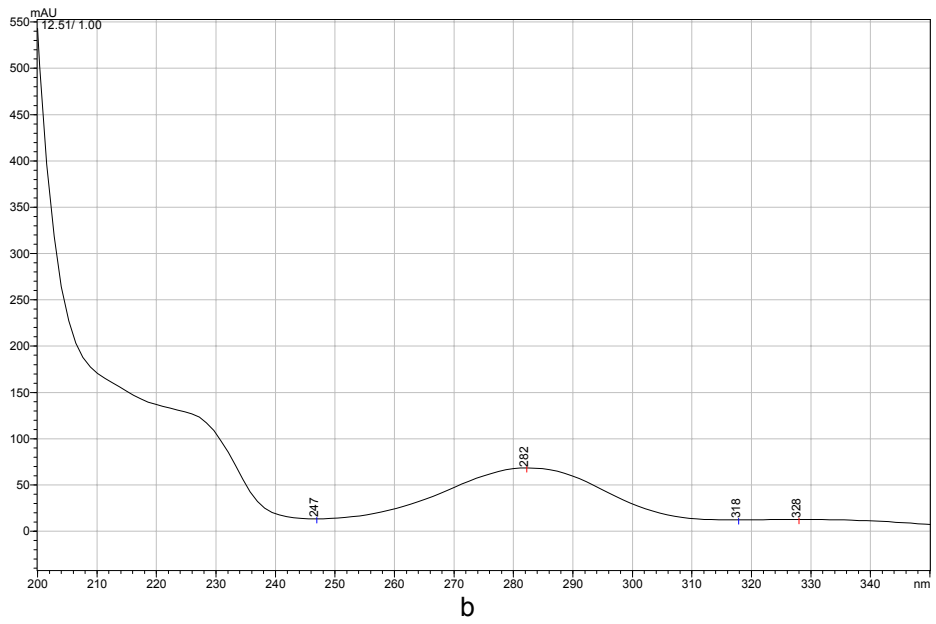
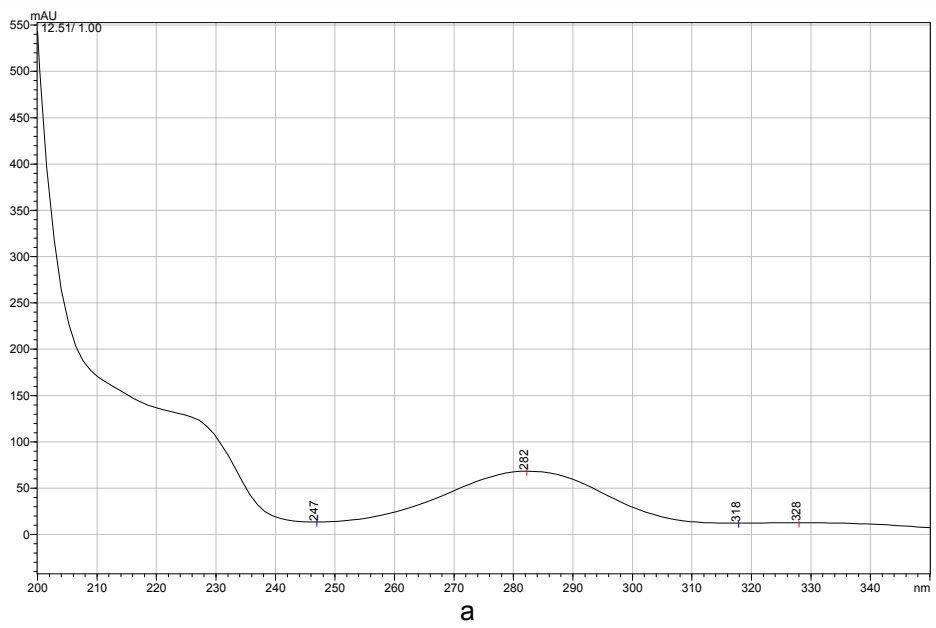
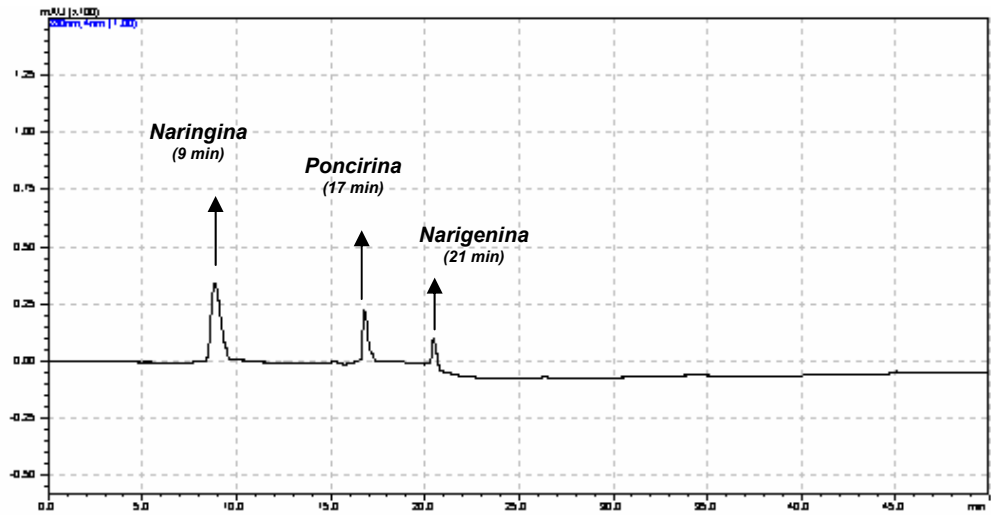


Figura 19a – Perfil cromatográfico do padrão de hesperidina e espectro UV/DAD.





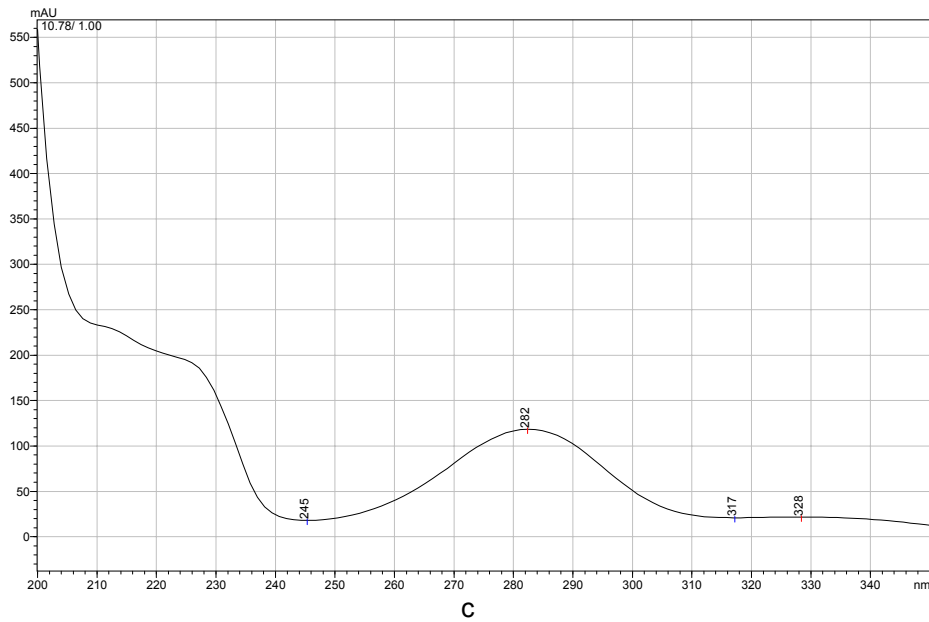


Figura 19b – Perfil cromatográfico dos padrões de naringina (a), poncirina (b) e naringinina(c) e seus respectivos espectros UV/DAD.

As flavanonas presentes nas amostras de sucos de laranja puderam ser identificadas fazendo-se a comparação dos tempos de retenção (TR) dos analitos com os dados de UV e os TR dos respectivos padrões. O cromatograma da amostra testemunha apresenta quatro picos correspondentes a naringina (TR 9'), hesperidina (TR 15'), poncirina (TR 17') e naringinina (TR 22'). Figura 20.

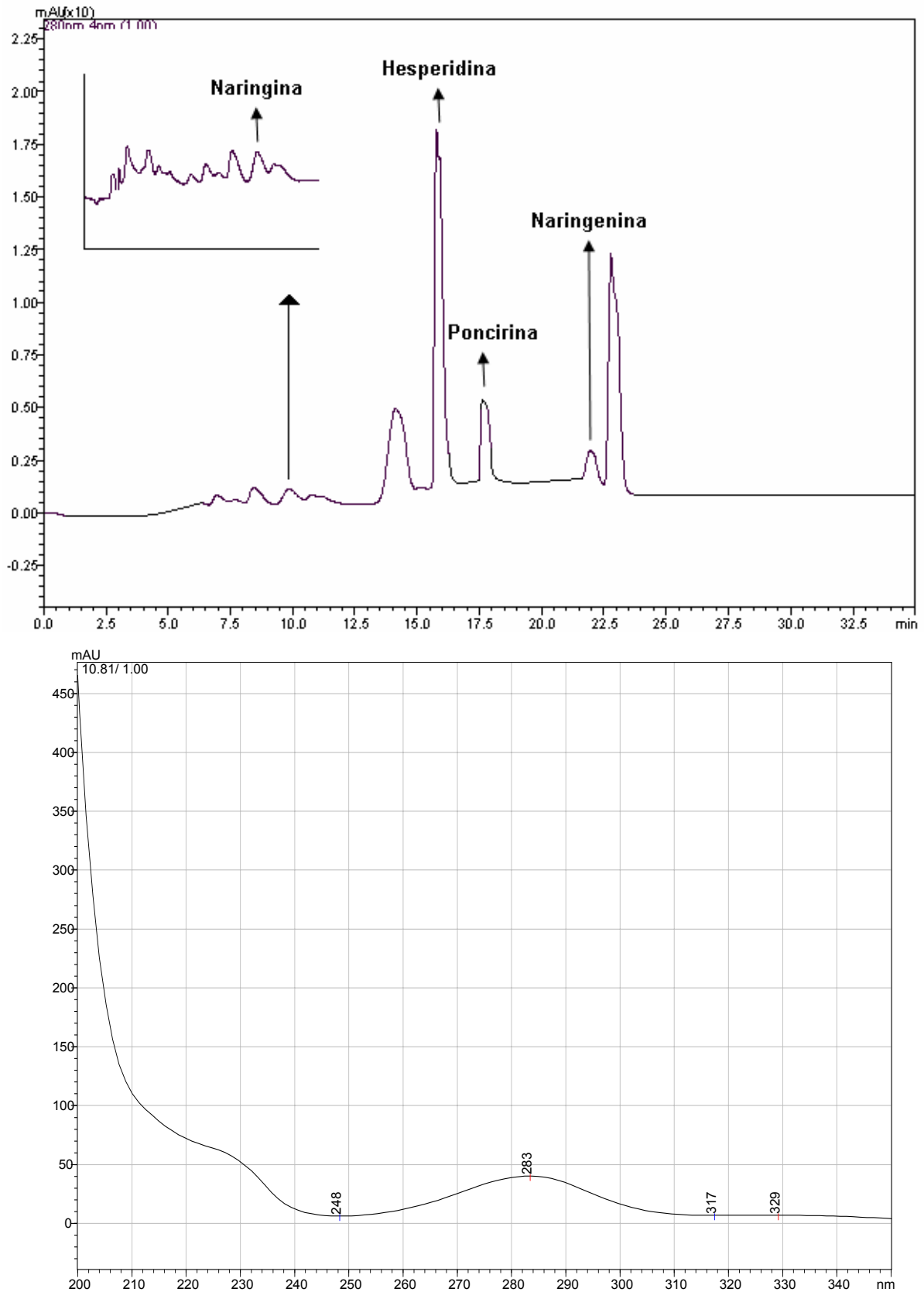


Figura 20 – Perfil cromatográfico de amostras de sucos para as flavanonas e seu espectro UV/DAD.

As 42 amostras de sucos de laranja analisadas apresentaram perfis cromatográficos semelhantes para a presença de naringina, hesperidina, poncirina e naringenina. As análises dos cromatogramas indicam que as flavanonas eluíram similarmente em todas as 42 amostras, independente da forma de obtenção do suco e tratamento dado às amostras, o que se supõe que as espécies cítricas utilizadas no preparo dos sucos sejam também semelhantes. A variação que foi observada nas amostras analisadas diz respeito às concentrações dos analitos investigados. Estas variantes podem ser explicadas devido aos procedimentos de obtenção dos sucos, variedades cítricas utilizadas, práticas agrônômicas, sazonalidade.

O método descrito tem sido aplicado para o estudo da composição de flavonóides glicosilados em sucos e por diferentes processos de obtenção, industrializados, espremido a mão e em máquinas tipo *fresh-in-squeeze*. Este método pode ser aplicado para diferentes variedades cítricas, como: laranja, toranja, lima e limão. É sabido que a distribuição do tipo, número e qualidade de flavonóides não é balanceada entre espécies e variedades cítricas.

Os valores quantitativos para os flavonóides nos sucos são determinados pelas áreas dos picos cromatográficos obtidos a partir dos *plots* tempo-absorbância.

As concentrações das flavanonas detectadas nos sucos examinados foram comparadas com os valores publicados e está na mesma faixa geral dos valores relatados.

Os dados da literatura nem sempre expressam as concentrações em unidades padronizadas, ou muitas vezes avaliam diferentes flavonóides como marcadores para sucos cítricos. As avaliações geralmente estão baseadas sobre a composição dos sucos das diversas variedades cítricas. Entretanto, os fabricantes de sucos não especificam a espécie e/ou variedade cítrica utilizada.

A tabela 09 apresenta a relação entre cítrus e os marcadores flavonóides presentes em algumas espécies e ou variedades cítricas. Somente a hesperidina (hsp) é comumente utilizada como a “impressão digital” dos sucos de laranja (Ooghe, 1994a). Os espectros obtidos durante as análises das amostras de suco de laranja, confirmam a hesperidina como o principal flavonóide nos sucos de laranja e esta se encontra presente em todas as amostras analisadas em maiores proporções quando comparadas as outras flavanonas investigadas (naringenina, naringina e poncirina) o que demonstra que a hesperidina é de fato o principal marcador do gênero cítrus, estando presente em quase todas as espécies (*C sinensis*, *C.*

*reticulata*, *C. medica*, *C. aurantifolia*, *C. limon*). Enquanto a naringenina (ngg) pode ser encontrada em espécies terciárias, *C. limon*. A naringina (nrg) está presente em *C. grandis*, espécies terciárias, *C. paradisi*, *C. medica*, *C. limon*, *C. spp.* Já a poncirina é achada em *C. grandis*.

Tabela 09 - Relação entre presença de alguns flavonóides e as espécies dos *Citrus*

<b>Espécie primária</b>	<b><i>C. grandis</i> (pomelo)</b>	<b><i>C. reticulata</i> (mandarina)</b>	<b><i>C. medica</i> (pomelo)</b>	<b><i>Microcitrus</i> <i>spp</i></b>	<b><i>C. spp.</i></b>
<b>Flavonóides</b>	pon dsm nhp rfn	hsp nrt dsm	hsp erc nrg dsm rtn	hsp nrt nhp irf rtn	hsp erc nrt nrg nhp rtn dsm
<b>Espécies secundárias</b>	<i>C. aurantium</i>	<i>C. sinensis</i>	<i>C. aurantifolia</i> (lima)		
<b>Flavonóides</b>	nrg ner nhp did erc nrt rfn	hsp nrt erc did ntg dsm rtn irf	hsp erc ntg rtn dsm		
<b>Espécies terciárias</b>	<i>C. natsudaidai</i>	<i>C. paradisi</i>	<i>C. limon</i>		
<b>Flavonóides</b>	nrg nhp ner ngg ntg did hsp nrt rfn	nrg ner nhp did erc rtn rfn	hsp erc nrt nrg ngg did rtn rfn dsm		

Abreviaturas: dsm, diosmina; erc, eriocitrina; hsp, hesperidina; ner, neoericitrina; ngg, naringenina; nhp, neohesperidina; nrg, naringina; nrt, narirutina; pon, poncirina; irf, isoroifolina; rtn, rutina; rfn, roifolina

A figura 21 apresenta os cromatogramas das amostras testemunhas dos vários tipos de sucos de laranja avaliados, espremido a mão (a), espremido a mão e centrifugado (b), industrial e centrifugado (b), obtido por máquina (d) e suco orgânico (e).

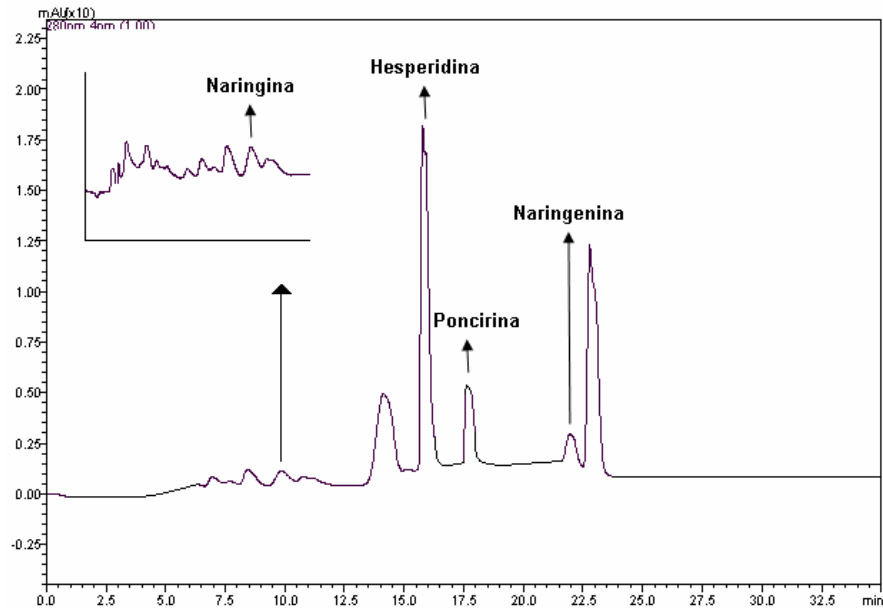


Figura 21a– Sucos espremido a mão; naringina; hesperidina; poncirina; naringenina

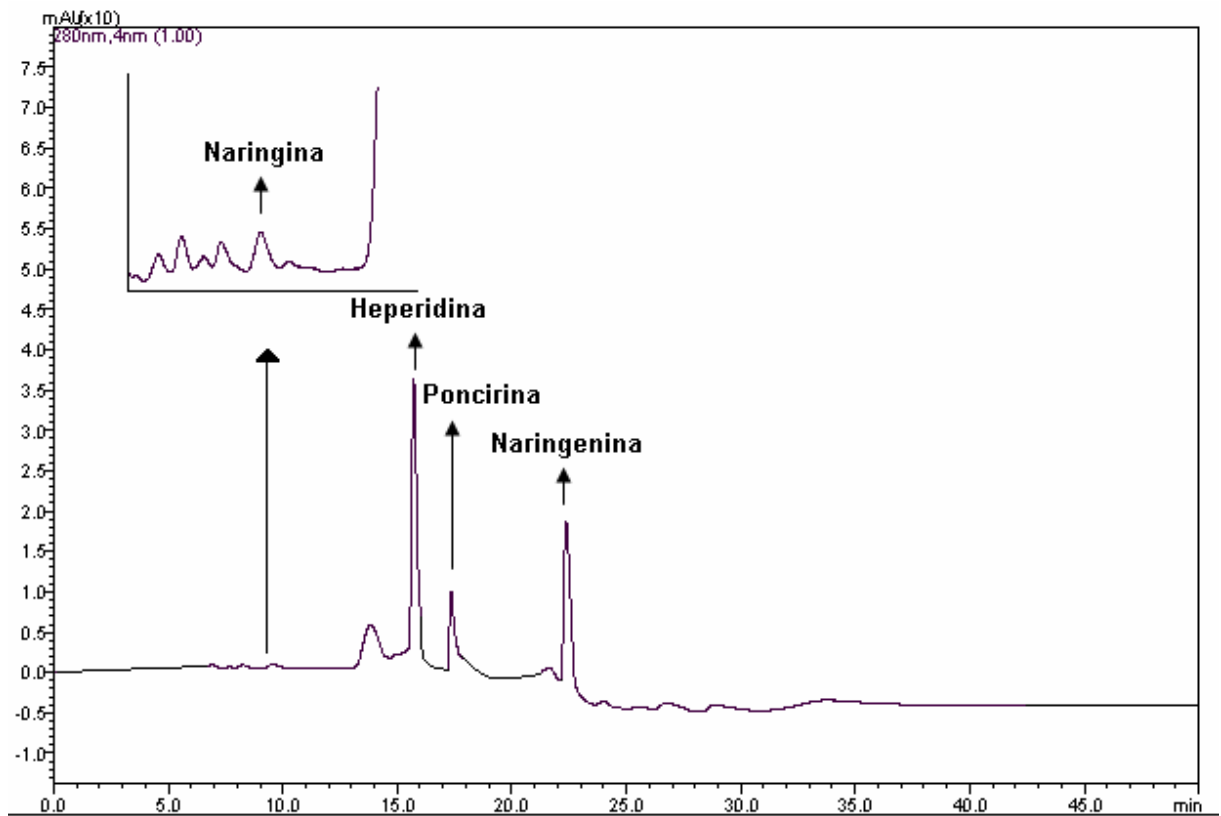


Figura 21b – Suco espremido a mão e centrifugado: naringina, hesperidina, poncirina e naringenina.

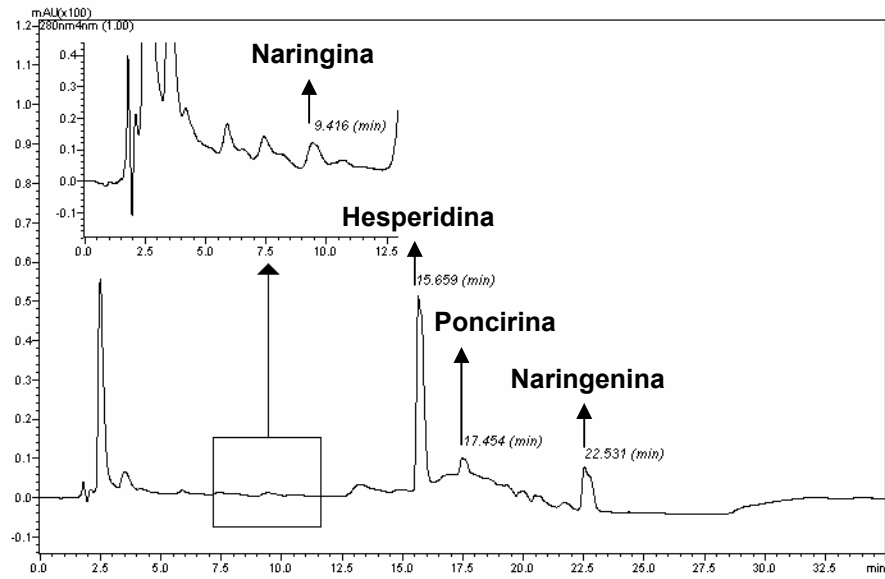


Figura. 21c – Suco industrial e centrifugado: naringina, hesperidina, poncirina e naringenina

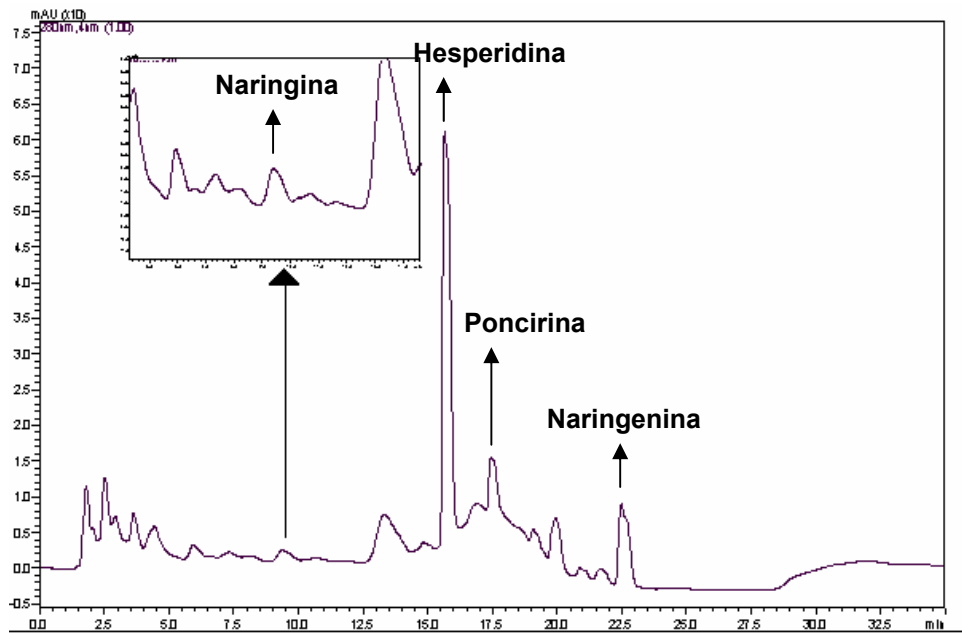


Figura 21d – Suco obtido em máquina: naringina, hesperidina, poncirina e naringenina.

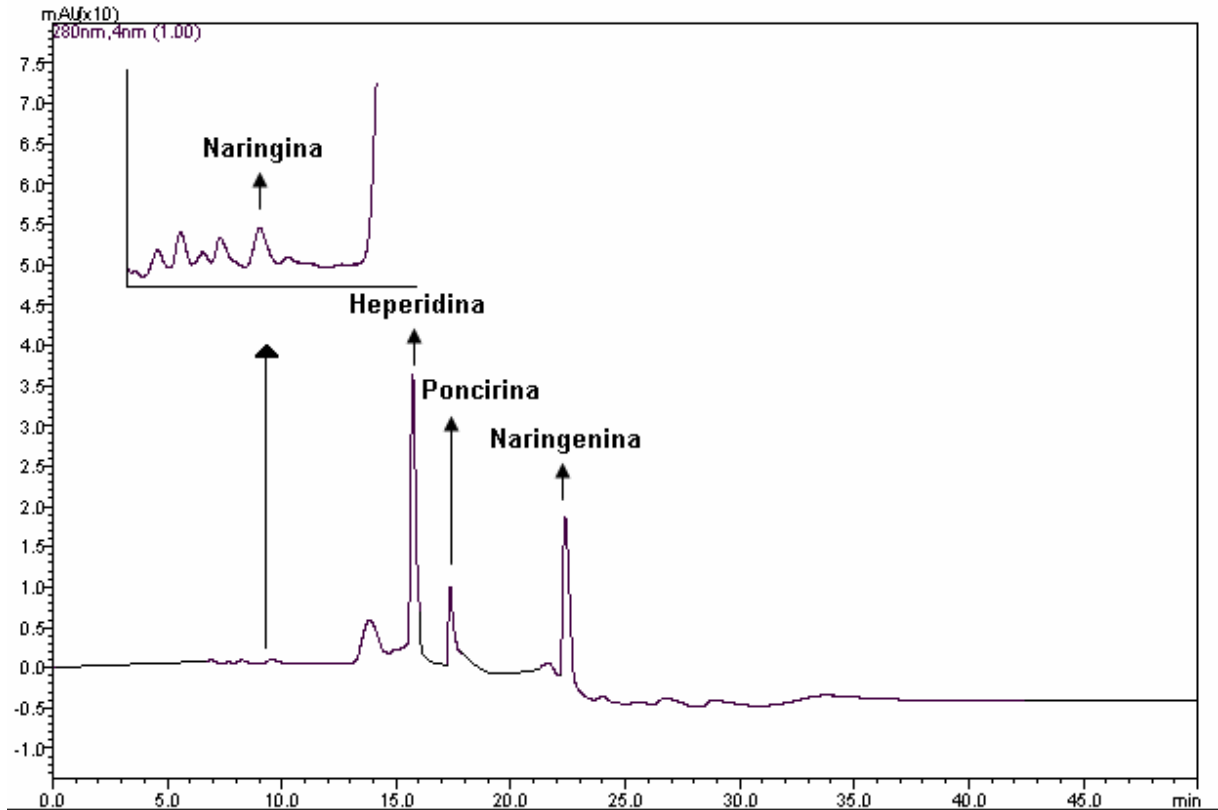


Figura 21e – Suco industrial – Orgânico: naringina; hesperidina; poncirina; naringenina

### 3.1.2 Extrações de psoraleno

O sistema de extração líquido – líquido utilizado neste estudo evidencia -se como eficiente para as extrações, porém passa por riscos de resultados artificialmente falsos já que está sendo aplicado para extrações de compostos em concentrações baixas e presentes em matriz complexa (sucos de laranja). O analito investigado em algumas amostras de sucos não foi possível ser detectado. O sistema apresenta-se operoso com relação ao tempo de execução das extrações, podendo ser contornada com a adaptação de sistemas de menor capacidade o que também deve colaborar com a redução do consumo dos solventes.



### 3.1.2.1 Determinação de psoraleno nas amostras de sucos de laranja.

A tabela 10 apresenta os resultados quantitativos de psoraleno nas 42 amostras de sucos analisados, com valores médios de 0,04 mg 100 g<sup>-1</sup>. Destas, 34 tiveram níveis de psoraleno abaixo do limite de quantificação (0,02 mg 100 g<sup>-1</sup>). As maiores concentrações (0,05 mg 100 g<sup>-1</sup>) foram achadas em sucos industriais, amostras S17, S18 e S26, estes valores são compatíveis em razão da espécie cítrica comumente utilizada na elaboração dos sucos. Manthey, 2005, encontrou em sucos de toranja, concentrações médias de psoraleno de 1,4 mg 100<sup>-1</sup> e 2,8 mg 100<sup>-1</sup>, para os sucos espremidos a mão e na polpa, respectivamente, já que a toranja (*C. paradisi* Macf) caracteriza-se pela presença deste composto em concentrações mais elevadas quando comparadas a outras espécies cítricas. O valor máximo (0,05 mg 100 g<sup>-1</sup>) registrado no presente estudo é 28 vezes inferior à média das concentrações encontradas em suco de toranja espremido a mão e também 56 vezes menor quando comparado o conteúdo deste analito na polpa da toranja (Manthey, 2005).

Tabela. 10 Valores encontrados para psoraleno nas amostras de sucos de laranja. (mg 100 g<sup>-1</sup>).

AMOSTRA	PSORALENO	AMOSTRA	PSORALENO
<sup>a</sup> S1	< 0,02 <sup>g</sup>	<sup>d</sup> S22	0,03 ± 0,01
<sup>a</sup> S2	< 0,02 <sup>g</sup>	<sup>d</sup> S23	< 0,02 <sup>g</sup>
<sup>a</sup> S3	< 0,02 <sup>g</sup>	<sup>d</sup> S24	< 0,02 <sup>g</sup>
<sup>b</sup> S4	< 0,02 <sup>g</sup>	<sup>d</sup> S25	< 0,02 <sup>g</sup>
<sup>b</sup> S5	< 0,02 <sup>g</sup>	<sup>d</sup> S26	0,05 ± 0,01
<sup>b</sup> S6	< 0,02 <sup>g</sup>	<sup>d</sup> S27	< 0,02 <sup>g</sup>
<sup>c</sup> S7	< 0,02 <sup>g</sup>	<sup>d</sup> S28	< 0,02 <sup>g</sup>
<sup>c</sup> S8	< 0,02 <sup>g</sup>	<sup>d</sup> S29	< 0,02 <sup>g</sup>
<sup>c</sup> S9	< 0,02 <sup>g</sup>	<sup>d</sup> S30	0,04 ± 0,01
<sup>d</sup> S10	0,03 ± 0,01	<sup>d</sup> S31	< 0,02 <sup>g</sup>
<sup>d</sup> S11	< 0,02 <sup>g</sup>	<sup>d</sup> S32	< 0,02 <sup>g</sup>
<sup>d</sup> S12	< 0,02 <sup>g</sup>	<sup>d</sup> S33	< 0,02 <sup>g</sup>
<sup>e</sup> S13	< 0,02 <sup>g</sup>	<sup>d</sup> S34	< 0,02 <sup>g</sup>
<sup>e</sup> S14	< 0,02 <sup>g</sup>	<sup>d</sup> S35	< 0,02 <sup>g</sup>
<sup>e</sup> S15	< 0,02 <sup>g</sup>	<sup>d</sup> S36	< 0,02 <sup>g</sup>
<sup>d</sup> S16	< 0,02 <sup>g</sup>	<sup>d</sup> S37	< 0,02 <sup>g</sup>
<sup>d</sup> S17	0,05 ± 0,01	<sup>d</sup> S38	0,03 ± 0,01
<sup>d</sup> S18	0,05 ± 0,01	<sup>d</sup> S39	< 0,02 <sup>g</sup>
<sup>d</sup> S19	0,04 ± 0,01	<sup>f</sup> S40	< 0,02 <sup>g</sup>
<sup>d</sup> S20	< 0,02 <sup>g</sup>	<sup>f</sup> S41	< 0,02 <sup>g</sup>
<sup>d</sup> S21	< 0,02 <sup>g</sup>	<sup>f</sup> S42	< 0,02 <sup>g</sup>
<b>Médio</b>			<b>0,04</b>
<b>Mínimo</b>			<b>0.03</b>
<b>Máximo</b>			<b>0.05</b>

<sup>a</sup>. suco espremido a mão e centrifugado; <sup>b</sup>.suco espremido a mão; <sup>c</sup>.suco industrial e centrifugado; <sup>d</sup>. suco industrial ; <sup>e</sup>. suco obtido em condições orgânicas; <sup>f</sup>. suco obtido em máquina *fresh-in-squeeze* <sup>g</sup> valor menor que 0,02 – correspondente ao limite de quantificação.

As amostras de sucos de laranja submetidas ao processo de centrifugação (S1; S2; S3; S7; S8; S9) apresentaram teores de psoraleno abaixo do limite de quantificação (<0,02). Em relação às amostras S17; S18; S26 de sucos industrial não submetido à centrifugação os teores de psoraleno foram máximos,  $0,05 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$ , mas, nas amostras S10; S22; S38 também de sucos de laranja industrial os valores foram os mínimos quantificados,  $0,03 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$ . Os dados da literatura registram diferenças nas concentrações de psoraleno, quando metodologias semelhantes foram aplicadas. Manthey et al., 2005 e Widmer, 2005 encontraram diferenças nas análises de sucos de toranja em condições semelhantes. Os autores obtiveram concentrações maiores de psoraleno em fração de suco centrifugado com retenção de polpa. Segundo os autores o tratamento prévio contribui para a extração destes compostos em frutas cítricas.

. Entretanto, deve-se ponderar que a espécie cítrica analisada pelos autores caracteriza-se pela presença de psoraleno em concentrações consideradas elevadas de acordo os padrões da composição dos cítricos, enquanto que a laranja doce (*Citrus sinensis*) objeto deste estudo apresenta registros de teores de psoraleno em menores proporções e predominantemente presente na casca.

A escolha deste procedimento buscou rastrear a presença de psoraleno nos sucos de laranja considerando que os vários processos de obtenção dos sucos, industriais, espremidos a mão, máquinas tipo *fresh-in-squeeze* utilizam freqüentemente os frutos com a casca o que possibilita a transferência de determinados compostos presentes na casca para a solução obtida (sucos de laranja) dentre estes o psoraleno, todavia alguns critérios são adotados pelos manipuladores durante os processos de obtenção dos sucos para evitar o contato com a casca da fruta.

Verifica-se que os resultados encontrados sejam 1000 vezes menores de que a quantidade consumida através das bebidas flavorizadas com óleo de lima, 50 ppm (5 mg/100g) (Stanley & Vannier, 1967). O valor máximo encontrado ( $0,05 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$ ) é 26 vezes menor de que a média diária (1,3 mg) de consumo nos Estados Unidos e estimada pela *Comissão de Segurança de Alimentos do Senado Europeu* (DFG, 2006).

De acordo dados da literatura, a dose tóxica de psoraleno em humanos está estimada em  $1,8 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$ . Assim, a concentração máxima encontrada nas amostras de sucos, permanece abaixo do limiar de toxicidade, correspondente a 36

vezes menor de que a dose tóxica estabelecida. A principal causa de reações de fototoxicidade nos Estados Unidos é causada por frutas cítricas e é da responsabilidade da lima da Pérsia (*C. aurantifolia*) que contém na pele (mesocarpo) concentrações elevadas de psoralenos linear. Estima-se que a principal fonte destes compostos seja a lima, que contribui com 95% da ingestão diária, incluindo refrigerantes flavorizados com óleo de lima (Wagstaff, 1991).

O Anexo II do Council Directive, 1988 (88/388/EEC) estabelece como limite geral permitido de psoralenos em alimentos e bebidas não alcoólicas teores de até 2 mg/kg. Com base na quantidade máxima de psoraleno detectada nos sucos analisados, esses índices estão muito abaixo, quando comparados aos valores considerados tóxicos para os seres humanos. O valor máximo detectado (0.05 mg 100 g<sup>-1</sup>) está 40 vezes inferior à dose permitida (2 mg/kg). Em licores preparados a partir da polpa do limão, Versari (2003) quantificou níveis de psoraleno que variou de 1,6 g/L a 35,2 g/L.

### 3.1.2.2 Fase móvel nas análises de Psoraleno

Para a separação do psoraleno foi utilizado os solventes (metanol: água) com os gradientes previamente testados, contribuindo para a redução do tempo de eluição do composto em análise (TR = 5'). Já que a água e o metanol são solventes polares e aumentam também a eficiência da corrida. Widmer, 2005, utilizando água:acetonitrila (80:20 → 0', 60:40 → 10', 60:40 → 20', 20:80 → 45', 5:95 → 50', 5:95 → 55', 80:20 → 56', 80:20 → 65) obteve o pico de eluição para 6,7-dihidroxibergamotina antes de 15'.

### 3.1.2.3 Perfil cromatográfico do psoraleno

Na separação do psoraleno a corrida aconteceu com prévia programação do tempo, sob condições descritas, inclusive com o equilíbrio da coluna. O espectro UV do psoraleno foi na faixa de 246 nm e o máximo de absorção em 280 nm, com tempo máximo de corrida de 25 minutos. Somente as amostras, 11; 17; 18; 19; 22; 26; 30; 38 puderam ter os teores de psoraleno detectados e quantificados. O espectro

UV/DAD característico do psoraleno está apresentado na figura 22 e evidencia o respectivo perfil cromatográfico do padrão.

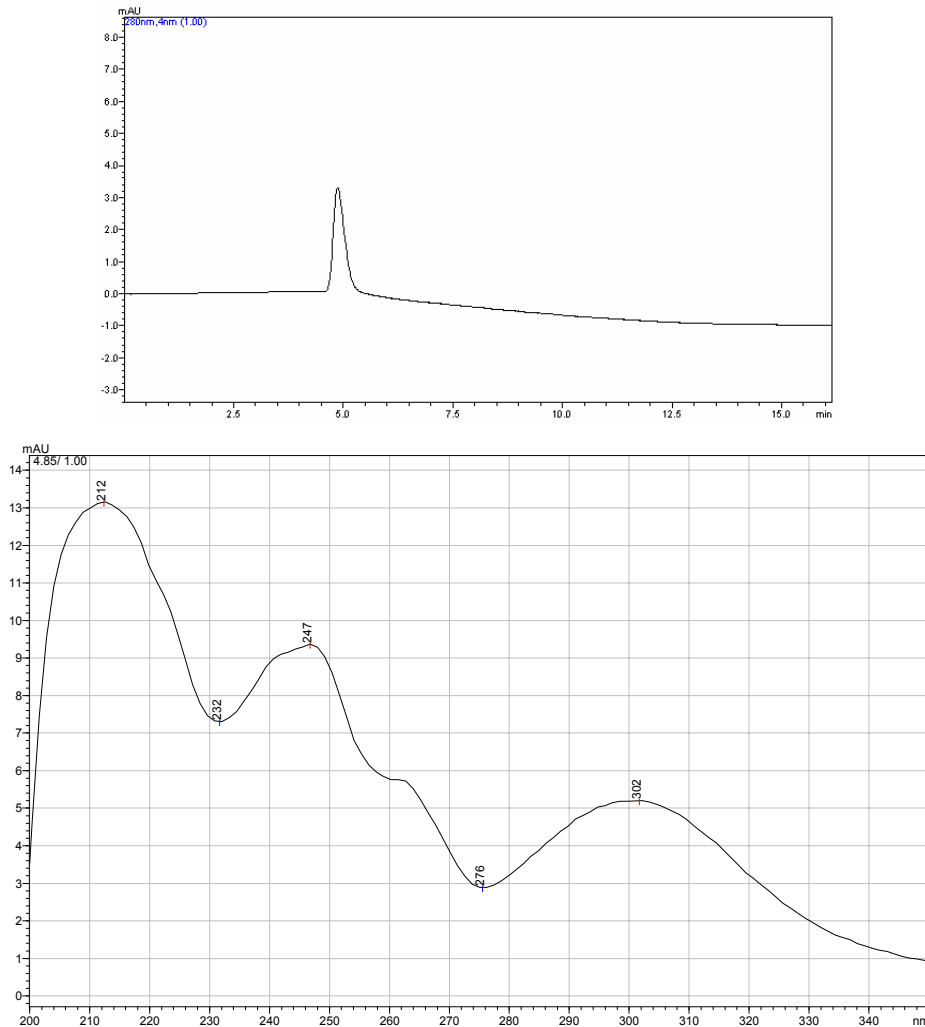


Figura 22 – Perfil cromatográfico do padrão de psoraleno e espectro UV/DAD.

Das 42 amostras de sucos de laranja analisados 34 apresentaram valores de concentrações de psoraleno abaixo do limite de quantificação ( $LOD < 0,02$  mg/100g). Nas amostras de sucos que puderam ter suas concentrações de psoraleno determinadas, as mesmas foram analisadas comparando os seus respectivos cromatogramas gerados com o do cromatograma padrão de psoraleno.

Figura 23

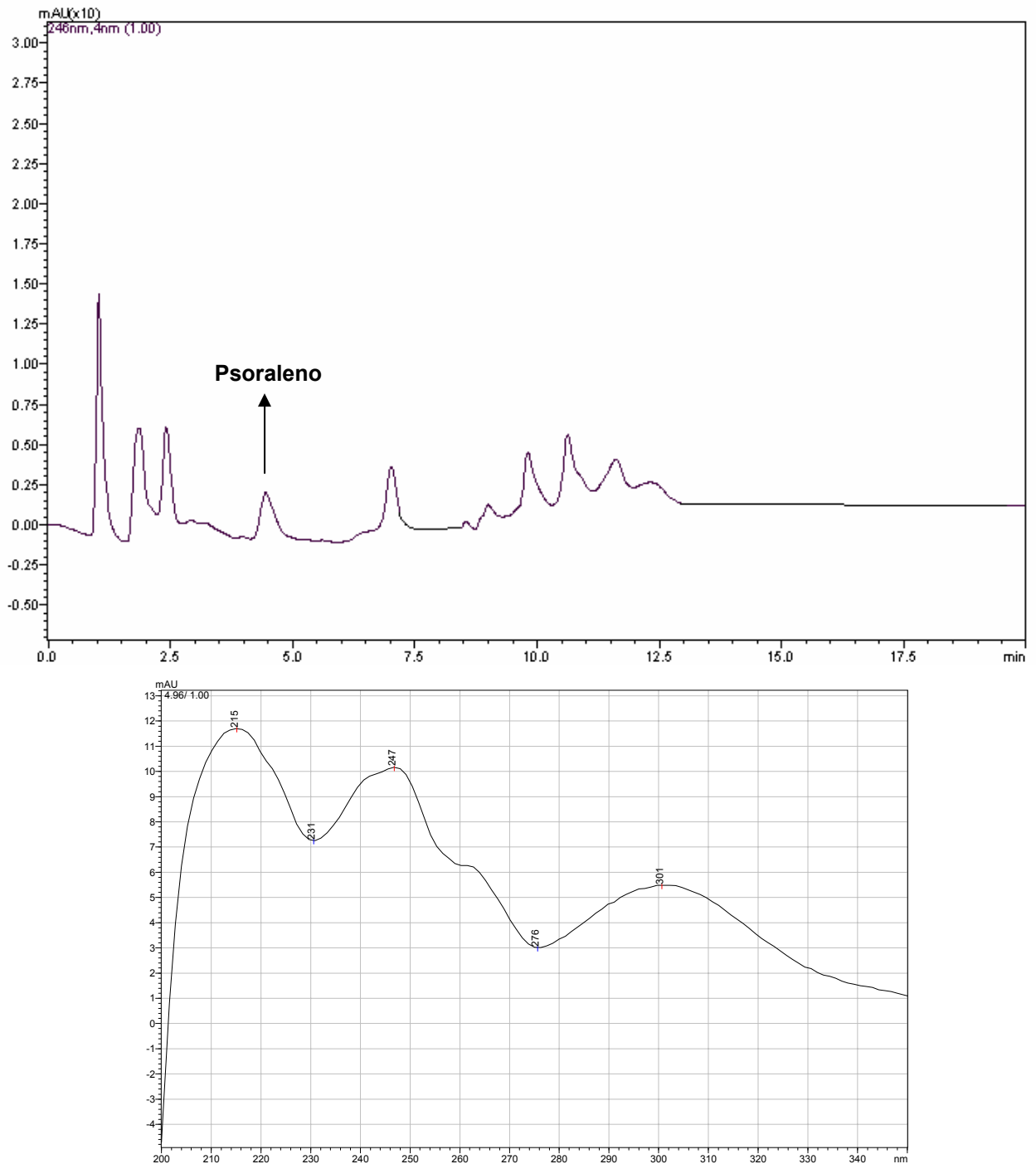


Figura 23 – Perfil cromatográfico para o psoraleno nas amostras de sucos e espectro UV/DAD.

Por CLAE-DAD também foi possível obter os espectros no UV de cada pico do psoraleno e comparar com o padrão deste, possibilitando assim a confirmação do analito em algumas amostras de sucos (S10; S17; S18; S22; S26; S30 e S38), porém nas outras amostras dos sucos investigadas os valores do analito não foi

quantificado, pois, este se encontrava abaixo do Limite de Quantificação (S1 até S9; S11 até S16; S20; S21; S23 até S25; S27 até S29; S31 até S37). Figuras 24a e 24b.

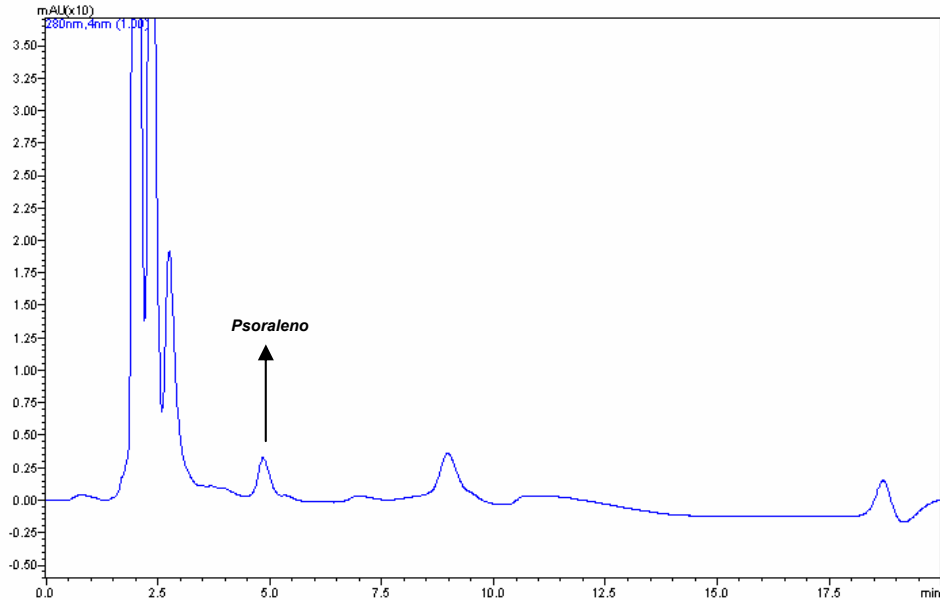


Figura 24a – suco industrial: psoraleno

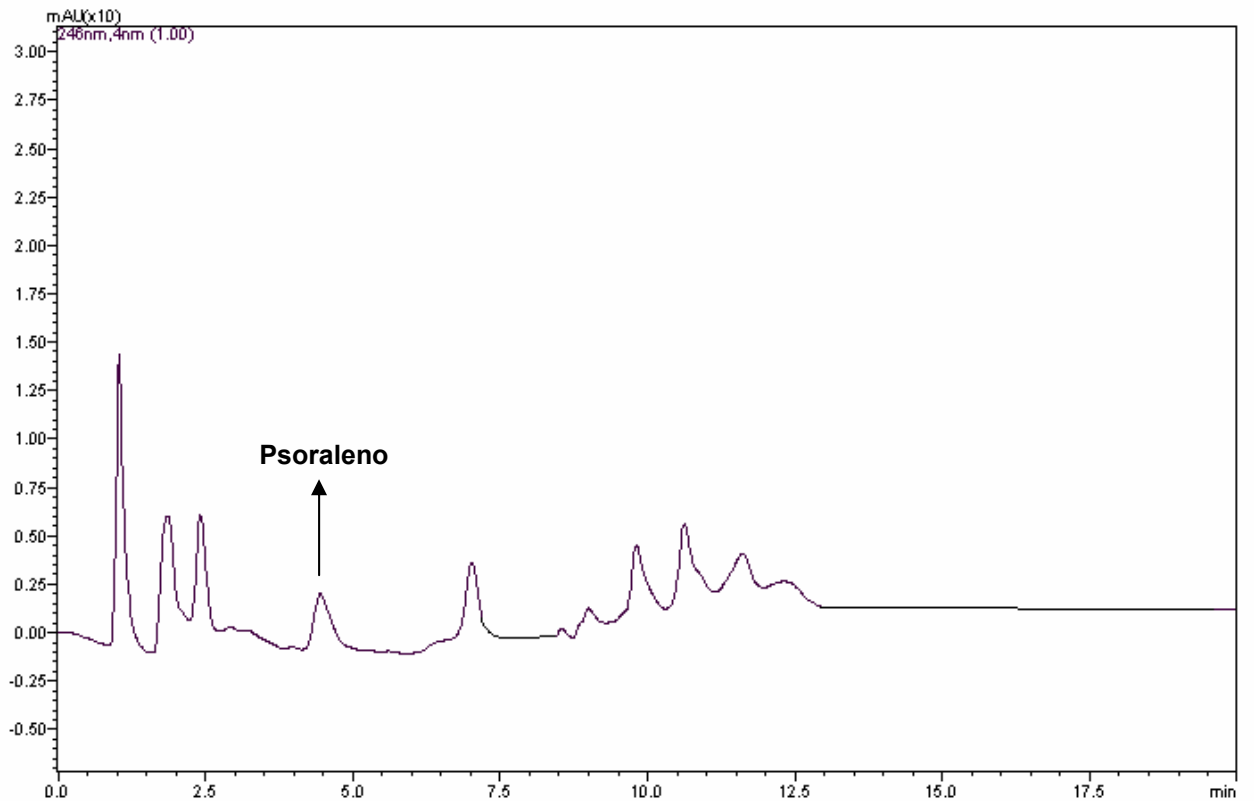


Figura 24b – Suco espremido a mão: psoraleno

## 3.2 VALIDAÇÃO DO PROCEDIMENTO ANALITICO

### 3.2.1 Exatidão

A exatidão do método foi verificada através de ensaio de recuperação (Ribani et al, 2004). Para o ensaio de exatidão de hesperidina utilizou-se uma solução contendo 60 mg deste composto em 100g de suco de laranja e para as demais flavanonas e psoraleno 0,30 mg de analito em 100g de suco de laranja. A tabela 11 apresenta os valores obtidos para as recuperações das flavanonas e psoraleno.

As amostras foram submetidas às respectivas condições de extração, como já descritas e posterior análise por CLAE, obedecendo às mesmas condições das amostras testes.

O percentual de recuperação para a hesperidina e naringina (107%; 101%) é compatível com o relatado na literatura (92%; 75%, respectivamente - extração fase sólida, Bronner, 1995; Tura & Robards, 2002). O valor do teste de recuperação da naringenina (98%) pode ser considerado satisfatório, Ho et al., 2000; Guido, 2008 conseguiu valor de recuperação de 91% e 90%, respectivamente ao trabalhar com amostras de sucos de frutas comerciais sem prévio tratamento de extração e em fase sólida. Quanto ao ensaio de recuperação para a poncirina o valor quantificado foi de 103% podendo considerar bom tendo em vista a complexidade da matriz. A recuperação foi melhor para as flavanonas presentes em maior quantidade nos sucos de laranja, como exemplo a hesperidina. O percentual de psoraleno no ensaio de recuperação (86%) está abaixo do relatado por Goosen et al., 2004, quando analisou matriz complexa (sucos de uva) e encontrou valor de 105%. Verifica-se que o procedimento de extração (líquido – líquido) aplicado é eficiente e pode contribuir para a obtenção dos resultados, tendo em vista que os valores dos rendimentos nos ensaios de recuperação foram superiores aos dados de literaturas padrões nos quais registram recuperação abaixo dos detectados neste trabalho. Os valores padrões para os ensaios de recuperação das Farmacopéias Francesa, Helvética e Européia nas análises de flavonóides presentes em maracujá estão na faixa de 75,7 – 78,2%, 70,3 – 71,3% e 100,6 – 115,7%, respectivamente. Os valores entre 70 e 120% são aceitáveis segundo os limites propostos pelo *Internacional Conference on*

*Harmonization* (ICH) 1996. Desta forma todos os valores encontrados para o método em estudo foram satisfatórios.

Tabela 11 – Valores obtidos para os ensaios de recuperação.

Substâncias	Percentual obtido
Naringina	101 ±1
Hesperidina	107 ±2
Poncirina	103 ± 1
Naringenina	98 ± 2
Psoraleno	86 ± 3

### 3.2. 2 Especificidade/Seletividade

A especificidade do método foi obtida através da análise do branco dos reagentes e da amostra testemunha (padrões das substâncias) para verificar se possíveis interferentes não estaria presente na amostra (Ribani et al, 2004). Conforme verificado nas figuras 25.1 e 25.2 respectivamente, segundo condições cromatográficas da tabela 06 e 07.

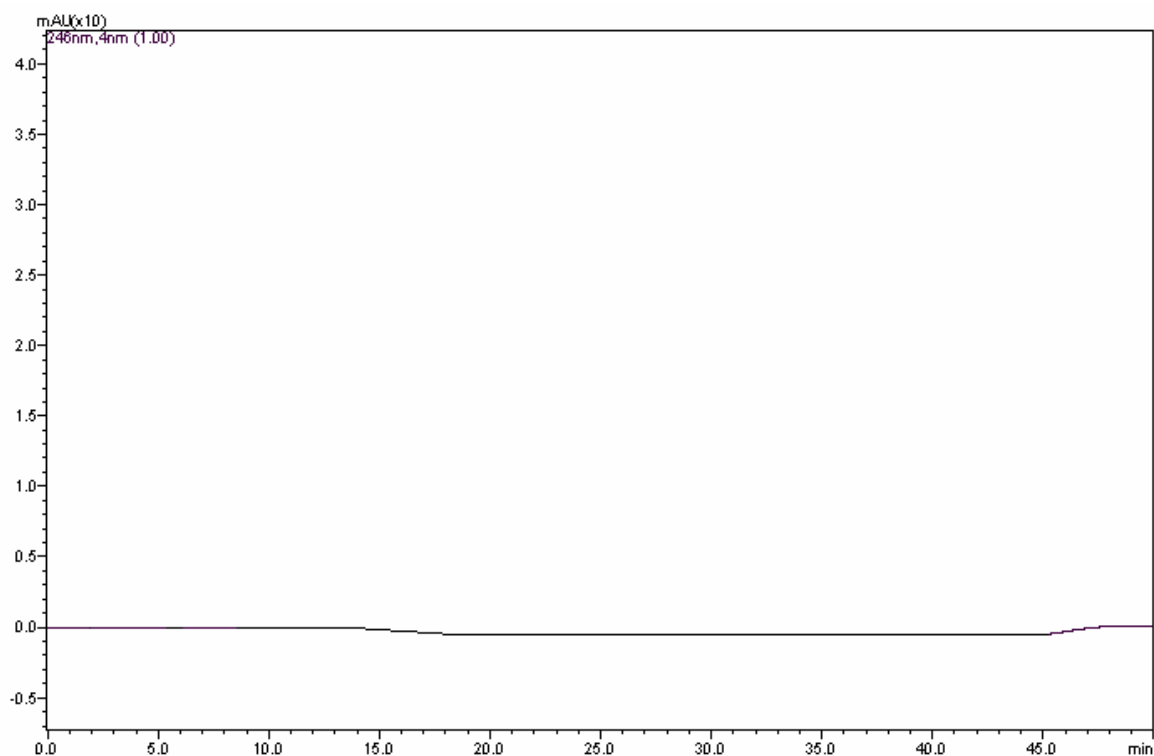


Figura 25.1 – Cromatograma do branco do solvente para as análises de CLAE.



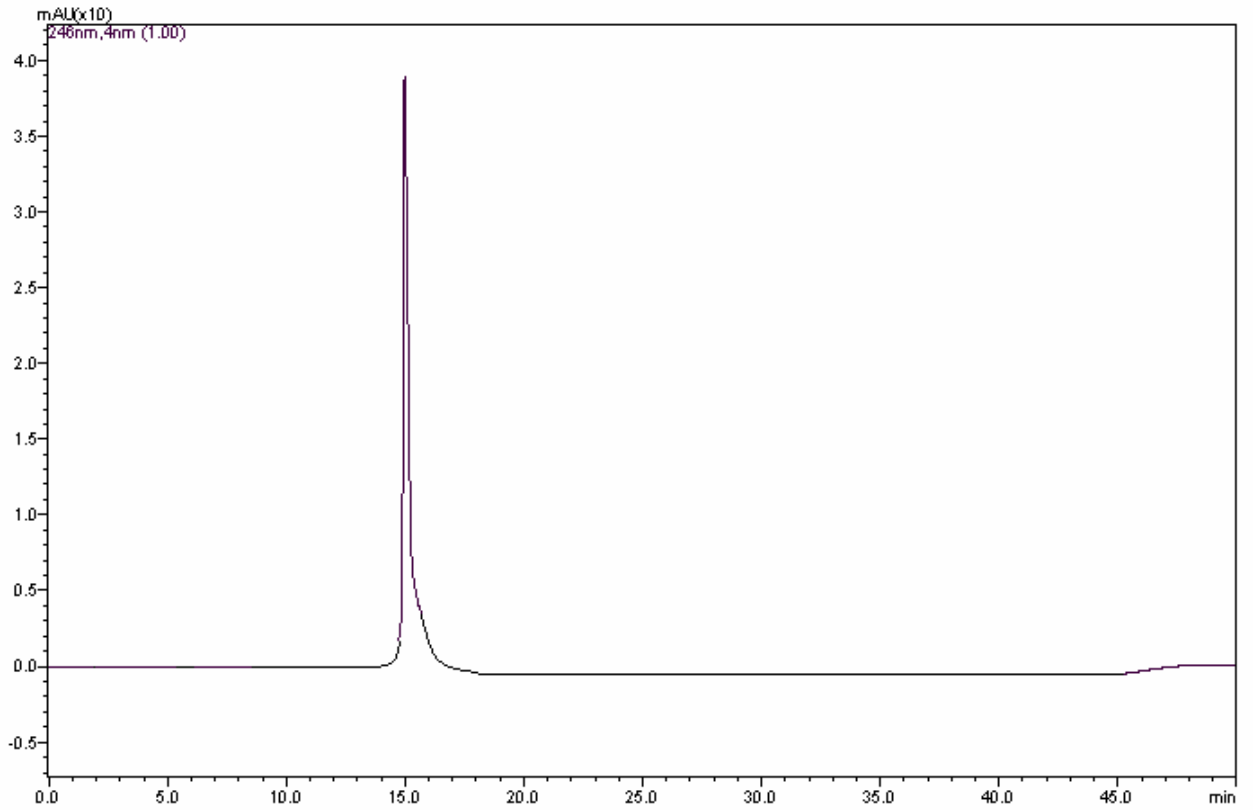


Figura 25.2a – Cromatograma do padrão de hesperidina, tempo de retenção (TR) de 15'.

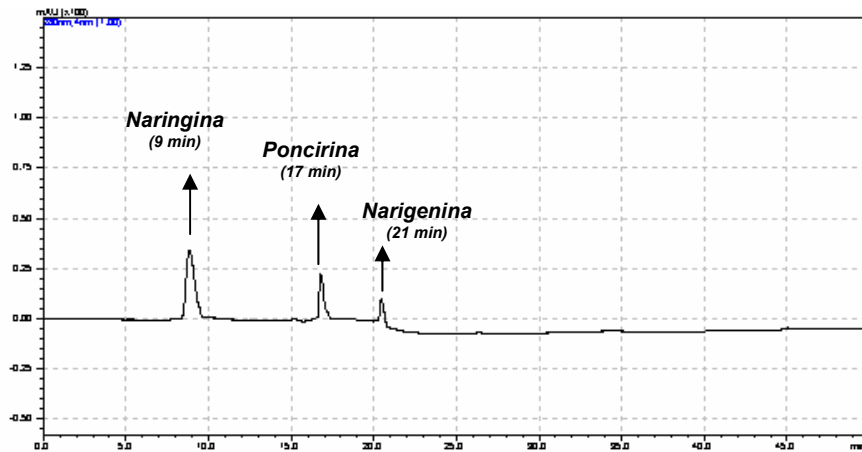


Figura 25.2 b – Cromatograma dos padrões de flavanonas: naringina (TR =9'), poncirina (TR=17'), narigenina (22').

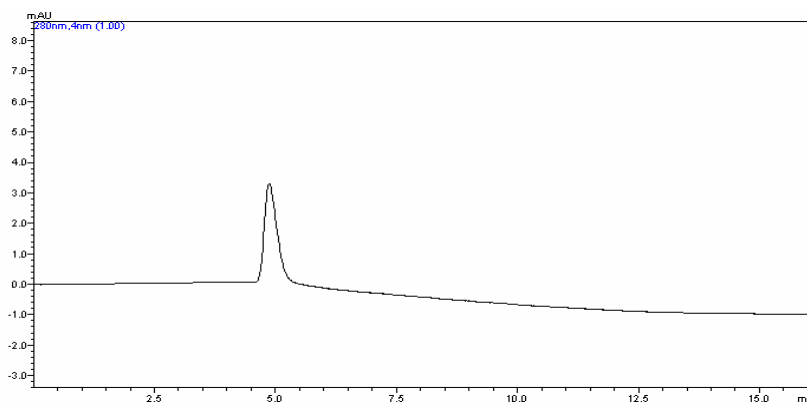


Figura 25.2 c – Cromatograma do padrão de psoraleno, tempo de retenção (TR = 5')

### 3.2.3 Linearidade

A linearidade da curva analítica das flavanonas (hesperidina, naringina, naringina, poncirina) e psoraleno foi obtida através do preparo das soluções. Cinco soluções padrões cobrindo a faixa para hesperidina; Seis soluções padrões cobrindo a faixa para naringina; Cinco soluções padrões cobrindo a faixa para naringina; Seis soluções padrões cobrindo a faixa para poncirina; Cinco soluções padrões cobrindo a faixa para psoraleno, foram preparadas. Os valores das áreas dos picos (expressas em mV/s foram plotadas como valores médios das autoinjeções em triplicatas. As curvas analíticas obtidas para as flavanonas e psoraleno bem como seus coeficientes de correlação estão apresentados na tabela 12 e figura 26 (APÊNDICE B). Os cálculos da relação linear confirmam que os resultados são diretamente proporcionais à concentração e mostram boa linearidade ( $R^2 > 0,99$ ) para todos os compostos na faixa de concentração testadas.

Tabela 12 – Equação das curvas analíticas para os analitos determinados nas amostras de sucos de laranja.

Substâncias	Concentração mg 100g <sup>-1</sup>	Equação	Coef. correlação (R <sup>2</sup> )
Naringina	0,01 – 0,09	Y=14978786x + 7758	0,9986
Hesperidina	60 – 300	Y= 2273x + 17049	0,9986
Poncirina	0,05 – 0,30	Y=2414388x + 40117	0,9981
Naringenina	0,05 – 0,25	Y= 1862611,4771x +3065	0.9999
Psoraleno	5 - 25	Y=17228x +1482 (246 nm)	0,9993
		Y=5492,4x +568 (280 nm)	0,9998

### 3.2.4 Precisão (Repetitividade)

A precisão da técnica foi avaliada através de dez injeções repetitivas do padrão de (naringina, poncirina e naringenina), hesperidina e psoraleno em concentrações 0,20 mg 100 g<sup>-1</sup>, 60 mg 100 g<sup>-1</sup> e 15 mg 100 g<sup>-1</sup>, respectivamente; seguido pela média dos valores da área do pico e determinação da estimativa do desvio padrão relativo de todas as injeções. Para a naringina a precisão foi RSD 9,2 %; para a hesperidina a precisão foi RSD 6,0 %; para a poncirina a precisão foi RSD 8,16 %; para a naringenina a precisão foi RSD 7,0 %; e, para o psoraleno a precisão foi RSD 9,6 %, conforme preconiza Huber (1998) e de acordo com a complexidade da amostra em análise.

### 3.2.5 Limite de Detecção (LOD) e Limite de Quantificação (LOQ)

Foi utilizado para os cálculos dos limites de detecção (LOD) e limites de quantificação (LOQ) o método baseado em parâmetros da curva analítica (Ribani et al, 2004; Barros et al., 1998). Conforme tabela 13.

$$LOD = 3 \times \frac{s}{S} \quad ; \quad LOQ = 10 \times \frac{s}{S}$$

Onde *s* é a estimativa do desvio padrão da equação da linha de regressão e *S* é o coeficiente angular da curva.

O parâmetro limite de detecção (LOD) representa a menor concentração da substância em exame que pode ser detectada com certo intervalo de confiança, corresponde a um teste limite que especifica se a substância em exame está ou não presente na amostra. Enquanto que o limite de quantificação (LOQ) representa a mais baixa concentração da substância em exame que pode ser quantificada com certo intervalo de confiança pré-estabelecido (Brasil 2003). O Método aplicado permitiu aferir os limites de detecção e de quantificação de todas as flavanonas, variando de 0,0037 a 1,87 mg 100 g<sup>-1</sup> e de 0,0089 a 7,84 mg 100 g<sup>-1</sup> respectivamente. O LOD de psoraleno foi de 0,0060 mg 100 g<sup>-1</sup> e o LOQ de 0,0182 mg 100 g<sup>-1</sup>. (Tabela 13). Das 42 amostras, 34 apresentaram concentrações de psoraleno abaixo do limite de quantificação (< 0,02 mg 100 g<sup>-1</sup>).

Tabela 13 – Limites de Detecção e Quantificação dos analitos.

<b>Substâncias</b>	<b>LOD (mg 100 g<sup>-1</sup>)</b>	<b>LOQ (mg 100 g<sup>-1</sup>)</b>
Naringina	0,0037	0,0089
Hesperidina	1,87	7,84
Poncirina	0,0147	0,0302
Naringenina	0,0066	0,0200
Psoraleno	0,0060	0,0182

### 3.3 ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS (PCA).

Com o objetivo de extrair uma maior quantidade de informação dos dados gerados foi empregado o estudo exploratório de Análise de Componentes Principais (PCA) nos resultados obtidos para as 42 amostras de sucos de laranja para os teores de hesperidina, naringina, poncirina, neringenina e psoraleno. O auto-escalamento foi utilizado como um método de pré-processamento dos valores individuais das amostras para evitar tendências nos resultados. Como mostra a tabela 14 foi observado que as três primeiras componentes principais (PCs) representam 81,23% da variabilidade total dos dados.

Tabela 14 – Pesos das variáveis das três componentes principais.

<b>Componentes</b>	<b>%Total de variância</b>	<b>% Acúmulo de variância</b>
<b>PC1</b>	42,22	42,22
<b>PC2</b>	21,42	63,64
<b>PC3</b>	17,59	81,23

A primeira componente principal (PC1) representa 42,22% da variabilidade dos dados e é constituída pelas variáveis poncirina, naringenina e naringina. Assim, a maior variabilidade das amostras, deve-se a concentração desses flavonóides. A hesperidina é a variável de maior peso no eixo da segunda componente principal (PC2) concentrando 21,42% da variância total dos dados obtidos. A terceira componente principal é governada principalmente pelos teores de psoraleno com 17,59% de variabilidade. (Figuras 27.1, 27.2; e 27.3).

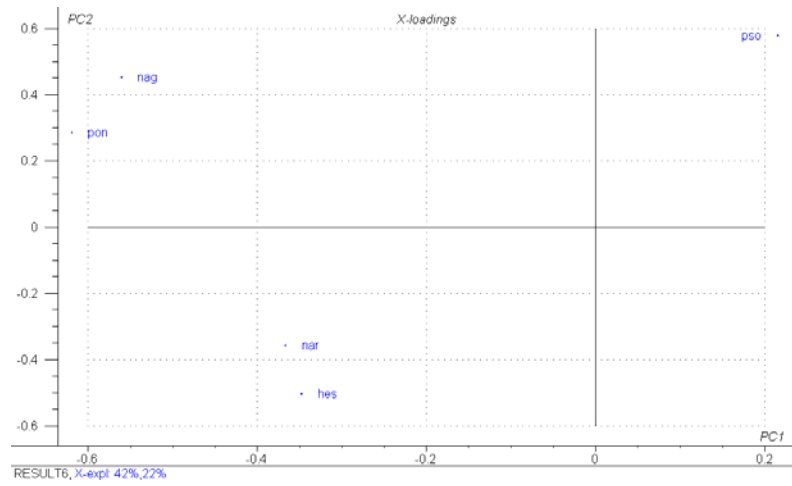


Figura 27.1 – Projeção do gráfico dos pesos de PC1 x PC2 que juntas descrevem 63,64% da variabilidade total da informação dos dados.

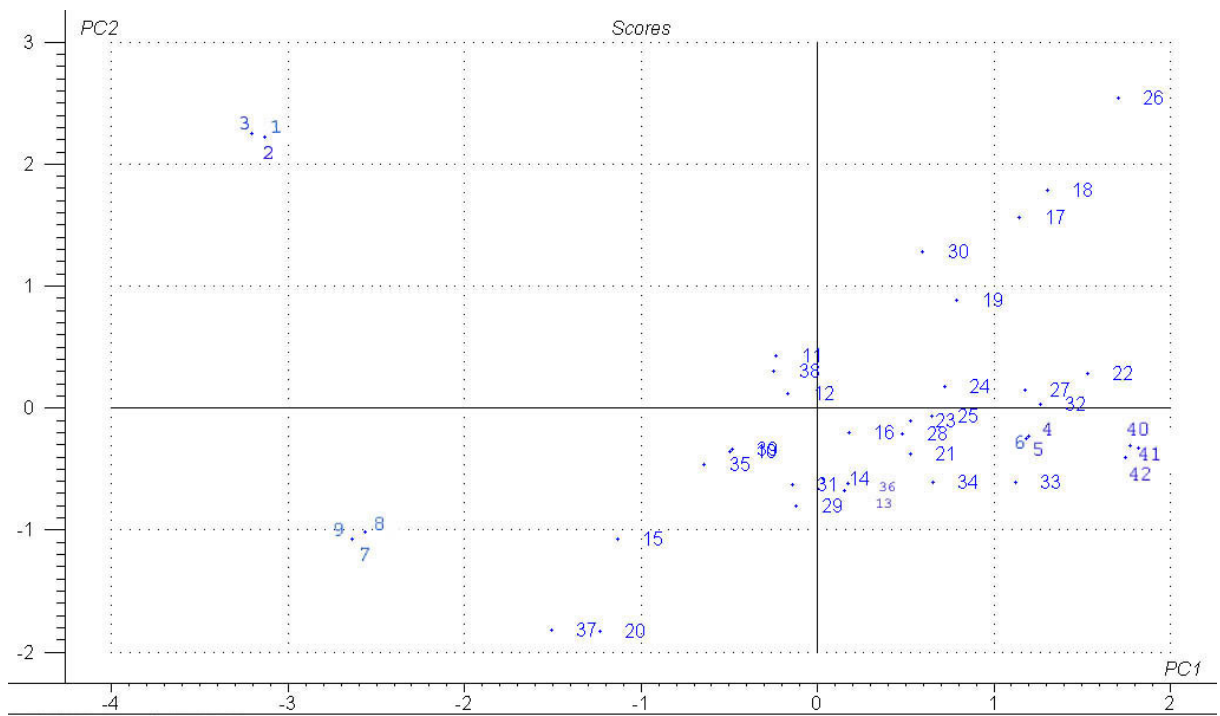


Figura 27.2 – Projeção do gráfico dos escores de PC1 x PC2 que juntas descrevem 63,64% da variabilidade total da informação dos dados.

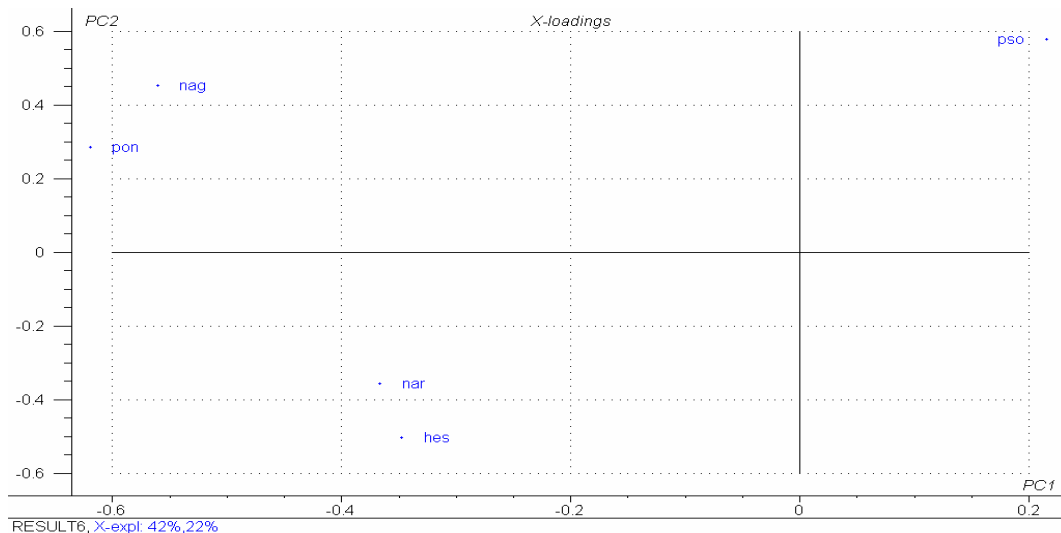


Figura 27.3 – Projeção do gráfico dos pesos de PC1 x PC3 que juntas descrevem 59,81% da variabilidade total da informação dos dados.

Avaliando-se todo o conjunto de dados gerados pelo estudo das componentes principais bem como a influência da variância residual (Figura 28) pôde-se observar que as amostras que estão situadas no lado inferior e direito da figura são as que mais importantes para descrever o modelo matemático no estudo das PCs. São elas: S20, S37, S17, S18, S26 (sucos industrial) S1, S2, S3 (sucos espremidos a mão e centrifugados), S7, S8 e S9 (sucos industriais e centrifugados). A importância dessas amostras decorre talvez devido ao tipo de tratamento a que foram submetidas e/ou devido às altas concentrações obtidas para os analitos analisados. As amostras S1,S2,S3,S7,S8 e S9 representam um conjunto de amostras de sucos submetidos ao processo de centrifugação. Dentre essas, as três primeiras foram amostras de sucos *in natura* espremidos à mão que foram centrifugados, ao passo que, as restantes são de sucos industrializados. As amostras centrifugadas apresentaram no geral, uma maior concentração para os analitos. As amostras S17, S18 e S26, são amostras de sucos industrializados. Ficou evidente que as amostras de sucos S20 e S37, ambas de sucos industrializados do mesmo fabricante, porém de lotes diferentes apresentaram as mais altas concentrações de hesperidina. Como a presença desse flavonóide é indesejada nos sucos industrializados por acarretar ao produto final sabor amargo, é provável que tenha ocorrido uma maior concentração desse analito durante o processo de extração dos sucos da laranja e não tenha sido detectável pelo sistema de avaliação de controle da qualidade do fabricante.

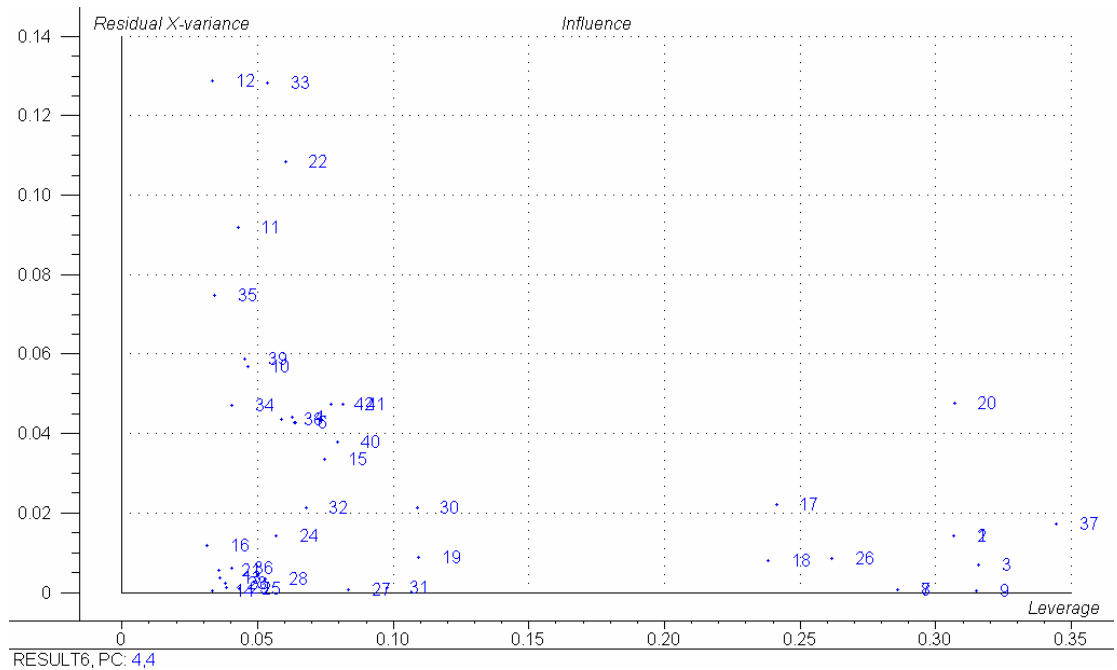


Figura 28 – Gráfico da variância residual do conjunto de amostras de sucos de laranja.

Verificou-se no gráfico da variância residual que a amostra S20, estava situada no lado direito do gráfico numa posição mais elevada que as demais. Essa posição pode indicar uma provável *outlier* (amostra anômala) de modo a influenciar na separação das variáveis nas componentes. Assim, procedeu-se à exclusão dessa amostra e em seguida, toda a PCA foi recalculada (Figura 29).

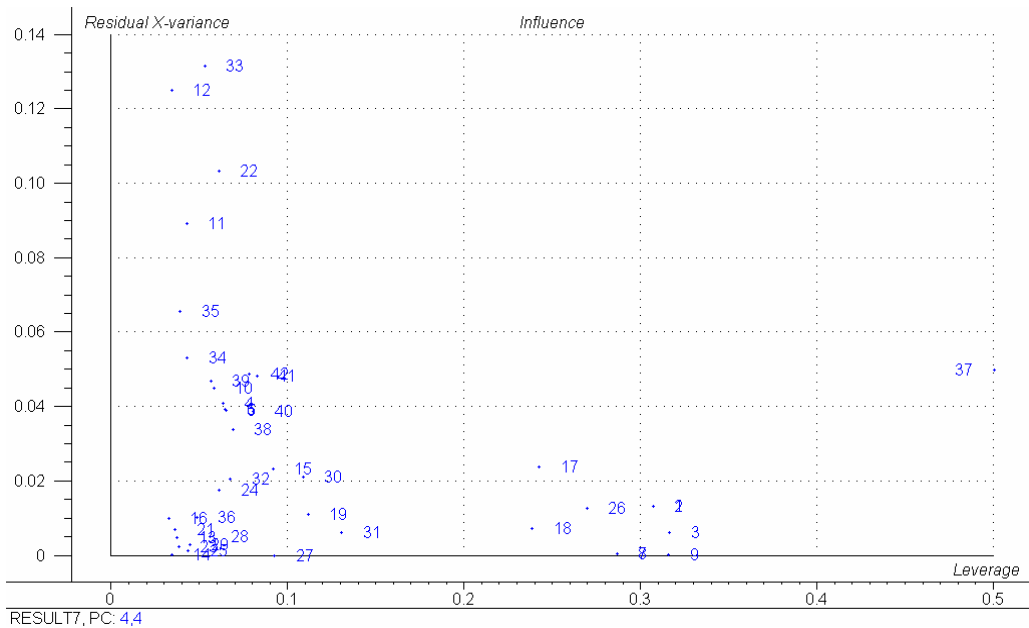


Figura 29 – Gráfico da variância residual do conjunto de amostras com a exclusão de S20.

Nesse novo modelo, a amostra S37, assumiu posição semelhante à anterior e também foi excluída, conforme visto na figura 30 que representa o gráfico da variância residual.

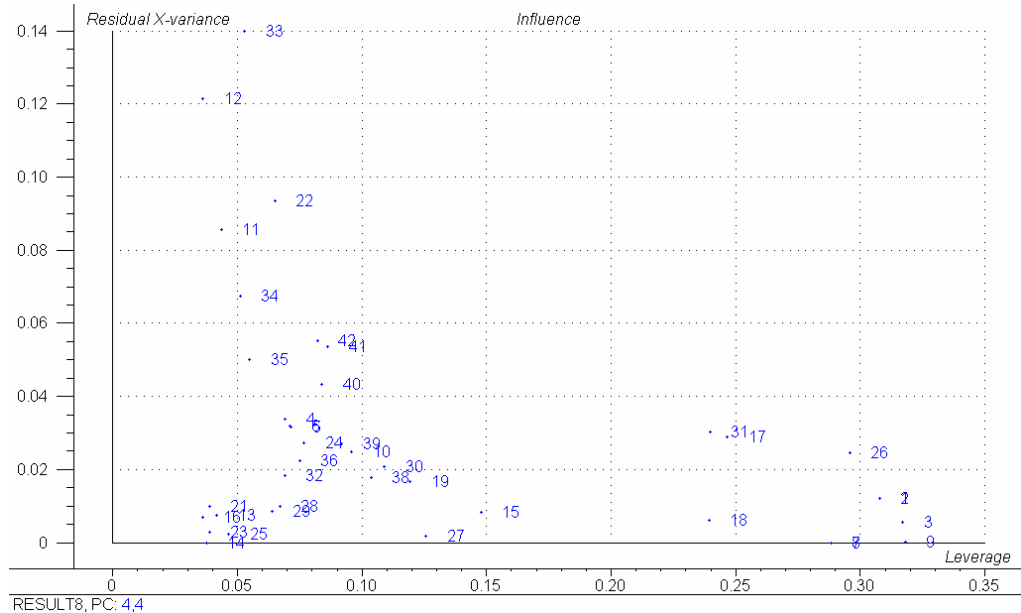


Figura 30 – Gráfico da variância residual do conjunto de amostras com a exclusão de S20 e S37.

Após a exclusão das amostras S20 e S37 do conjunto de dados da matriz dos resultados. Verificou-se um aumento nos pesos das variáveis. Sendo de 85, 66% toda a variabilidade do sistema explicada para o novo cálculo das PCs. (Tabela 15).

Tabela 15 – Pesos das variáveis das três componentes principais após a exclusão das amostras S20 e S37.

<b>Componentes</b>	<b>%Total de variância</b>	<b>% Acúmulo de variância</b>
<b>PC1</b>	45,22	45,22
<b>PC2</b>	22,22	67,44
<b>PC3</b>	18,22	85,66

No eixo da primeira componente, com 45,22% de variabilidade dos dados foi separado a hesperidina e a naringina com pesos negativos. No eixo da segunda componente (PC2), foi separado com 22,22% da variabilidade dos dados, poncirina e naringenina. E, finalmente, na terceira componente (PC3) com 18,22% de variabilidade foi separado o psoreleno. (Figura 31).



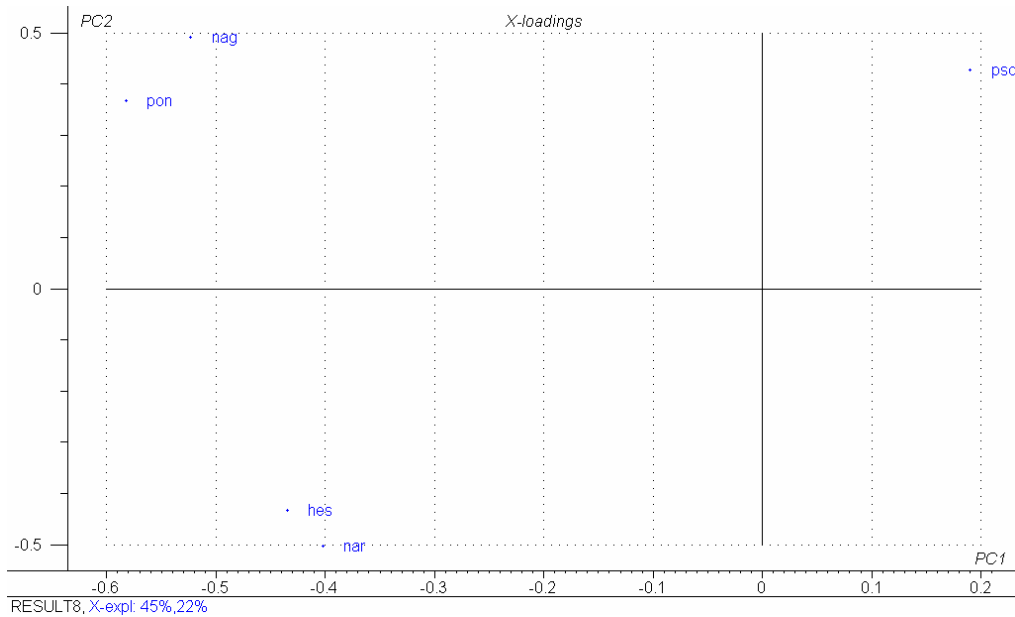


Figura 31 – Projeção do gráfico dos pesos de PC1 x PC2 que juntas descrevem 67,44% da variabilidade total da informação dos dados.

A partir do gráfico da projeção dos escores PC1xPC2 (Figura 32), pode-se perceber a formação de três agrupamentos: o primeiro formado pelas amostras (S1,S2 e S3), o segundo pelas amostras (S7, S8 e S9) e o terceiro representado pelas demais, formando um grupamento maior. Tanto o primeiro como o segundo grupo foram agrupados em decorrência do tratamento no processamento das amostras, ambos os grupos tiveram suas amostras centrifugadas. Ao primeiro, os sucos de laranja foram extraídos de sucos *in natura* extraídos a mão; ao passo que o segundo, refere-se a amostras de sucos centrifugados e industriais. Esse grupo como está situado no segundo quadrante do lado esquerdo superior, foi diferenciado devido os teores de poncirina e naringenina que provavelmente, após a centrifugação concentrou essas amostras em relação as demais para esses flavonóides.

Pelo mesmo tratamento de centrifugação as amostras do segundo agrupamento (S7, S8 e S9) foram concentradas pelos teores de hesperidina e naringina, uma vez que, estas situam-se no terceiro quadrante posição inferior no lado esquerdo.

Como os pesos para o psoraleno são altos e positivos, as amostras que estão situadas no primeiro quadrante são influenciadas pelos teores de psoraleno. Assim, as amostras (S17, S18, S19, S26 e S30) apresentaram teores significativos para

este analito. Verifica-se também que a concentração dos sucos de laranja *in natura* espremidos a maquina, amostras (S40, S41 e S42) não diferiu significativamente das demais amostras de sucos industrializados nem tampouco as amostras de sucos industrializados orgânicos (S13, S14 e S15). Neste conjunto, apenas a amostra S15, apresentou considerável teor de hesperidina como pode ser visto na figura 32.

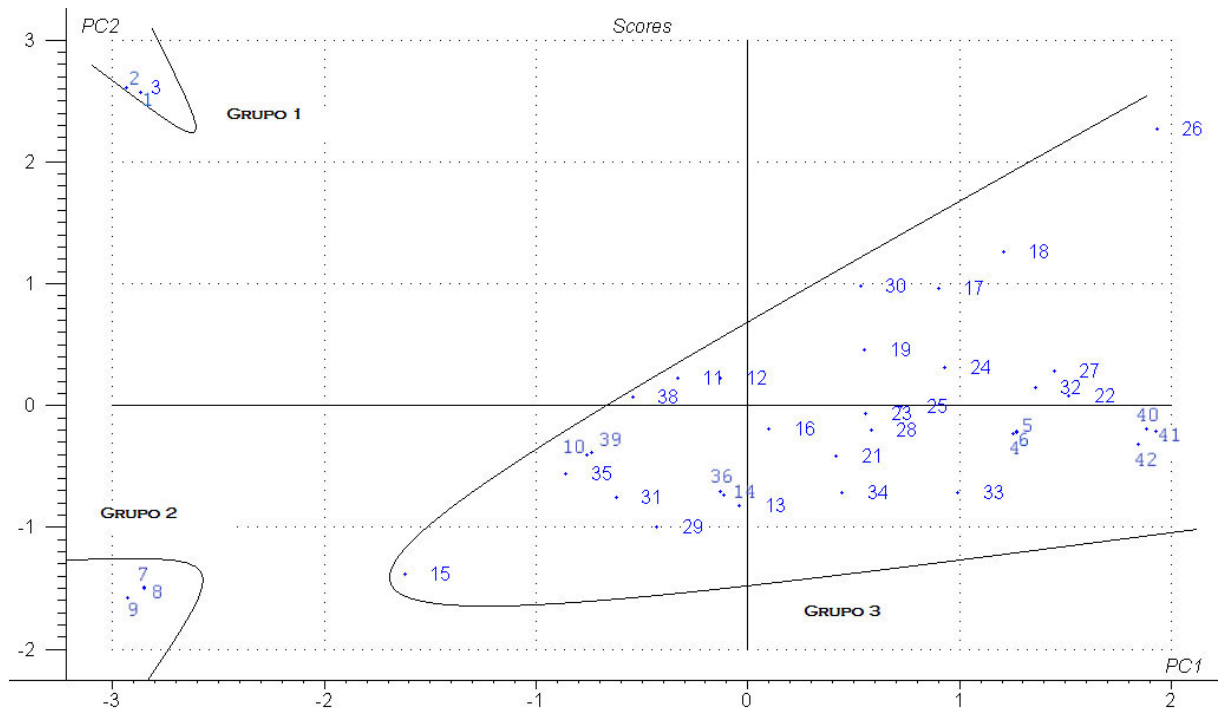


Figura 32 – Projeção do gráfico dos escores de PC1 x PC2 que juntas descrevem 67,44% da variabilidade total da informação dos dados.

### 3.4 ANÁLISE DE AGRUPAMENTOS HIERÁRQUICOS (HCA).

Para a análise de agrupamentos hierárquicos foi utilizada a matriz de resultados normalizada. Procedeu-se estudos exploratórios empregando as seguintes metodologias: (*single linkage, complete linkage, unweighted pair-group, unweighted pair-group leverage* e Ward).

Nos métodos estudados, verificou-se a ocorrência de quatro agrupamentos. O primeiro grupo constituído pelas amostras (S27, S26, S25, S22, S23, S18, S41, S42, S40, S24, S32, S28, S6, S5, S4); o segundo grupo (37, 20), o terceiro (S31, S15,

S35, S34, S36, S39, S29, S10, S9, S8, S38, S7) e o quarto grupo (S17, S14, S19, S13, S33, S16, S21, S11, S30, S12, S3, S2, S1). Conforme verificado na figura 33

Verifica-se que as amostras S1, S2, S3 estão agrupadas, estas são de sucos espremidos a mão tratadas por centrifugação para a extração dos analitos. Fazendo a rotação dos eixos que contém o grupo quatro no sentido para o grupo três, pode-se observar a proximidade com as amostras S7, S8 e S9, estas, são amostras de sucos industrializados também submetidas ao processo de centrifugação. Assim, pode-se sugerir que o procedimento de centrifugação das amostras influencia no seu agrupamento.

O conjunto de amostras (S4, S5, S6) e (S40, S41, S42) representa respectivamente o grupo amostras de suco *in natura* – espremidas a mão e processadas em máquinas. Verifica-se que não houve diferenças significativas para as concentrações dos analitos entre essas amostras uma vez que essas amostras foram agrupadas no mesmo conjunto. Comparando-se resultados os teores dos analitos dos sucos *in natura* com os sucos industrializados, percebe-se que os sucos industrializados apresentam uma maior concentração dos analitos, o que pode ser explicado devido a uma maior compressão do fruto contra o cortador permitindo uma maior extração e adicionalmente, há um ajuste no teor de polpa. Assim, tem-se uma maior concentração dos flavonóides.

O grupo formado pelas amostras de sucos industrializados (S20 e S37) foi evidenciado neste estudo por apresentar elevados teores hesperidina, uma flavanona que caracteriza os sucos de laranja. Essas amostras pertencem a um fabricante, porém, são de lotes diferentes. Possivelmente, durante a extração dos sucos ocorreu uma maior transferência das partes do fruto como o albedo e casca para a mistura de suco uma vez que, essas partes apresentam uma maior concentração desse analito.

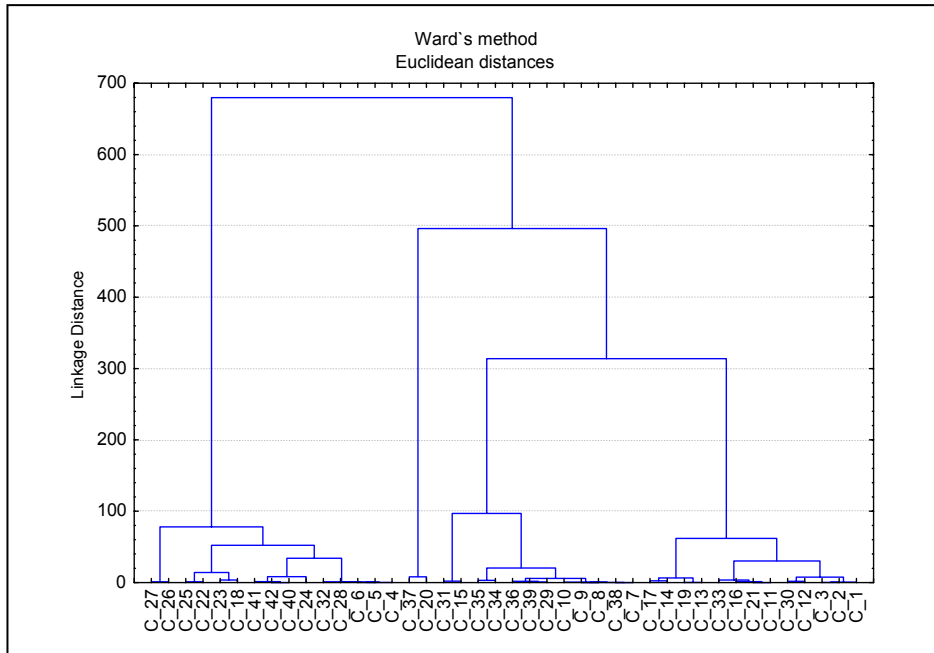


Figura 33a – Dendrograma empregando método Ward.

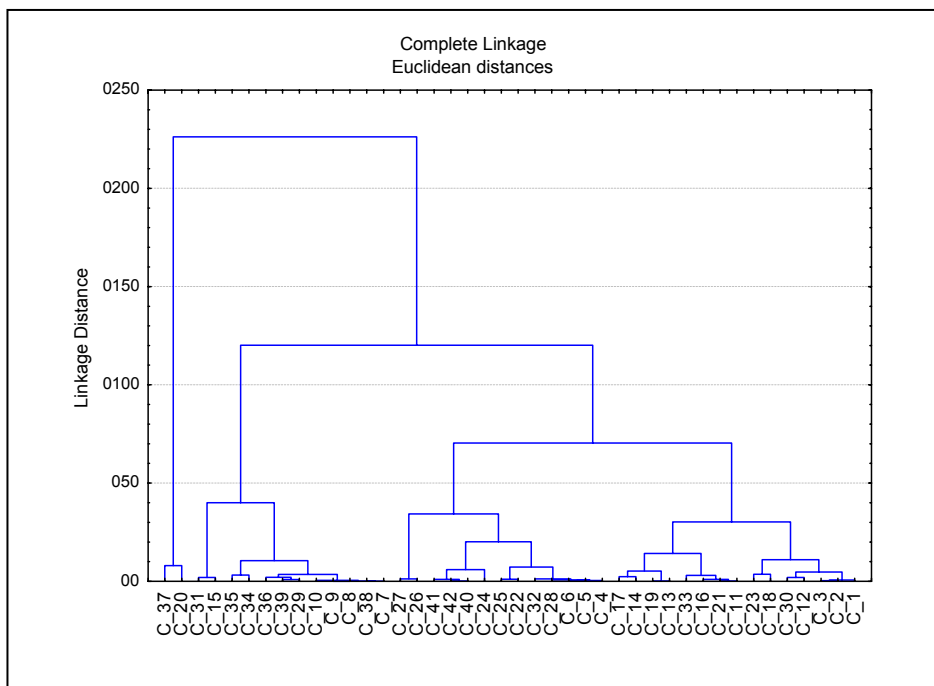


Figura 33b – Dendrograma empregando método Complete Linkage

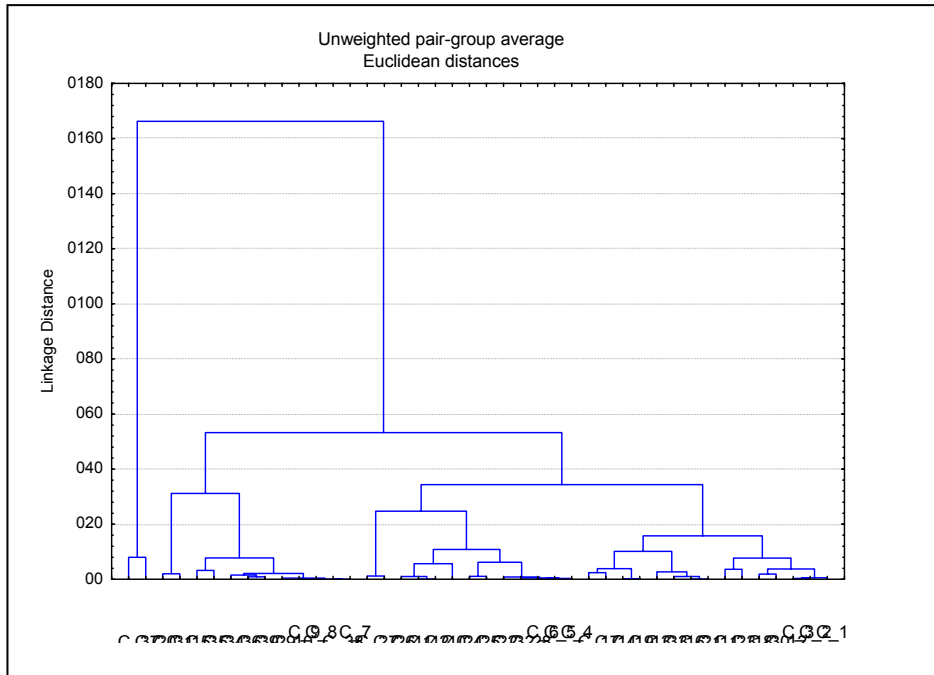


Figura 33c – Dendrograma empregando método Uniweighted pair-group average

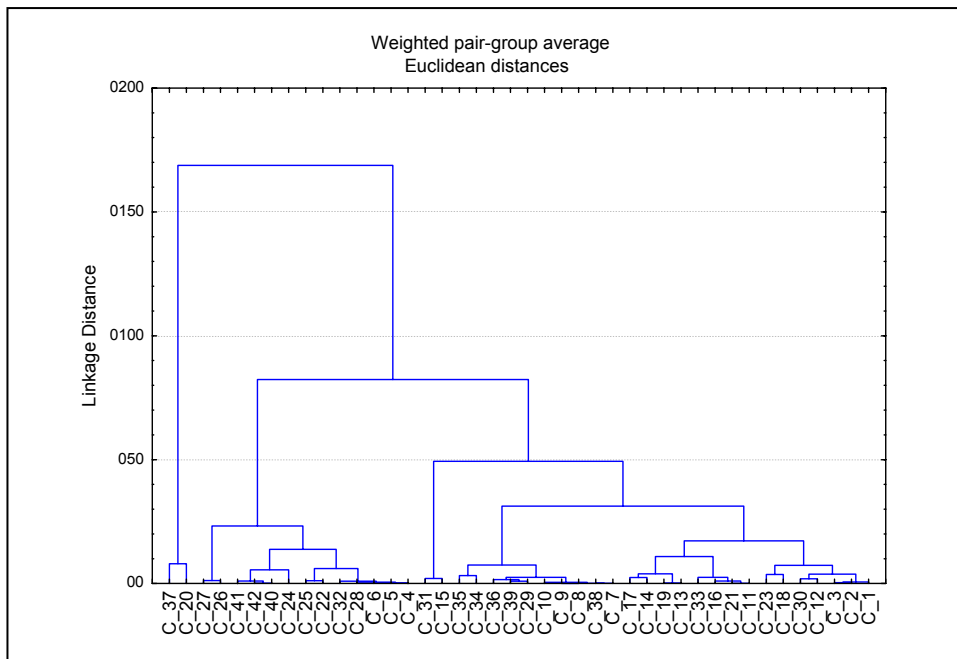


Figura 33d – Dendrograma empregando método Weighted pair-group average

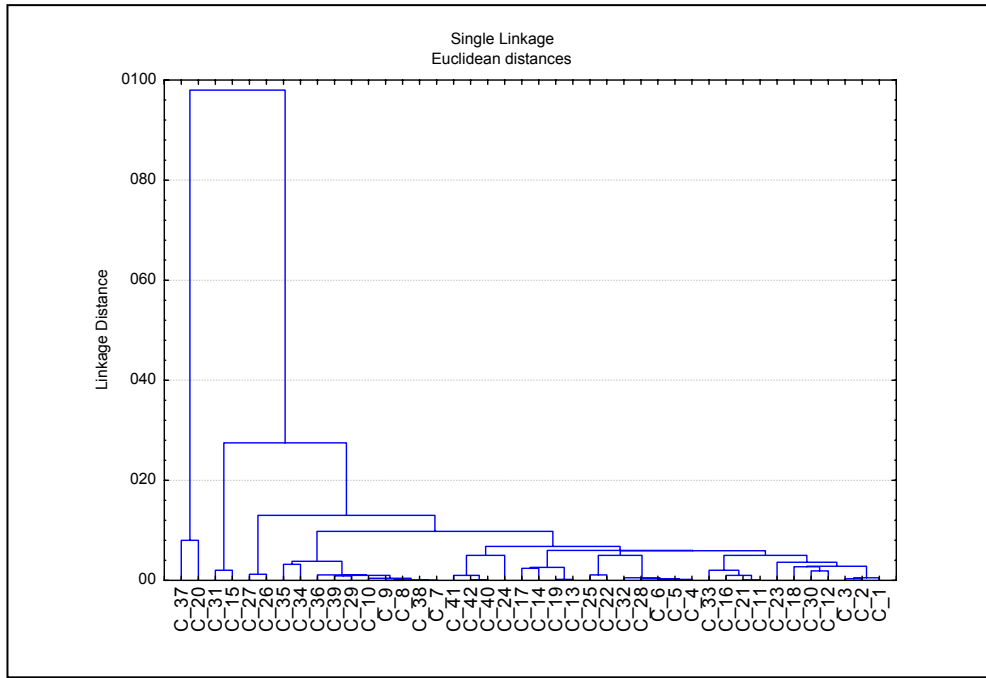


Figura 33e – Dendrograma empregando método Single Linkage

## CAPÍTULO 4

### 4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

As diferenças encontradas nas concentrações das flavanonas nas amostras de sucos de laranja analisados podem ser decorrentes dos meios de obtenção dos sucos (industrializado, espremido a mão e *fresh-in-squeeze*). Alguns extratores utilizados no preparo dos sucos de laranja industrial, separam com mais rigor a casca do albedo, levando a diminuição dos teores destes compostos, o que é justificado pelas indústrias de suco de que a presença destes compostos possibilitam características desagradáveis ao produto, como sabor amargo e turvação levando a rejeição por parte dos consumidores. Os tratamentos aplicados, centrifugação e não centrifugação, além dos fatores intrínsecos as variedades cítricas utilizadas na obtenção dos sucos, também podem ser considerados fatores interferentes.

A técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) mostrou-se útil na avaliação das flavanonas. Os perfis cromatográficos dos flavonóides são importantes informações para avaliar a qualidade e originalidade dos sucos cítricos.

As concentrações de psoraleno encontradas no presente estudo estão abaixo da dose tóxica, 18  $\mu\text{g/g}$  do peso fresco da planta, utilizando como parâmetro de referência à salsa e também inferiores aos valores mínimos permitidos em bebidas não alcoólicas (8  $\mu\text{g/g}$ ).

A presença de psoraleno em alimentos pode ser influenciada por fatores como: a qualidade de estocagem, processos e condições de produção do fruto e também do modo de obtenção dos sucos. Investigações são necessárias para avaliar a influência das condições de armazenamento, tipo de colheita e técnicas agrícolas aplicadas, além de conhecer as tecnologias adotadas na elaboração dos alimentos como medidas preventivas para evitar a ingestão excessiva de psoraleno.

Conforme padrões pré-estabelecidos, os sucos de laranja são obtidos a partir da polpa da laranja doce (*C. sinensis*) e, esta contém concentrações de psoraleno abaixo das concentrações consideradas de risco à saúde humana, razão provável das baixas concentrações registradas nas amostras de sucos de laranja investigadas neste trabalho.

A técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) mostrou-se útil na avaliação do psoraleno em sucos de laranja, porém em algumas amostras as concentrações deste analito estavam abaixo do limite de quantificação.

O sistema líquido – líquido utilizado neste estudo evidencia -se como eficiente nas extrações dos analitos investigados, principalmente por se tratar de matriz complexa. O sistema apresentou-se mais eficaz para os compostos presentes em maiores concentrações (hesperidina, naringenina, naringina e poncirina) como pode ser observado através dos testes de recuperação destes analitos. O psoraleno não foi detectado em algumas amostras, mas o valor encontrado no teste de recuperação está compatível com os valores da literatura. Porém, o sistema é laborioso com relação ao tempo de execução das extrações, podendo equacionar esta restrição com a adaptação de sistemas de menor capacidade o que também colabora com a redução do consumo dos solventes.

As informações contidas nesse trabalho poderão servir de subsídio para o controle de qualidade dos sucos cítricos produzidos no país, fornecendo aos fabricantes mecanismos de avaliação, garantia da qualidade, além da possibilidade de auxiliar os consumidores com informações nutricionais complementares em relação à composição do produto.

O estudo exploratório de flavanonas e psoraleno empregando metodologias de análises multivariadas (PCA e HCA) possibilitou representar as amostras em agrupamentos distintos com boa representação espacial e coerência nas informações. Verificou-se que não há uniformidade nas concentrações dos vários constituintes uma vez que as amostras apresentaram teores consideravelmente distintos. O estudo da PCA evidenciou que os fabricantes de sucos podem ter utilizado a mesma espécie de laranja para produção dos sucos. Assim, esta metodologia pode ser aplicada para identificar os sucos de laranja dos demais sucos cítricos.

A aplicação de ambos os métodos, univariado e multivariado, melhoram e complementam as informações.



## REFERÊNCIAS

ABBASI, S., ZANDINI, P., MIRBAGHERI, E. Quantification of limonin in Iranian orange juice concentrates using high-performance liquid chromatography and spectrophotometric methods. **Eur Food Res Technol.** v. 221. 2005. p. 202 - 205.

ADELMANN, J. Própolis: variabilidade composicional, correlação com a flora e bioatividade antimicrobiana/antioxidante. Tese Mestrado. Curitiba. 2005. p.186

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA ANVISA. Resolução nº 16, de 3 de dezembro de 1999. Aprova o regulamento técnico de procedimentos para registro de alimentos e ou novos ingredientes.

AL-BARWANI, F., ELTAYEB, E. Antifungal compounds from induced *Conium maculatum* L. plants. **Biochemical Systematics and Ecology.** 2004. v. 32. n.12. p. 1097 -1108.

ALONSO, F. J. G. Evaluación in vitro e in vivo de la funcionalidad de un producto rico en antioxidantes. 2005. Tese Doctoral. Universidade de Murcia – Faculdade de Veterinaria y Ciencia y Tecnologia de los alimentos. 201p.

AMEER, B., WEINTRAUB, R. A. Drug interactions with grapefruit juice. **Clinical Pharmacokinetics.** 1997. v.33. n. 2. p. 103 -121.

ANDERSEN, O. M.; Jordheim, M. The Anthocyanins. In *Flavonoids Chemistry, Biochemistry and Applications*; Andersen, O. M., Markham, K. R., Eds.; CRC Press, Taylor and Francis: Boca Raton, FL, 2006, pp 471–551.

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

ARGUDO, C. R. Componentes nutricionales y biactivos em cítricos. In: **Agrícola. Qualidade em postcosecha.** Nº 12. Colegio oficial de ingenieros técnicos agrícolas y peritos agrícolas de Valencia y Castellón. 2004. p.18 -20.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS EXPORTADORES DE CÍTRICOS. ABECITRUS. 2007. Disponível em: <\\E:\sucoprodução2007Clipping Abecitrus-htm>. Clipping Abecitrus. Acesso em: 24 maio 2007.

ATAGA, A. E., EPTON, H. A.S., FROST, R. R. Interaction of vírus-infected celery and *Septoria apiicola*. **Plant Pathology.** 1999. v. 48. p. 620 - 626.

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. **Journal Agricultural Food Chemistry**. 2004. v. 52. p. 5303 - 5308.

Australian adverse drug reactions bulletin. Adverse drug reactions advisory committee (ADRAC). 2002. v.21. n. 4.

BAILEY D.G., ARNOLD, J. M. O., SPENCER, J. D. Grapefruit juice-drug interaction. **British Journal of Clinical Pharmacology**. 1998. v. 46. n. 20. p. 101 -110.

BAILEY D. G., SPENCER J. D., MUNOZ, C., ARNOLD, J. M. O. Interaction of citrus juice with felodipine and nifedipine. **Lancet**. 1991. v. 337. n. 8736. p. 268 - 269.

BAILEY D. G., SPENCER J. D., EDGAR B. Ethanol enhances the hemodynamic effects of felodipine. **Clin Invest Med**. 1989. v.12. p. 357 - 362.

BARROS NETO, B., SCARMINIO, I. S., BRUNS, R. E. *Como fazer experimentos: Pesquisa e Desenvolvimento na Ciência e na Indústria*. Editora da Unicamp: Campinas. 2001.

BAUGH, W. P., KUCABA, W. D., JR, BARNETTE. D. Phytophotodermatitis. **Emedicine**. 2007. p. 1-12.

BELAJOVÁ, E., SUHAJ, M. Determination of phenolic constituents in citrus juice: method of high performance liquid chromatography. **Food Chemistry**. 2004. v. 86. p. 339 - 343.

BENAVENTE – GARCIA, O., CASTILLO, J., MARIN, F. R., ORTUNO, A., DEL RIO, J. A. Uses and properties of *Citrus* flavonoids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 1997. v. 45. n. 12. p. 4505 - 4515.

BEEBE, K. R., PELL, R. J., SEASHOLT, M.B. *Chemometrics: a practical guide*. NewYork: John Wiley & Sons. 1998. 348 p.

BRIAN, C. F., ARNASON, T., BRIGGS, C. J. Natural health products and drug disposition. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol**. 2005. v. 45. p. - 226.

BROWN, S. D. Has the chemometrics revolution ended? Some views on the past, present and future of chemometrics. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**. 1995. v. 30. n. 1. p. 49 - 58.

BOADI, W. Y., IYERE, P. A., ADUNYAH, S. E. Effect of quercetin and genistein on copper-and iron-induced peroxidation in methyl linolenate. **J. Appl. Toxicol.** 2003. v. 23. p. 363 - 369.

BRADDOCK, R. J., BRYAN, C. R., BURNS, J. K. Capillary eletrophoresis analysis of orange juice pectinesterases. **Journal Agricultural Chemistry.** 2001. 49. p. 846 - 850.

BRADDOCK, R. J., GOODRICH, R. Major by products of the Florida citrus processing industry. In: **IFAS EXTENSION.** 2006. Florida. University of Florida. p. 4.

BRANCACCIO, R. R., ALVAREZ, M. S. Contact allergy to food. **Dermatologic Therapy.** 2004. v.17. p. 302 - 313.

BRASIL. Instrução Normativa nº 1, de 7 de janeiro de 2000. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 10 jan. 2000. Seção 1, p. 54 - 58.

BRONNER, W. E ; BEECHER, G. R.Extraction and measurement of prominent flavonoids in orange and grapefruit juice concentrates. **Journal of Chromatography A.** 1995. volume 705. n. 2. p. 24 - 256

BRUNETON, J. C. Flavonoides. In: Farmacognosia: Fitoquímica plantas medicinales. Segunda edicion. Espanha: Acribia S. A. 2001. p. 305 - 341.

BRUNETON, J. C. – Coumarins. In:-----Pharmacognosy, Phytochemistry, Medicinal Plants. Paris: Intercepted Ltd. 1995. p.229 - 240

CACCAMESE, S., CARUSO, C., PARRINELLO, N., SAVARINO, A. High-performance liquid chromatographic separation and chiroptical proprieties of the enantiomers of naringenin and other flavanones. **Journal Chromatography A.** 2005. n.1076. p. 115 -162.

CALABRÒ, M. L., GALTIERI, V., CUTRONEO, P., TOMMASINI, S., FICARRA, P., FICARRA, R. Study of the extraction procedure by experimental design and validation of a LC method for determination of flavonoids in *Citrus bergamia* juice. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.** 2004. v. 35. p. 349 - 363.

CAMPBELL, J. K., KING, J. L., HARMSTON, M.,LILA, M. A., ERDMAN, J. W. JR. Synergistic effects of flavonoids on cell proliferation in Hepa-1c1c7 and LNCaP cancer cell lines. **Journal of Food Science- JFS s:** sensory and nutritive qualities of food. 2006. v. 71. n. 4. p. 358 - 363.

CARRILO, L. Los hongos de los alimentos y forrajes. 2005. Salta. v. 1. 165p.

CARISTI, C., BELLOCCO, C., GARGIULLI, C., TOSCANO, G., LEUZZI, U. Flavone-di-C-glycosides in *citrus* juices from Southern Italy. **Food Chemistry**. 2006. v. 95. p. 431 - 437.

CAUTELA, D., LARATTA, B., SANTELLI, F., TRIFIRÓ, A., SERVILLO, L., CASTALDO, D. Estimating bergamot juice adulteration of lemon juice by high-performance liquid chromatography (HPLC) analysis of flavanone glycosides. **Journal Agricultura Food Chemistry**. 2008. v. 56. p. 5407 - 5414.

CHIANG, L. C., CHIANG, W., LIU, M. C., LIN, C.C. *In vitro* antiviral activities of *Caesalpinia pulcherrima* and its related flavonoids. **J. Antimicrob. Chemother.** 2003. v. 52. n. 2. p. 194 - 198.

CLIFFORD, M.N. Miscellaneous phenols in food and beverages – nature, occurrence and dietary burden. **Journal of the Science of Food Agriculture**. 2000. v. 80. p. 1126 -1137.

COLL, M. D., COLL, L., LAENCINA, J., TOMÁS-BARBERRÁN, F. A. Recovery of flavanones from wastes of industrially processed lemons. **Zeitschrift Lebensmittel Forsch A**. 1998. v. 206. p. 404 - 407.

COORDENADORIA DE ASSISTÊNCIA TÉCNICA INTEGRAL - CATI. Cultivar Notícias. Iniciada semana de combate ao HLB. 2007. Disponível em: <<http://cati.sp.gov.br>>. Acesso: 10.jun.2007.

Commission Directive 95/34/EC, adding to annex II, entry N. 358 a new restriction: In sun protection and bronzing products, furocoumarins shall be below 1mg/kg. In a more recent proposal (SCCNFP/0392)00 of September 25, 2000

Committees on Toxicity Mutagenicity carcinogenicity of chemicals in food consumer products and the environment. 1994. Annual Report.

CORRÊA NETO, R. S., FARIA, J. A. F. Fatores que influem na qualidade do suco de laranja. **Cênc. Tecnol. Aliment**. 1999. v. 19. n.1. p. 153 -161.

COSTA, A. F. Farmacognosia., Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1994. p. 591.

Council Directive of 22 June 1988 on the approximation of the laws of the member states relating to flavourings for use in foodstuffs and to source materials for their production. **Official Journal of the European Communities**, 5.7. 88. No. L 184/61.

COUVÉ – PRIVAT, S., MACE, G., ROSSELI, F., SAPARBAEV, M. K. Psoralen – induced DNA adducts are substrates for the base excision repair pathway in human cells. **Nucleic Acids Research**. 2007. v. 35. n. 17. p. 5672 - 5682.

DAHAN, A., ALTMAN, H. Food-drug interaction: grapefruit juice augments drug bioavailability – mechanism, extent and relevance. **European Journal of Clinical Nutrition**. 2004. v. 58. p. 1- 9.

DAVID, T.J. Adverse reactions and intolerance to foods. The British Council. 2000. **British Medical Bulletin**. v. 56. n.1. p. 34 - 50.

DE WIEL, A., GOLDE, P. H. M., HARTE H. Ch. Blessings of the grape. **European Journal Internal Med**. 2001. v. 12. p. 484 - 489.

DFG - Senate Commission on Food safety. Toxicological assessment of furocoumarins in foodstuffs. (SKLM). **Mol. Nutr. Food Res**. 2007. v. 51. n. 3. p. 367 - 373.

DFG – Senate Commission on Food safety. Toxicological assessment of furocoumarins in foodstuffs. (SKLM). Kaiserslautern, Germany: Kaiserslautern University, Department of Chemistry: Food Chemistry and Environmental technology. 2006. 29p.

DEL CARO, A., PIGA, A., VACCA, V., AGABBIO, M. Change of flavonoids, vitamin C and antioxidant capacity in minimally processed citrus segments and juices during storage. **Food Chemistry**. 2004. v. 84. p. 99 -105.

DELANEY, B., PHILLIPS, K., VASQUEZ, C., WILSON, A., COX, D., WANG, H-B., MANTHEY, J. Genetic toxicity of a standardized mixture of citrus polymethoxylated flavones. **Food and Chemical Toxicology**. 2002. v. 40. p. 617- 624.

Department of Agriculture (USDA). Database for the flavonoid content of selected foods. Release 2. August 2006. U. S. Agricultural Research Center Nutrient Data laboratory. p. 1 - 64. Disponível em: <<http://www.ars.usda.gov/nutrientdata>>.

DERCKS, W., TRUMBLE, J., WINTER, C. Impact of atmospheric pollution on linear furanocoumarin content in celery. **Journal of Chemical Ecology**. 2005. v. 16. p. 443 - 454.

DESIDERIO, C., ROSSI, A., SINIBALDI, M. Analysis of flavanone-7-O-glycosides in citrus juice by short-end capillary electrochromatography. **Journal Chromatography A**. 2005. v. 1081. p. 99 -104.

DESLAURIESRS, I. Recovery, separation and characterization of phenolic compounds and flavonoids from maple products. 2000. 105 p. Tese Doutorado. Department of food science and agricultural chemistry. Mc.Gill University, Montreal Québec.

DI MAJO, D., GIAMMANCO, M., GUARDIA, M., TRIPOLI E., GIAMMANCO, S., FINOTTI, E. Flavonones in *Citrus* fruit: structure-antioxidant activity relationships. **Food Research International**. 2005. v. 38. p.1161 -1166.

Distribuição e armazenamento de psoralenos: os psoralenos.[http://64.233.179.104/transate\\_c?hl=pt-BR&sl=em&u=http://people.cornell.edu/pages](http://64.233.179.104/transate_c?hl=pt-BR&sl=em&u=http://people.cornell.edu/pages). Acesso:20.06.2008. p.1-3.

DIWARA, M. M., KULKOSKY, P. J. Reproductive toxicity of the psoralen. **Pediatric Pathology in Molecular Medicine**. 2003. v. 22. n. 3. p. 247 - 258.

DIWARA, M. M., CHAVEZ, K. J., SIMPLEMAN, D., WILLIAMS, D. E., FRANKLIN, M. R., HOYER, P. B. The psoralens adversely affect reproductive function in male wistar rats. **Reproductive Toxicology**. 2001. v. 15. p. 137 - 144.

DIWARA, M. M., KULKOSKY, P. J., WILLIAMS D. E., MCCROY, S., ALLISON, T. G., MARTINEZ, L. A. Mammalian toxicity of 5-methoxypsoralen and 8-methoxypsoralen, two compounds used in skin photochemotherapy. **Journal of Natural Toxins**. 1997a. v. 6. p. 183 - 192.

DIWARA, M. M., ALLISON, T., KULKOSKY, P., WILLIAMS, D. E. Psoralen – induced growth inhibition in wistar rats. **Cancer letters**. 1997b. v. 114. p. 159 – 160.

DOMANY, E. Cluster Analysis of Gene Expression Data. **Journal of Statistical Physics**. 2003. v. 110. p. 3 - 6.

DREWNOSWSKY, A., GOMES-CARNEROS, C. **American Journal Clinical Nutr.** 2000. v. 72. p. 1424 - 35.

DUGO, P., MONDELLO, L., COGLIANDRO, E., VERZERA, A., DUGO, G. On the genuiness of citrus essential oil (*Citrus aurantium* L). **Journal of Agricultural Food chemistry**. 1996. v. 44. p. 544 - 549.

EDWARDS, D. J., BERNIER, S. M. naringin and naringenin are not the primary CYP3A inhibitors in grapefruit juice. **Life sciences**. 1996. v. 59. n. 13. p. 1025 -1030.

Eletronic textbook of dermatology—Botanici Dermatologia, Phytophotodermatitis <<http://telemedicine.org/botanica/bot5.htm>> acesso:06.12.2007. p. 1-13.

ELLIS, A. L. Regulatory perspective on *in vitro* assay as predictors of phototoxicity and photo co-carcinogenicity. **International Journal of Toxicology**. 1998. v. 17. p. 571 - 575.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA EMBRAPA. Sistema de produção de citros para o nordeste. 2006. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Citros/Citrosnordeste/clim...>>. Acesso em: 18 ago.2006.

ERLUND, I. Chemical analysis and pharmacokinetics of the flavonoids quercetin, hesperidin and naringenin in humans. Dissertation academic.University of Helsink. 2002. 92 p.

European Pharmacopoeia. 3. ed. Strasboug : Council of Europe, 2000. Supplement.

EVANS, D. Beverage processing: good chemicals left behind. In: the cornucopia – American chemical society. Division of agricultural and food chemistry. New material deadline for fall. **Cornupia**. may 15 2006. Spring 2006. The cornucopia. 23ist ACS national meeting. Atlanta. Georgia. p.19.

FABRE, N., RUSTAN, I. Determination of flavone, flavonol, and flavanone aglycones by negative ion liquid chromatography electrospray ion trap mass spectrometry. **J. American Society for Mass Spectrometry**. 2001. v. 12. p. 707 - 715.

FAVEREST, P., PEREIRA, A. P. G., DAVID, R. M. Informe setorial ° 7 – área de operações industriais – AO1. Gerência setorial de agroindústria.1996. BNDES. 25.03.96. p. 1 - 5.

FERREIRA, J. O. Estudo da viabilidade técnico-econômica da produção industrial da aguardente do licor de laranja. Dissertação de mestrado. 2005. 84p. Araraquara – SP.

FERREIRA, M. M. C., MONTANARI, C. A., GAUDIO, A. C. Seleção de variáveis em QSAR. **Química Nova**. 2002. v. 25. n. 3. p. 439 - 448.

FERREIRA, M. M.C., MELO, M. S., ANTUNES, A. M., VOLPE, P. L. O. "Quimiometria I: calibração, multivariada, um tutorial". **Química Nova**. 1999. v. 22. p. 724 - 731.

FERREYRA, E. Mitos e Fraudes. 2007. Capítulo 14 – "Natural vs. Sintético". Fundação Argentina de Ecologia Científica. (FAEC). p. 297 - 326.

FRÉROT, E., DECORZANT, E. Quantification of total furocoumarins in citrus oils by HPLC coupled with UV, fluorescence and mass detection. **Journal Agricultural Food Chemistry**. 2004. v. 52. p. 6879 - 6886.

FRUTICOM – O portal do Mercado de frutas & Cia. Mapeamento estratégico de negócios. 2007. Disponível em:<<http://www.fruticom.com.br/fruticom2/noticias.php?id=1440&cat=6>>. Acesso em: 22.05. 2007.

FUKUDA, K., GUO, L-Q., OHASHI, N., YOSHIKAWA, M., YAMAZOE, Y. Amounts and variation in grapefruit juice of the main components causing grape fruit-grug interation. **Journal of Chromatography B**. 2000. v. 741. p. 195 - 203.

FUHR, U., KLITTICH, K., STAIB, A. H. Inhibitory effect of grapefruit juice and its bitter principal, naringenin, on CYP1A2 dependent metabolism of caffeine in man. **British Journal of Clinical Pharmacology**. 1993. v. 35. n. 4. p. 431- 436.

FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE - FURG – Embalagem para bebidas e alimentos. 2006. Disponível em:<[www.furg.br/portaldeembalagens/quatro/sucos.html](http://www.furg.br/portaldeembalagens/quatro/sucos.html)> Acesso em 25 out. 2006.

GARCIA, F. Z., GONZÁLEZ, T. I. M., SANTAMARÍA, O. L. Flavonóides y fitoterapia. **Revista de Fitoterapia**. 2002. v. 2. n. 1. p. 21 - 32.

GARDANA, C., GUARNIERI, S., RISO, P., SIMONETTI, P., PORRINI, M. Flavanone plasma pharmacokinetics from blood orange juice in human subjects. **British Journal of Nutrition**. 2007. v. 98. p.165 -172.

GEISSMAN, T. S; HINREIER, C. D. In: (DE WIEL, et al., 2001; BRUNETON, 2001).

GEL-MORETO, N., STEICH, R., GALENSA, R. Chiral separation of six diastereomeric flavanone-7-O-glycosides by capillary eletrophoresis and analysis of lemon juice. **Journal of Chromatography A**. 2001. v. 925. p. 279 - 289.



GIRENNAVER, B., PAULOSE, S. M., JAYAPRAKASHA, G. K., BHAT, N., PATIL, B. Furocoumarins from grapefruit juice and their effect on human CYP 3A4 and CYP 1B1 isoenzymes. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. 2006. v. 14. p. 2606 – 2612.

GOMES, D. C. L., AZEVEDO, R. Fitonutrientes, principais fontes alimentares. **Nutricia**. Associação Portuguesa dos nutricionistas. 2005. n. 5. p. 28 - 29.

GONÇALVES, N. E. L., ALMEIDA, Jr., HALLAL, E. C., AMADO, M. Experimental phytophotodermatitis. **Photodermatology Photoimmunology & Photomedicine**. 2005. v. 21. p. 318 - 321.

GOOSEN, T. C., CILLIÉ, D., BAILEY, D.G., CHONGOWOO, YU., HE KAN. Bergamottin contribution to the grapefruit juice-felodipine interaction and disposition in humans. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**. 2004. v. 76. n. 6. p. 607 - 617.

GORINSTEIN, S., HANNG, D., LEONTOWISZ, H., LEONTOWICZ, M., YAMAMOTO, K., SOLIVA-FORTUNY, R., BELLOSO, O. M., MARTINEZ AYALA, A. L. M., TRAKHTENBERG, S. Determination of naringin and hesperidin in citrus fruit by high-performance liquid chromatography. The antioxidant potential of citrus fruit. **Acta Chromatographica**. 2006. n. 17. p. 108 -124.

GRAY, A. I., WATERMAN, P. G. Coumarins in the *Rutaceae*. **Phytochemistry**. 1978. v. 17. p. 845 - 864.

GRAUMLICH, T. R., MARCY, J. E., ADAMS, J. P. Aseptically packaged orange juice and concentrate: a review of the influence of processing and packaging conditions on quality. **Journal Agricultural Food Chemistry**. 1986. v. 34. p. 402 - 405.

GUIDO, D. L. Desenvolvimento de uma metodologia para a determinação da naringenina em frutos e seus derivados. 5ª. Jornada Bebidas e Saúde. UNICER – Bebidas de Portugal, Leça do Balio. 14 Fevereiro 2008. Instituto de bebidas e saúde.

GUO, L. Q., Yamazoe, Y. Inhibition the citocromo P450 in furanocoumarin in juice orange and herbal medicines. **Acta Pharmacological Sinica**. 2004. v. 25. n. 2. p. 129 -136.

GUO, L. Q., Fukuda, K., Yamazoe, Y. Role of furanocoumarin derivatives on grapefruit juice-mediated inhibition of human CYP3A activity. **Drug Metabolism and Disposition**. 2000. v. 28. n. 7. p. 766 - 771.

Internacional Conference on Harmonization – ICH. Guideline Q2B: Validation of Analytical Procedures: Methodology. Genebra: International Conference on

Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human use, 1996. p 6 -13.

HAIR, Jr, J. F., ANDERSON, R. E., TATHAM, R. L., BLACK, W. C. Análise multivariada de dados. 2006. Bookman, 5ª ed. Porto Alegre – RS, 593 p.

HARBONE, J. B., WILLIAMS, C. A. Advances in flavonóide research since 1992. **Phytochemistry**. 2000. v. 55. p. 481 - 504.

HAVSTEEN, B. H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. **Pharmacology & Therapeutics**. 2002. v. 96. p. 67 - 202.

HE, XIAN-GUO., LIAN, LI-ZHI., LIN LONG-ZE., BERNART, M. W. High-performance liquid chromatography-electrospray mass spectrometry in phytochemical analysis of sour orange (*Citrus aurantium* L). **Journal of Chromatography A**. 1997. v. 791. p.127 -134.

HERTOG, M. G. L., FEESKENS, E. J. M., KROMHOUNT, D. Antioxidant flavonols and coronary heart disease risk. **The Lancet**. 1997. v. 349. n. 953. p. 699.

HERTOG, M. G. L., HOLLMAN, P. C. H., KATAN, M. B. Analysis and health effects of flavonoids. **Food Chemistry**. 1996. v. 57. n. 1. p. 43 - 46.

HERTOG, M. G. L., FEESKENS, E. J. M., KROMHOUNT, D., HOLLMAN, P. C. H., KATAN, M. B. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen elderly study. **The Lancet**. 1993. v. 342. p. 1007 - 1011.

HERTOG, M. G. L., HOLLMAN, P. C. H., VENEMA, D. P. optimization of a quantitative HPLC determination of potentially anticarcinogenic flavonoids in vegetables and fruit. **Journal Agricultural Food Chemistry**. 1992. v. 40. p.1591-1598.

HO, PING-CHUEN., SAVILLE, DJ. Inhibition of CYP3A4 activity by grapefruit flavonoids, furanocoumarins and related compounds. **J. Pharm. Pharmaceut. Sci.** 2001.v. 4. n.3. p. 217 - 227.

HO, P.C., SAVILLE, D.J., COVILLE, P.F., WANWIMOLRUK, S. Content of CYP3A4 inhibitors, naringin, naringenin and bergapten in grapefruit and juice products. **Pharmaceutica Acta Helvetiae**. 2000. v. 74. p. 379 - 385.

HONDA, Y., USHIGOME, F., KOYABU, N., MORIMOTO, S., SHOYAMA, Y., UCHIUMI, T., KUWANO, M., OHTANI, H. Effects of grapefruit juice and orange

components on P – glycoprotein – and MRP2-mediated drug efflux. **British Journal of Pharmacology**. 2004. v. 143. p. 856 - 864.

HOROWITZ, R. M., GENTILI, B. Flavonoid constituents of *Citrus*. In. Nagy, P. E. Shaw. VELDHUIS, M. K. **Citrus Science and Technology**. 1977. v. 1. p. 397 - 426.

HUBER, L. LC-GC Int. 1998. 11. 96.

IHA, M. H., FÁVARO, R.S., OKAD, M. M.; PRADO, S. P. T., BERGAMINI, A. M. M., GARRIDO, N. S. Physicochemical and sanitary-hygirnic evluation of fresh bottled and pasteuried ornge juices. **Rev. linst. Adolfo Lutz**. 2000. v. 59. n. 1/2. p. 39 - 44.

IVIE, G. W., HOLT, D. L., IVEY, M. C. Natural toxicants in human foods: psoralen in raw and cooked parsnip root. **Science**. 1981. v. 213. p. 910 - 990.

JACOBSON, K.A., STEFANO, M., MANTHEY, J., PATRICK, O., XIAO-DUO, Ji. Interactions of flavonoids and others phytochemical with adenosine receptors. **Journal of Medicinal Chemistry** . 1996. v. 39. n. 3. p. 781 - 788.

JAGETIA, G.C., REDDY , T. K. The grapefruit flavanone naringin protects against the radiation induced genona intability in the mice bone marrow: a micronucleus study. **Mutation Research**. 2002. v. 519. p. 37 - 48.

JOHNSON, G. W., EHRLICH, R. State of the art report on multivariate chemometric methods in environmental forensics. **Environmental Forensics**. 2002. v. 3. n. 1. p. 59 - 79.

JUSTESEN, U., KNUTHSEN, P. Composition of flavonoids in fresh herbs and calculation of flavonóide intake by use of herbs in traditional Danish dishes. **Food Chemistry**. 2001. v. 73. p. 245 - 250.

JUSTESEN, U., KNUTHSEN, P., LETH, T. Quantitative analysis of flavonols, flavones and flavanones in fruit in vegetables and beverages by high – performance liquid chromatogaghy with photo-diode array and mass spectrometric detection. **Journal of Chromatography A**. 1998. v. 799. p. 101 - 110.

JUSTESEN, U., KNUTHSEN, P., LETH, T. Determination of plant polyphenols in Danish foodstuff by HPLC- UV and LC – MS detection. **Cancer Letters**. 1997. v. 114. p. 165 - 167.

KELEBEK, H., SELLI, S., CANCAS, A., CABAROGLU, T. HPLC determination of organics acids, sugars, phenolic compositions and antioxidant capacity of orange

juice and orange wine made from a tuckish cv. Kozan. **Microchemical Journal**. 2009. v. 91. p. 187 - 192.

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 Chemistry**. 2008. v. 107. p. 1710 - 1716.

KIANI, J., IMAM, S. Z. Medicinal importance of grapefruit juice its interaction with various drugs. **Nutrition Journal**. 2007. v. 6. n. 33. p.1 - 9.

KANAZE, F. I., GABRIELI, C., KOKKALOU, E., GEORGARAKIS, M., NIOPAS, I. Simultaneous reversed phase high-performance liquid chromatographic method for the determination of diosmin. **Journal Pharm. Biomed. Anal.** 2003. v. 33. p. 243 - 249.

KAWAI, S., TOMANO, Y., KATASE, E., OGAWA, K., NONOMURA-NAKANO, M., NESUMI, H., YOSHIDA, T., SUGIURA, M., YANO, M. Quantitative study of fruit flavonoids in Citrus Hybrids of King (*C. nobilis*) and Mukaku Kishu (*C. kinokuni*). **Journal Agricultural Food Chemistry**. 2001. 49. p. 3982 - 3986.

KAWAI, S., YASUHIKO, T., ERIKO, K., KAZUNORI, O., MASAMICHI Y. Quantification of flavonoid constituents in *Citrus* fruits. **Journal Agricultural Food Chemistry**. 1999. v.47. n. 9. p. 3565 - 3571.

KOH, D., ONG, C-N. Phytophotodermatitis due to the application of *Citrus hystrix* as a Fol. Remedy. **British Journal of Dermatology**. 1999. v. 4. n.140. p. 737 - 738.

KUSKOSKI, E. M., ASUERO, A. G., TRONCOSO, A. M. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante em pulpa de frutas. **Ciênc. Tecnol. Aliment.** 2005. v. 25. n. 4. p. 726 -732.

KUSKOSKI, E. M., SPENCE, J. D., JORDAN, J., WETMORE, S., FREEMAN, D. J., PICHÉ, L., SERRATORE, P. HDL-cholesterol-raising effect of orange juice in subjects with hypercholesterolemia. **American Journal Clinical Nutr.** 2000. v. 72. p. 1095 -1100.

LAMPE, J. Health effects of vegetables and fruit: assessing mechanisms of action in human experimental studies. **American Journal Clinical Nutr.** 1999. v. 70. p. 475 - 479S.

LIMA, R. Genes que protegem a agricultura. Agência Anhanguera. Correio popular/caderno especial. **CENÁRIO XXI 2006**. Disponível em

<[http://www.cpopular.com.br/cenarioxxi/conteudo/mostra\\_noticia.asp?noticia=1450288&ar..](http://www.cpopular.com.br/cenarioxxi/conteudo/mostra_noticia.asp?noticia=1450288&ar..)>. Acesso em: 14 .09. 2006.

LEUZZI, U., CARISTI, C., PANZERA, V., LICANDRO, G. Flavonoids in pigmented orange juice and second – pressure extracts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 2000. v. 48. n. 11. p. 5501 - 5506.

LJUNGGREN. B. Severe phototoxic burn following celery ingestion. **Arch Dermatol**. 1990. v. 126. p. 1334 -1336.

LOPES, 2003 R. M., OLIVEIRA, T. T. de., NAGEM, T. J., PINTO, A. de S. Flavonóides. Farmacologia de flavonóides no controle hiperlipidêmico em animais experimentais. **BIO Tecnologia Ciência & Desenvolvimento**. 2000/2003. v. 17. p. 18 - 22.

LOPEZ-LAZARO, M. Flavonoids as anticancer agents: stucture-activity relationship study. **Curr. Med. Anti-Cancer Agents**. 2002. v. 44. p. 95 -101.

LORENZI, H., SARTORI,S., BACHER, L.B., LACERDA, M. Frutas Brasileiras e Exóticas Cultivadas (de consumo in natura). Ed. Plantarum de Estudos da Flora Ltda., Nova Odessa, São Paulo, 2006, 572pp.

LOURENÇO, M. V. Estudo comparativo dos constituintes químicos de *Brosimum gaudichaudii* Trécul e do medicamento “V”. 2001. Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho”. Instituto de Química de Araraquara. Tese de Doutorado. 120p.

LÜLLMAN, H., MOHR, K., HEIN, L., BIEGER, D. Farmacologia textos e atlas. 2008. 5ª ed. Artmed. 415p.

MANDALARI, G., BENNETT, R. N., BISIGNANO, G., SAIJA, A., DUGO, G., CURTO, R. B. L.O., FAULDS, C. BB., WALDRON, K. W. Characterization of flavonoids and pectins from bergamot (*Citrus bergamia* Risso) peel, a major byproduct of essential oil extraction. **Journal Agricultural Chemistry**. 2006. v. 54. p. 197 - 203.

MALHOTRA, S., BAILEY, D., G., PAINE, M. F. Serville orange juice-felodipine interaction: comparison with dilute grapefruit juice and involvement of furocoumarins. **Clin. Pharmacol. Tther**. 2001. v. 69. n. 1. p. 14 - 23.

MANACH, C., MORAND, C., GIL-IZQUIERDO., BOUTELOUP-DEMAGNGE., C, RÉMÉSY. Bioavailability in humans of the flavononas hesperidin and narirutin after the ingestion of two doses of orange juice. **European Journal of Clinical Nutrition**. 2003. 57. pg. 235 - 242.

MANTHEY, J., BUSLIG, B. Distribution of furanocoumarins in grapefruit juice fractions. **Journal Agricultural Food Chemistry**. 2005. v. 53. p. 5158 - 5163 .

MANTHEY, J. A. Fractionation of orange peel phenols in ultrafiltered molasses and mass balance studies of their antioxidant levels. **Journal Agricultural Food Chemistry**. 2004. v. 52. p. 7586 - 7592.

MANTHEY, J. A., GROHMANN, K. phenols in citrus peel byproducts concentrations of hydroxycinnamates and polymethoxylated in *Citrus* peel molasses. **Journal Agricultural Food Chemistry**. 2001. v. 49. p. 3268 - 3273.

MANTHEY, J. A., GROHMANN, K., MANTANARI, A., ASH, K., MANTHEY, C. L. polymethoxylated flavones derived from *Citrus* suppress tumor necrosis factor- $\alpha$  expression by human monocytes. **J. Nat. Prod.** 1999. v. 62. p. 441 - 444.

MARCHAND, L.L., MURPHY, S. P., HANKIN, J. H., WILKENS, L. R., KOLONEL, L. N. Intake of flavonoids and lung cancer. **Journal of the National Cancer Institute**. 2000. v. 92. n. 2. p. 154 - 160.

MARCUCCI, M. C., FERRERES, F., GARCÍA-VIGUERA, C., BANKOVA, V. S., DE CASTRO, S. L., DANTAS, A. P., VALENTE, P. H. M., PAULINO, N. Phenolic compounds from brazilian própolis with pharmacological activities. **Journal of Ethnopharmacology**. 2001. v. 74. p. 105 -112.

MARKHAM, K. R., MITCHELL, K.A. The Mis-identification of the major antioxidant flavonoides in Young Barley (*Hordeum vulgare*) leaves. **Z. Naturforsch.** 58c. 2003. p. 53 - 56.

MARTÍNEZ-VALVERDE, I., PERIAGO, M. J., ROS, G. Significado nutricional de los compuestos fenólicos de la dieta. Archivos latinoamericanos de nutrición. **Organo Oficial de la Sociedad Latinoamericana de Nutrición**. 2000. v. 50. n. 1. p. 5 - 18.

MATOS JUNIOR, D., NEGRI, J. D., FIGUEIREDO, J. O., J. JUNIOR, P. Citros: principais informações e recomendações de cultivo. In: CITROS. Boletim Técnico 200. Instituto Agrônômico de Citros Sylvio Moreira - IAC. 17 mar. 2005.

MERKEN, H. M., BEECHER, G. R. Measurement of food flavonoids by high-performance liquid chromatography: a review. **Journal Agricultural and Food Chemistry**. 2000. v. 48. n. 3. p. 577 - 599.

MIDDLETON . E. J., KANDASWAMI, C., THEOHARIDIS, C. T. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. **Pharmacol rev.** 2000. 52. p. 673 - 751.

MILLER, J. N., MILLER, J. C. *Statistic and Chemometrics for Analytical Chemistry*. 2000. Pearson Edducatoín. 4<sup>a</sup> edição. Inglaterra. 271p.

McCLOSKEY, W.W., ZAIKEN K., COURIS, R. R. Clinically significant grapefruit juice-drug interactions. **Nutrition Today**. 2008. v. 43. n.1. p.19 - 26.

MONDELLO, L., DUGO, G., DUGO, P. Recent applications in LC-MS: food and flavours. 2002. Nov. p. 2 - 8.

MOON, Y.J., WANG, X., MORRIS, M. E. Dietary flavonoids: effects on xenobiotic and carcinogen metabolism. **Toxicology in vitro**. 2006. v. 20. p.187- 210.

MORENO-ALVAREZ, M. J., CARVALHO, D. R. B., SANCHEZ, M. P. Evaluacion de la actividad antioxidant de extractos de flavonoides de cáscara de naranja em la aceite de soja desodorizado. **Interciencia**. 2004. v. 29. n. 9. p. 532 - 538.

MORITA, V. E., SILVA, E. V. Interações entre medicamentos e suco de toranja. **Pharmacia Brasileira**. 2008. n. 67. p. 5 - 6.

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

MUROTA, K., TERRAO, J. Antioxidative flavonoid quercetin: implication of its intestinal absorption and metabolism. **Arch. Biochem. Biophys**. 2003. v. 417. p. 12 - 17.

NETO, B. B., SCARMINIO, I. S., BRUNS, R. E. Como fazer experimentos. Editora Unicamp. Campinas – SP. 2001. v. 1. 401p.

NETO, B. B., SCARMINIO, I. S., BRUNS, R. E. 25 anos de quimiometria no Brasil. **Química Nova**. 2006. v. 29. n. 6. p. 1401 - 1406.

NEVES, M. F., LOPES, F. F., ROSSI, R. M., MARINO, M. K., FERNANDES, W. B., SCARE, R. F., CAMPOS, E. L., TEIXEIRA, L. Programa de estudos dos negócios do sistema agroindustrial - PENZA – Projeto pensa - mapeamento e quantificação do sistema agroindustrial citrícola relatório parcial. 2006. Workshop do sistema agroindustrial Universidade de São Paulo.

NIELSEN, I.L.F., CHEE, W. S.S., POULSEN, L., OFFORD-CAVIN, E., RASMUSSEN, S. E., FREDERIKSEN, H., ENSLEN, M., BARRON, D., HORCAJADA, M. N., WILLIAMSON, G. Bioavailability is improved by enzymatic

modification of the citrus flavonoid hesperidin in humans: a randomized, double-blind clover trial. **Journal Nutr.** 2005. v.136. p. 404 - 408.

NIGG, H. N., NORDBY, H E., BEIER, R. C., DILLMAN, A., MACIAS, C., HANSEN, R.C. Phototoxic coumarins in limes. **Food and Chemical Toxicology.** 1993. v. 31. n. 5. p. 331 - 335.

NOGATA, Y., SAKAMOTO, K., SHIRATSUCHI, H., ISHII, T., YANO, M., OHTA, H. Flavonoid composition of fruit tissues of Citrus species. **Biosci. Biochem.** 2006. v. 70. n.1. p. 178 -192.

OJALA, T. Biological screening of plant coumarins. 2001. Tese. University of Helsinki. Finlândia. 62 p.

ONYLAGHA, J. C., GROTEWOLD, E. The biology and structural distribution of surface flavonoids. **Devel. Plant Sci.** 2004. v. 2. p. 1-19.

OOGHE, W. C., DETAVERNIER, C. M. Detection of the addition of *Citrus reticulata* and hybrids to *Citrus sinensis* by flavonoids. **Journal Agricultural Food Chemistry.** 1997. v. 45. p. 1633 -1637.

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

OOGHE, W. C., OOGHE, S. J., DETAVERNIER, C. M., HUYGHEBAERT, A. Characterization of orange juice (*Citrus sinensis*) polymethoxilated flavanone. **Journal Agricultural Food Chemistry.** 1994b. v. 42. p. 2191 - 2195.

OSMAN, H. E., MAALEJ, N., SHANMUGANAYAGAM, D., FOLTS, J. Grape juice but not orange or grapefruit juice inhibits platelet activity in dogs and monkeys (*Macaca fascicularis*). **Biochemical and Molecular Roles of Nutrients.** 1999. p. 2307 - 2312.

OSTERTAG, E., BECKER, T., AMMON, J., BAUER – AYMANN, H., SCRENK, D. Effects of storage conditions on furocoumarin levels in intact, chopped, or homogenized parsnips. **Journal of Agricultural and Food Chemistry.** 2002. v. 50. p. 2565 - 2570.

OTTOS, MATTHIAS. Chemometrics: Statistics and computer application in analytical chemistry. 1999. 330p.



PAINE, M. F. A., WIDMER, W., PUSEK, S., CASTORES, K., CRISS, A., MARROM, S., THOMAS, B., WATKINS, P. Furanocoumarin-free grapefruit juice establishes furanocoumarins as the mediators of the grapefruit juice-felodipine interaction. **Am. Journal Clinical Nutr.** 2006. v. 83. p. 1097 - 1105.

PETERSON, J., BEECHER, G.R., BHAGWAT, S. A., DWYER, J., GEBHARDT, S. E., HAYTOWITZ, D. B., HOLDEN, J.M. Flavanones in grapefruit, lemons, limes. **Journal of Food Composition and Analysis.** 2006. v. 19. p. S66 - S73.

PETERSON, J., DWYER, J. Taxonomic classification helps identify flavanoid-containing foods on a semiquantitative food frequency questionnaire. **Journal of the American Dietetic Association.** 1998. v. 98. n. 6. p. 677 - 685.

Pharmacopée Francaise. 10 ed. Paris: Adrapharm, 1980. 1998p.

Pharmacopea Helvetica. 7 ed. Bern : Département Federal de l'Intériernr, 1980. 1244p.

PINTO, M. T. Estudo da vida-de-prateleira do suco de laranja concentrado e congelado. 2006. 101p. Tese de mestrado. Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho" Faculdade de Ciências farmacêuticas. Campus de Araraquara.

PISKULA, M. K., YAMAKOSHI, J., IWAI., Y. Daidzein and genistein but not their glucosides are absorbed from the rat stomach. **FEBS Letters.** 1999. v. 447. p. 287 - 291.

PLAPER, A., GOLOB, M., HAFNER, I., OBLAK, M., SOLMAJER, T., JERALA, R. Characterization of quercetin binding site on DNA gyrase. **Biochem. Bbiophys. Res. Commun.** 2003. v. 306. p. 530 - 536.

POLYDERA A. C., STOFOROS, N. G., TAOUKIS, P. S. Effect of high hydrostatic pressure treatment on post processing antioxidant activity of fresh Naval orange juice. **Food Chemistry** 2005. v. 91. p. 495 - 503.

PUPIN, A. M., DENNIS, M. J., TOLEDO, M. C. F. Polymethoxylated flavones in brazilian orange juice. **Food Chemistry.** 1998a. v. 63. p. 513 - 518.

PUPIN, A. M., DENNIS, M. J., TOLEDO, M. C. Flavanone glycosides in brazilian orange juice. **Food Chemistry.** 1998b. v. 61. p. 275 - 280.

QI, L. H. Antifibrotic effects of genistein and quercetin *in vitro*. Yao Xue Xue Bao. 2001. v. 9. p. 648 - 651.

QUINTERO, A., DEGONZALEZ, C. N., SANCHES, F., USUBELLAGA, A., ROJAS, L., SZOKE, E., MATHE, I., BLUNDEN, G., KERY, A. Constituent and biological activity of *Citrus aurantium amara* L essential oil. **Acta Horticultural**. 2003. v. 597. p. 115 - 117.

RAMIREZ, B. G. Absorção *in vivo* de oligómeros de epicatequina. 2005. Tese douctoral. Tarragona. 251p.

RATIA, J.B. Los flavonóides Del pomelo y el sistema desintoxicador celular. File://F:\PSORALENOS01\_arquivos\INTERAÇÃO PSORALENOS 26.10.2007.

RIBANI, M., BOTTOLI, C. B. G., COLLINS, C. H., JARDIM, I. C. S. F., MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Quimica Nova**. 2004. v. 27. n. 5. p. 771 - 780.

REINHARD, H., SAGER, F., ZOLLER, O. *Citrus* juice classification by SPME-GC-MS and electronic nose measurements. **LWT – Food Science and Technology**. 2008. v. 41. 1906 - 1912.

RICE-EVANS, C.A., MILLER, N.J., PAGANDA, G. Trends in plant science. Antioxidant properties of phenolic compounds. **Trends in Plant Science**. Reviews. 1997. v. 2. n. 4. p. 152 - 159.

RICE-EVANS, C. A., MILLER, N.J., PAGANDA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radical Biology & Medicine**. 1996. v. 20. n. 7. p. 933 - 956.

RISO, P., VISIOLI, F., GARDANA, C., GRANDE, S., BRUSAMOLINO, A., GALVANO, F., GALVANO, G., PORRINI M. Effects of blood orange juice intake on antioxidant bioavailability and on different markers related to oxidative stress. **Journal Agricultural Food Chemistry**. 2005. v. 53. p. 941 - 947.

RODRIGUEZ, O., VIÉGAS, F. C. P. Citricultura brasileira. Fundação Cargill. 1980. Campinas. São Paulo. 739p.

ROSS, S. A., ZISKA, D. S., ZHAO, K., ELSOHL, M. A. Variance of common flavonóides by brand of grapefruit juice. **Fitoterapia**. v.71. 2000. p. 154 -161.

RUBIO, C. O., ESCOBAR, I. R., LIMA, N. C. Caracterização química do complexo de bioflavonóides do limão (CBL). **Tema de Ciência y Tecnologia**. 2002. v.6. n. 18. p. 11 - 14.

RUSZINYAK, SZENT – GYORGI. IN: GÁRCIA, Z; GONZALEZ, T. I. M; SANTAMARIA, O. L. Flavonoids y fitoterapia. **Revista de Fitoterapia**. 2002. v. 2. p. 21 - 32

SAGRADO, S., PEREZ-JORDAN, M. Y. Multivariate data analysis and bivariate regression studies applied to comparison of two multi-elemental methods for analysis wine samples. **Journal of Chemometrics**. 2002. v. 16. n. 16. p. 305 - 312.

SAITA, T., FUJITO, H., MORI, M. Screening of furanocoumarin derivatives in *citrus* fruits by enzyme-linked immunosorbent assay. **Bio. Pharm. Bull.** 2004. v. 27. n. 7. p. 974 - 977.

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

SANTOS, H.M.M., VEIGA, J. B. F., PINA, M. E. T., SOUZA, J. J. M. S. Obtenção de pellets por extrusão e esferonização farmacêutica I. Avaliação das variáveis tecnológicas e de formulação. Rev. bras. cienc. farm. braz. **Journal Pharm. Science**. (RBCF). 2004. v. 40. n. 4 p. 455 - 470.

SAYRE, R.M., DOWDY, J.C. The increase in melanoma: are dietary furocoumarins responsible?. **Medical Hypotheses**. 2008. v. 70. p. 855 - 859.

SCALBERT, A., WILLIAMSON, G. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. **The Journal of Nutrition**. 2000. v.130. p. 2073S - 2085S.

SECEX exportações cítricos 2006 Abicitrus  
<[http://www.todafruta.com.br/todafruta/mostra\\_conteudo.asp?conteudo=13481](http://www.todafruta.com.br/todafruta/mostra_conteudo.asp?conteudo=13481)>  
Acesso em: 14.09.2006.

SCHLATTER, J.B. Dietary intake and risk assesement of phototoxic furocoumarins in human. **Food and Chemical Toxicology**. 1991. v. 29. n.8. p. 523 - 530.

SENA, M. M., POPPI, R. J., FRIGHETTO, R. T.S. Avaliação do uso de métodos quimiométricos em análises de solo. **Química Nova**. 2000. v. 23. p. 547 - 556.

SCCP – Scientific Committee on Consumer Products EC. SCCP/0942/05. Opinion on furocoumarins in cosmetic products. Brussels: European Commission: Health and Consumer Protection Directorate General. 2005. p. 9.

Serviço Brasileiro de respostas Técnicas –SENAI. GUIDDOLIN, F. R., PINTO, F. S. Instituição - SENAI – RS/EEP SENAI. <http://www.sbrt.ibict.br>. Acesso: 26.02.2007.

SETCHELL, K. D. R., CASSIDY, A. Dietary isoflavones: biological effects and relevance to human health. **Journal Nutr.** 1999. v. 129. n. 3. p. 758 - 767.

SHU, C.K., WALDBRANDT, J. P., TAYLOR, W. I. Improved method for bergapten determination by high-performance liquid chromatography. **Journal Chromatography.** 1975. v. 106. p. 271 - 282.

SHUI, G., LEONG, L. P. Separation and determination of organic acids and phenolic compounds in fruit juice and drinks by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A.** 2002. v. 977. p. 89 - 96.

SICA, D. Interaction of grapefruit juice and calcium channel blockers. **AJH.** 2006. v. 19. p. 768 - 773.

SILVA, P.T., FIALHO, E., LOPES, L. M., VALENTE-MESQUITA, V. L. Industrialized orange juices and refreshment prepared from orange juice powder: chemical and physicochemical stability. **Ciênc. Tecnol. Aliment.** 2005. v. 25. n. 3. p. 597 - 602.

SIMÕES, C. M. O., MENTZ, L. A., SCHENKEL, E. P. IRGANA, B. E., STEHMANN, J. R. (Org.) Farmacognosia : da planta ao medicamento. 2000. 2.ed. Florianópolis: UFSC. Cap. 21. p. 451 - 460.

SINGLETON, J. A., STIKELEATHER, L. F., SANFORD, J. H. LC-Electrospray and LC-FAB/MS study of flavonoid glycosides extracted from peanut meal. **JAOCs.** 2002. v. 79. n. 8. p. 741 – 748.

SIVIERI, K., OLIVEIRA, M. N. Avaliação da vida-de-prateleira de bebidas lácteas preparadas com “fat replacers”(Litesse e dairy-lo). **Ciênc. Tecnol. Aliment.** 2002. v. 22. n.10. p. 24 - 31.

SOLIS, R.R., DOTSON, D. A., TRIZNA, Z. Phytophotodermatitis. A sometimes difficult diagnosis. **Brief report. Arch Farm/Med.** 2000. v. 9.

SPENCER, J. P. E., MOHSEN, M. A. E., MINIHANE, ANN – MARIE., MATHERS, J. C. Biomarkers of the intake of dietary polyphenols: strengths, limitations and application in nutrition research. **British Journal of Nutrition.** 2008. v. 99. p. 12 - 22.

STANLEY, W. L., JURD, L. *Citrus coumarins*. **Journal Agricultural Food Chemistry** 1971. v.19. p. 1106 -1110.

STANLEY, W.L., VANNIER. Psoralen and substituted coumarins from expressed oil of lime. **Phytochemistry**. 1967.v. 6. p. 585 - 596.

SOUZA, S. M. Atividade antibacteriana de cumarinas naturais e derivados. 2005. Tese. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis.SC. 81p.

STUMP, A. L., MAYO, T., BLUM, A. Management of grapefruit –drug interactions. **American Family Physician**. 2006. v. 74. n. 4. p. 605 - 607.

TADINI, C. C., TRIBESS, T. B. Suco de laranja minimamente processado: uma alternativa para ampliar o mercado de suco de laranja no Brasil. 2004. Escola Politécnica da Universidade de São Paulo – EPUSP- PQI – Departamento de Eng. Química. p.1 -13.

TAKANAGA, H., OHNISHI, A., YAMADA, S., MATSUO, H., MORIMOTO, S., SHOYAMA, Y., OHTANI, H., SAWADA, Y. Polymethoxylated flavones in orange juice are inhibitors of p- glycoprotein but not cytochrome P450 3A4. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. 2000. v. 293. n. 4. p. 230 - 236.

THEOHRIDES, T. C., ALEXANDRAKIS, M., KEMPURAJ, D., LY TINAS, M. Anti-inflammatory actions of flavonoids and structural requirements for new design. **Int. J. Immunopathol. Pharmacol**. 2001. v. 14. n. 3. p. 119 - 127.

THOMPSON, M., WILLIAMS, C. R. Stability of flavonoids complexes of cooper(II) and flavonoid antioxidant activity. **Analytica Chimica Acta**. 1976. v. 85. p. 375 - 381.

TING WU., GUAN, Y., JIANNONG, Y. Determination of flavonoids and ascorbic acid in grapefruit peel and juice by capillary electrophoresis with electrochemical detection. **Food Chemistry**. 2005. v. 100. p. 1573 -1579.

TURA, D., ROBARDS, K. Sample handling strategies for the determination of biophenols in food and plant. **Journal Chromatography A**. 2002. v. 975. p. 71 - 93.

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

VELASQUEZ, N., GALEAS, J. T., CASTILLO, E. M., VALLETO, V. M. Fitodermatitis fotoreactividad de los psoralens. 1988. 61p. Honduras. Colégio Medico de Honduras.

VILEGAS, W., VILEGAS, J. H. Y., POZETTI, G. L. Furanocoumarins from Brazilian *Dorstenia* ssp. **Rev. Latinoam. Quim**.1999. v. 23. p. 78 - 80.

VERSARI, A., NATALI, N., RUSSO, M. T., ANTONELLI, A. Analysis of some Italian lemon liquors (Limoncello). **Journal Agricultural Food Chemistry**. 2003. v. 51. p. 4978 - 4983.

VOLDRICH, M., SKÁLOVÁ, P., KUASNICKA, F., CUAHRA, P., KUBÍK, M., PYS, P. Authenticity of 100% orange juice in the Czech market in 1996 – 2001. **Czech Journal Food Science**. 2001. v. 20 . n. 2. p. 83 - 88.

ZITRON, E., SCHOLZ, E., OWEN, R. W., LUCK, S., KIESECKER, C., THOMAS, D., KATHOFER, S., NIROOMAND, F., KIEHN, J., KREYRE, V. A. W., KATSUS, H. A., SCHOELS, W., KARLE, C. QTc prolongation by grapefruit juice and its potential pharmacological basis: HERG channel blockade by flavonoids. Circulation. **Journal of the American Heart Association**. 2005. p. 834 - 838.

YAMANAKA, H. T. Sucos cítricos. Companhia de Saneamento Ambiental – CETESB. 2005. 48p. São Paulo. Disponível em: <<http://www.cetesb.sp.gov.br>>.

YANHUA LU., ZHANG, C., BUCHELI, P., WEI, D. Citrus flavonoids in fruit and traditional chinese medicinal food ingredients in China. **Plant Foods for Human Nutrition**. 2006. v. 61. p. 57 - 65.

WANG, H-K. The therapeutic potencial of flavonoids. **Exp. Opin. Invet. Drugs**. 2000. v. 9. p. 2103 - 2119.

WAGSTAFF, D.J. Dietary exposure to furocoumarins. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**. 1991. v. 14. n. 3. p. 261 - 272.

WEBER, I. C., Davis, C. P., Greeson, M. D. Phitophotodermatitis the other “lime” disease. Clinical Communications. **The Journal of Emergency Medicine**. 1999. v. 17. n. 2. p. 235 - 237.

WIDMER, W. One tangerine/grapefruit hybrid (tangelo) contains trace amounts of furanocoumarins at a level too low to be associated with grapefruit/drug interactions. **Journal of Food Science – JFS C: Food Chemistry and Toxicology**. 2005. v. 70. n. 6. p. 419 – 422.

WILMSEN, P. K., DALLA, S. S., SALVADOR, M. Antioxidant activity of the flavonoid hesperidin in chemical and biological systems. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 2005. v. 53. p. 4757 - 4761.

## APÊNDICE A

Tabela 4: Análises de flavonóides em diferentes matrizes por CLAE.

Matriz	Detector	Analito	Fase móvel	Referências
Suco cítrico	UV	Narigenina/hesperidina/neohesperidina/narirutina/eriocitrina	<sup>1</sup> MeOH; CH <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	CARISTI et al 2006; ATURKI, 2004; KAWAIL et al. 2001
Suco de laranja concentrado	UV	limonina	<sup>1</sup> -H <sub>2</sub> O/TFH/ CH <sub>3</sub> CN; CH <sub>3</sub> CN/H <sub>2</sub> O	ABBASI, 2005
Suco cítrico	DAD	Naringina/hesperidina/neohesperidina	<sup>2</sup> H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> /MeOH	BELAJOVÁ, 2004
Cítricos e subprodutos cítricos	UV	Florina(phlorin)	<sup>1</sup> CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> ,EtOH/MeOH;Etanol/ H <sub>2</sub> O	BRADDOCK, 2001
Resíduo industriais processamento de limão	DAD/UV	Eriocitrina/hesperidina	<sup>1</sup> H <sub>2</sub> O / CH <sub>2</sub> O <sub>2</sub> / MeOH	COLL, 1998
Urina	CCD	Narigenina/hesperidina	<sup>3</sup> Hexano/EtOH	CACCAMESE SALVATORE 2005
<i>Citrus bergamia</i> (suco)	DAD	Eriocitrina,neoeriocitrina,narirutina,naringina,hesperidina,neohesperidina, didimina, 7-OH flavonona	<sup>4</sup> CH <sub>3</sub> COOH / H <sub>2</sub> O; MeOH	CALABRÒ, 2003
Suco cítrico	DAD	Narirutina/hesperidina/didimina/naringina/neohesperidina/pocirina	<sup>1</sup> H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> / MeOH	DEL CARO, 2004
<i>Citrus</i>	DAD/UV	Naringina, neohesperidina, narirutina, eriocitrina, hesperidina	<sup>5</sup> Formato de amônia- CH <sub>3</sub> CN	DESIDERIO, 2005
Vinho seco	UV-DAD CG/FID; GC/FID/MS	Hesperidina/quercetina/kaempferol	<sup>1</sup> MeOH	DESLAURIERS, 2000
Extrato contendo:flavonas, flavonóis e flavononas agliconas	ESI-MS-MS	Luteolina, apigenina, genkwanina, chrysin, 7 hidroxí flavona, quercetina, fisetina, kaempferol, galangina, kaempferida, eriodictyol, naringenina, isosakurametina flavonona	<sup>1</sup> MeOH / CH <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	FABRE, 2001
<i>Citrus aurantium</i>	ES-MS	Isonaringin/naringina/hesperidina/neohesperidina/naringenina/hesperitina/neobiletina/tangeritina	<sup>1</sup> H <sub>2</sub> O-CH <sub>3</sub> COOH/ MeOH	HE, XIAN-GUO 1997
Alface, alho, aipo, cebola, chicórea, oxíco	UV/DAD	Miricetina, quercetina, luteolina, apigenina, kaempferol	<sup>1</sup> CH <sub>3</sub> CN/ KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> /MeOH/	HERTOG, 1992; 1996
Tomilho/manjeriço/cebolinha/coentro/agrião/limão/salsa/alecrim/artemísia/alho/melissa	MS	Quercetina/kaempferol/apigenina/luteolina/isoharmetina	<sup>1</sup> CH <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /MeOH	JUSTESEN, 2001
Frutas/verduras/bebidas	UV/DAD/MS	Apigenina/eriodictiol/hesperitina/isorhamnetina/kaempferol/luteolina/miricetina/naringenina/floretina/quercetina/galocatequina/epicatequinas, catequinas	<sup>1</sup> CH <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /MeOH	JUSTESEN, 1998 RAMÍREZ, 2005
Cevada	DAD	Lutonarin, saponarin	<sup>1</sup> H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> /CH <sub>3</sub> COOH-CH <sub>3</sub> CN- H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> /H <sub>2</sub> O	MARKAN, 2003
Melaço	DAD-MS	Sinensetina/quercetagina/nobiletina/tetrametilscultelareina/heptame	<sup>2</sup> H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> /CH <sub>3</sub> CN; CH <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /H <sub>2</sub> O/ CH <sub>3</sub> CN	MANTHEY, 2004

		toxiflavona/tangeritina/isosakuranetina/hesperidina/narirutina//coniferina		
<i>Citrus</i>	DAD	Flavononas, flavonas, flavonas polimetoxiladas	<sup>1</sup> H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> / <sup>1</sup> MeOH	NOGATA, 2006
Suco de laranja	UV	Sinensetina;quercetogetina/nobiletina/heptametoxiflavona/scutelareina/tangeritina	H <sub>2</sub> O/ CH <sub>3</sub> CN /TFH	PUPIN, 1998, a
Suco de maçã, framboesa e oxicoco,	DAD	Ácidos orgânicos/compostos fenólicos	<sup>1</sup> MeOH/H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> / H <sub>2</sub> O	SHUI, 2002
Suco de laranja e toranja	UV	Hesperidina. Narirutina, didimina, poncirina, neohesperidina, quercetina	<sup>1</sup> CH <sub>3</sub> CN/H <sub>2</sub> O; CH <sub>3</sub> COOH/DMF	VANAMALA, 2005
Suco cítrico	DAD/LC-ESI-MS	Naringina/hesperidina/neohesperidina/sinensetina/nobiletina	<sup>1</sup> H <sub>2</sub> O/ MeOH	YANHUA LU, 2006
Suco de limão	DAD	naringina, narirutina, hesperidina, neohesperidina e eriocitrina	-----	GEL-MORETO et al. 2001
Alimentos	DAD	Naringina, hesperidina, apigenina, miricitina, quercetina, cianidina, malvidina	<sup>1</sup> MeOH/ACN/TFA	MERKEN et al., 2000

<sup>1</sup> Fase Estacionária RP 18 <sup>2</sup> Fase Estacionária C8 <sup>3</sup> Derivados Polissacarídeos (CSP-Chiralpak AS-H/Chiralcel OD-H) <sup>4</sup> Fase Estacionária C6 <sup>5</sup> Coluna Sílica Fundida

#### LEGENDA

H<sub>2</sub>O = Água  
 CH<sub>3</sub>COOH = ácido Acético  
 CH<sub>2</sub>O<sub>2</sub> = Ácido Fórmico  
 CH<sub>3</sub>CN = Acetonitrila  
 H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> = Ácido Fósfórico  
 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> = Ácido Sulfúrico  
 CCD = Cromatografia Camada Delgada  
 CG/FID = Cromatografia Gasosa com Detector de Ionização em Chama  
 GC/FID/MS = Cromatografia Gasosa com Detector de Ionização em Chama Acoplado ao Espectrometro de Massa  
 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> = Diclorometano  
 DMF = Dimetilformamida  
 DAD = Detector Arranjo de Diodo  
 EtOH = Etanol  
 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> = Fosfato Ácido de Potássio  
 RP = Fase Reversa  
 MeOH = Metanol  
 TFH = Tetrahydrofurano  
 UV = Ultra Violeta  
 MS = Espectrometria de Massa  
 ESI-MS-MS = Espectrometria de Massa de Alta Resolução por Eleletrospray  
 ES-MS = Espectrometria de Massa por Impacto de eletrons  
 DAD/LC-ESI-MS =Cromatografia Líquida Acoplada a Espectrometria de Massa  
 V/V = volume/volume  
 TBHQ = Tetra butilhidroquinona  
 TFA = ácido trifluoroacético



**APÊNDICE B**

Curvas analíticas para os analitos determinados nas amostras de sucos de laranja.

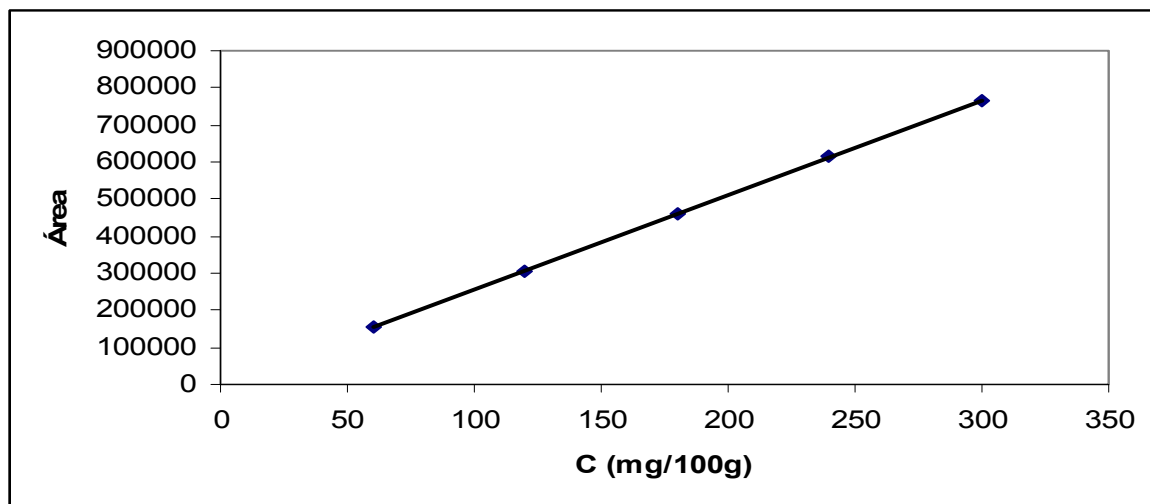


Figura 26a – Curva analítica para a hesperidina TR = 15'

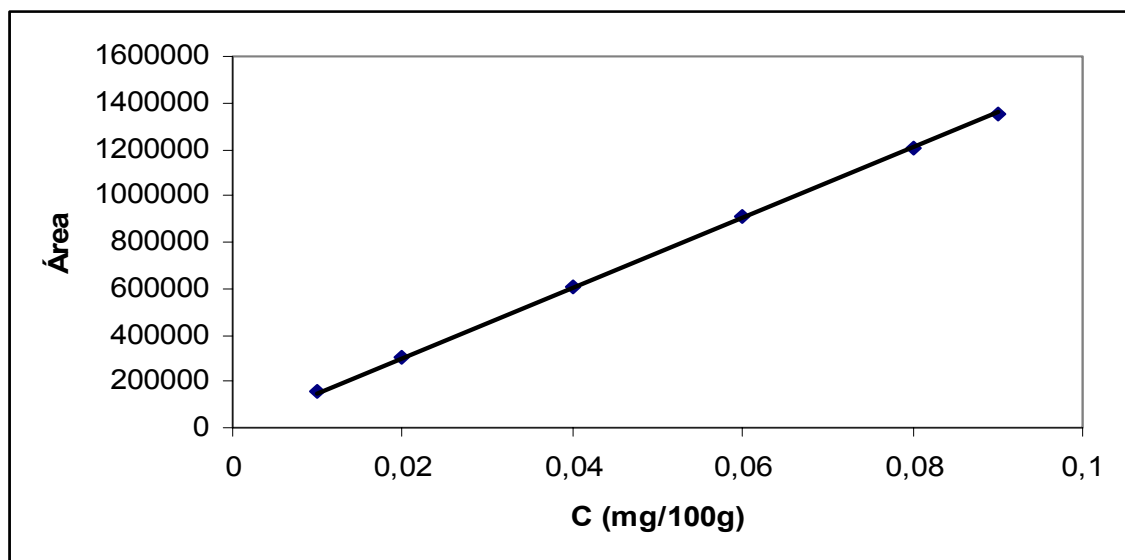


Figura 26b – Curva analítica para a naringina TR = 9'

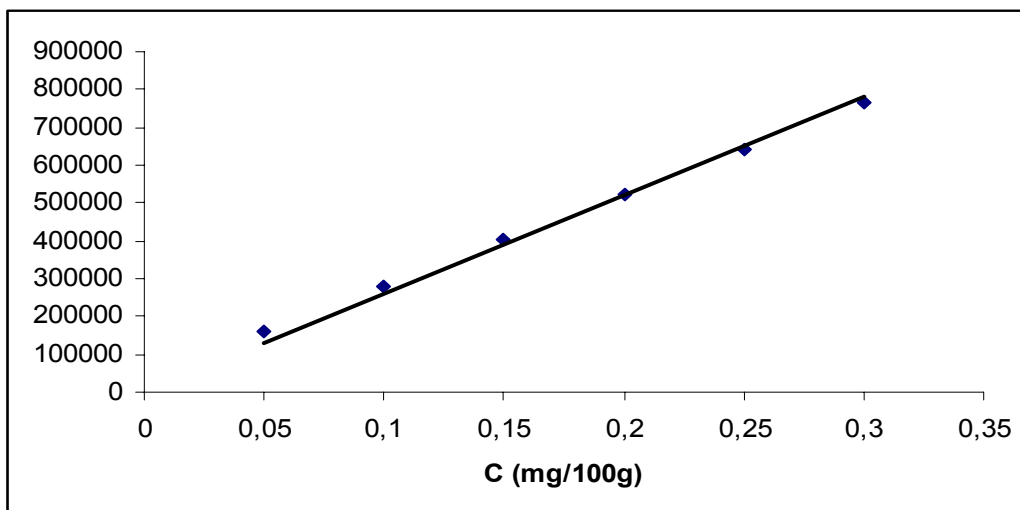


Figura 26c – Curva analítica para poncirina, TR = 17'.

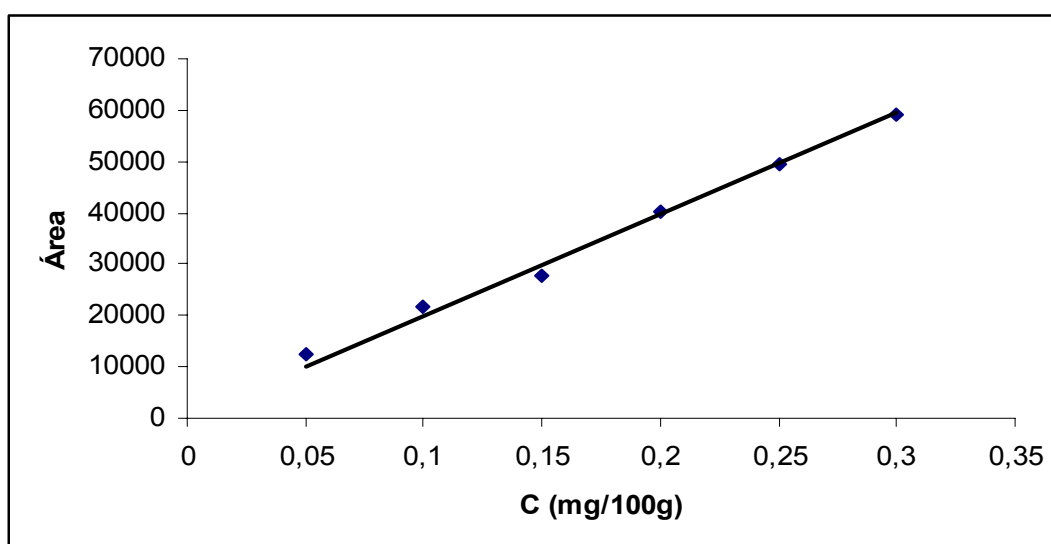


Figura 26d – Curva analítica para naringenina, TR = 22'.

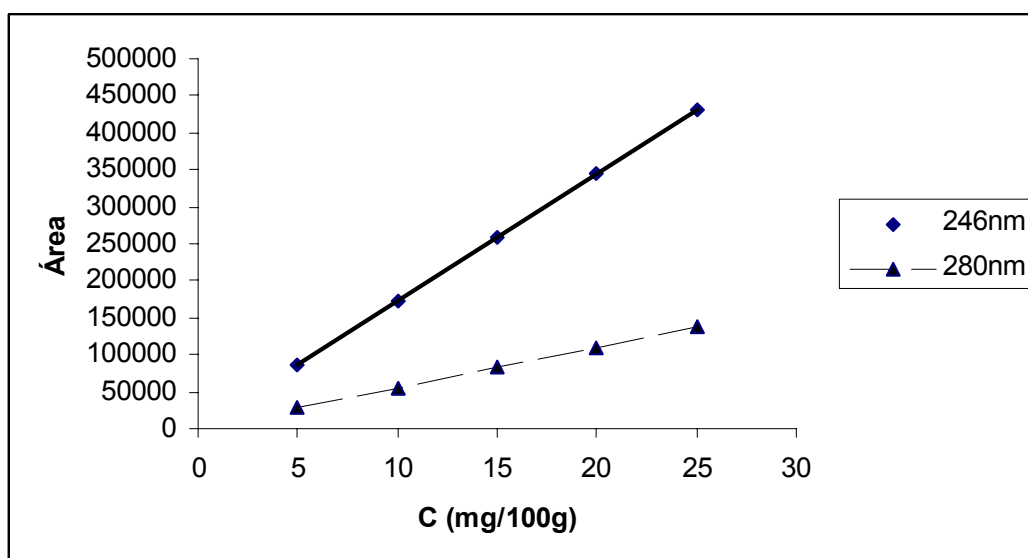


Figura 26e – Curva analítica para psoraleno, TR = 5'.