



UTILIZAÇÃO DE CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ULTRA PERFORMANCE ACOPLADA A DETETOR DE MASSAS DE ALTA RESOLUÇÃO (Q-TOF) PARA QUALIFICAÇÃO DE FLAVONOÍDES CITRUS RESPONSÁVEIS POR AMARGOR NO SUCO DE TANGERINA MURCOTE (*Citrus reticulata* Blanco L).

J.S. Rosa¹, J.Oiano-Neto², A. A. L. Furtado³; R.L. O. Godoy⁴; R. G. Borguini⁵; C. M. Rezende⁶

1-Programa de Pós Graduação em Ciência de Alimentos UFRJ (PPGCAL-UFRJ) - Universidade Federal do Rio de Janeiro – Instituto de Química, Avenida Athos da Silveira Ramos, 149 Bloco A, CEP 21941909, Rio de Janeiro, Telefone: (xx21) 2562-7362 - Fax (xx 21) 2562-726 e Embrapa Agroindústria de Alimentos, Av. das Américas, 29501, CEP 23020470, Rio de Janeiro, Telefone: (xx-21)3622-9775 – Fax: (xx-21)3622-9613 – e-mail: jeane@ctaa.embrapa.br

2-Embrapa Pecuária Sudeste, Rodovia Washington Luiz, km234, CEP 13560970, São Carlos, Telefone: (xx16)3411-5600- Fax (xx16)3411-5691- (oiano@cnpse.embrapa.br)

3-Embrapa Agroindústria de Alimentos, Av. das Américas, 29501, CEP 23020470, Rio de Janeiro, Telefone: (xx-21)3622-9600 - Fax: (xx-21)3622-9613- (afurtado@ctaa.embrapa.br)

4-Embrapa Agroindústria de Alimentos, Av. das Américas, 29501, CEP 23020470, Rio de Janeiro, Telefone: (xx-21)3622-9775- Fax: (xx-21)3622-9613- (ronoel@ctaa.embrapa.br)

5-Embrapa Agroindústria de Alimentos, Av. das Américas, 29501, CEP 23020470, Rio de Janeiro, Telefone: (xx-21)3622-9775- Fax: (xx-21)3622-9613- (renata@ctaa.embrapa.br)

6-Programa de pós graduação em ciência de Alimentos UFRJ (PPGCAL-UFRJ), Universidade Federal do Rio de Janeiro – Instituto de Química, Avenida Athos da Silveira Ramos, 149 Bloco A, CEP 21941909, Rio de Janeiro UFRJ-PPGCAL, Avenida Athos da Silveira Ramos, 149 Bloco A, Rio de Janeiro, (xx21) 2562-7362 - Fax (xx 21) 2562-726 (crezende@iq.ufrj.br)

RESUMO – O sabor amargo nos sucos cítricos é uma característica indesejável para sua produção e comercialização, especialmente para a variedade de tangerina conhecida popularmente no Brasil como Murcote. Duas classes de compostos, limonóides e flavonóides, são os principais causadores de sabor amargo nestes sucos. Os flavonóides associados ao amargor são as flavanonas glicosiladas naringina e neohesperidina. Análises por HPLC-PDA mostraram que estas substâncias não estão presentes no suco. Dos flavonóides avaliados (naringina, naringenina, hesperidina, neohesperidina, diosmina e hesperitina, além de rutina e quercetina) foi encontrada somente hesperidina em teores médios de 7mg/100g no suco centrifugado. Em contrapartida, um flavonóide que eluiu muito próximo do tempo da naringina no padrão apresentou um pico com boa magnitude nas amostras. A avaliação deste componente na amostra e padrões por UPLC-ESI-Q-TOF mostrou a presença de fragmentos idênticos aos produzidos pela naringina, sugerindo um isômero desta, a narirutina.

ABSTRACT – The bitter taste of citrus juices is an undesirable trait for its production and marketing, especially for the variety popularly known in Brazil as Murcott. In general, two classes of compounds, limonoids and flavonoids, are the main cause of bitterness in these juices. Flavonoids linked to this undesirable note in tangerine juice are the glycosylated flavanones naringin and neohesperidin. Analysis by HPLC-PDA showed that these substances are not present in the juice. Among the flavonoids evaluated (naringin, naringenin, hesperidin, neohesperidin, diosmin and hesperetin, besides rutin and quercetin) only hesperidin was found in levels about 7mg/100g of the juice centrifuged. In other way a flavonoid which eluted very close to the naringin standard time had a good

magnitude in samples. The evaluation of this component in the samples and standards by UPLC-ESI-Q-TOF showed the presence of fragments identical to those produced by naringin, suggesting the isomer narirutin.

PALAVRAS-CHAVE: sucos cítricos; narirutina, naringina, rutenosídeo.

KEYWORDS: Citric juices; narirutin, naringin, ruthenoside.

1. INTRODUÇÃO

O sabor amargo em sucos é uma característica indesejável para a produção e comercialização de sucos cítricos. De um modo geral, duas classes de compostos denominados limonóides e flavonóides são os principais fatores que causam o sabor amargo em nestes sucos.

Neste estudo houve prospecção de alguns flavonóides do gênero *Citrus* (naringina, naringenina, hesperidina, neohesperidina, diosmina e hesperitina, além de rutina e quercetina), mas o foco deste trabalho foi somente a diferenciação ente os dois isômeros naringina e narirutina, devido ao amargor reportado à primeira e à semelhança estrutural entre as moléculas que dificulta o processo cromatográfico tradicional.

Conforme mostra a Figura 1, as moléculas de naringina e narirutina possuem um mesmo núcleo naringinina e diferem somente na posição das ligações interglicosídicas no grupo rutinosídeo (glicose e raminose) que é 1→2 e 1→6, respectivamente. Segundo, Peterson *et al.* (2006), o açúcar com ligação glicosídica 1→2 é o responsável pelo amargor da naringina. No caso dos flavonóides, os principais agentes causadores do sabor amargo são, então, a naringina e a neohesperidina (flavanonas glicosiladas).



Figura 1: Estruturas químicas: naringina, narirutina e naringinina

2. MATERIAL E MÉTODOS

As amostras de tangerina foram compradas no Ceasa do Rio de Janeiro, descascadas manualmente, colocadas em despoldadeira para produção do suco e peneirada por 0,6 mesh sendo em seguida pasteurizadas a 98°C por 4 minutos. Todos os padrões de flavonóides foram comprados da Sigma-Aldrich. Acetonitrila (ACN), dimetilsulfóxido (DMSO), metanol (MeOH) e ácido acético (HAC) foram marca Tédia grau HPLC.

O suco de tangerina foi homogeneizado em banho ultrassônico por 10 minutos e em seguida centrifugado por 30 minutos a 5000rpm. Aproximadamente 5g do sobrenadante foram pesados, em duplicata, para balão volumétrico de 25mL contendo, aproximadamente, 15 mL de solução de MeOH:H₂O 80:20 sendo deixados em banho ultrassônico por 30 minutos. Após, foram avolumadas, filtradas e microfiltradas em membrana teflon hidrofílico 0,22µm.

O cromatógrafo líquido usado na análise HPLC-PDA foi um Waters Alliance® 2695 com detetor de arranjo de fotodiodos (PDA) Waters 2996®.

Os padrões de flavonóides foram solubilizados em DMSO:ACN 80:20 (v/v).



A fase móvel foi constituída de MeOH: HAC 4% 96:4 (solvente A) e MeOH: HAC 4% 9:91 (solvente B). A programação de gradiente variou a composição do solvente A de 20% a 60% em 13 minutos e logo depois à 95% até 19 minutos de corrida, voltando às condições iniciais em 22 minutos. A coluna utilizada a C₁₈ YMC-Pack® ODS-AM, (250x4,6 mm; 5µm), temperatura da coluna de 45°C, fluxo de 1,1mL/min., varredura no detector PDA foi de 210-400nm com extração do cromatograma a 280nm, volume de injeção de 20µL e temperatura do injetor foi mantida a 10°C.

Estas amostras foram também analisadas em um sistema de Cromatografia Líquida de Ultra Performance (UPLC) acoplada a espectrômetro de massas com fonte elétron *spray* e analisador tipo Quadrupolo-Time of Flight (UPLC-ESI-Q-TOF) com o intuito de verificar a identidade do flavonóide de magnitude mais intensa.

A coluna utilizada foi uma ACQUITYUPLC® BEH C18 (5 x 2,1 milímetros; 1,7 µm) e a fase móvel foi metanol:0,1% de ácido fórmico 30:70 (v/v) em 0.2mL/min. A energia do capilar foi 3 Kv e a energia no Cone de amostragem 25.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Conforme mostra a figura 2 é possível observar na análise via HPLC-PDA a presença de dois picos não qualificados por padrão que possuem espectro característico de flavonóide (em 7,3 e 11, 8 min., respectivamente). Os teores médios encontrados para hesperidina foram de 7mg/100g de suco centrifugado.

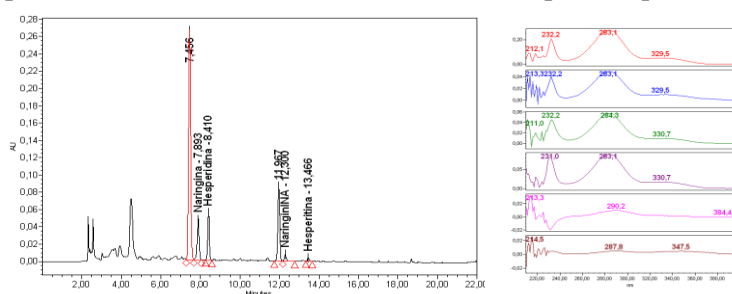


Figura 2: Cromatograma e espectros - Amostra de suco de tangerina murcote com adição padrão de naringina.

O primeiro pico possui boa magnitude e elui muito próximo da naringina. A adição de padrão de naringina à amostra comprovou que se trata de outra substância, pois o pico da naringina aparece imediatamente após este. O provável flavonóide seria a narirutina,

Na verificação via UPLC-ESI-Q-TOF em modo positivo a narirutina e a naringina não produziram fragmentos diferenciados com abundância relativa significativa. Sun *et al.*, (2010) propôs diferenciação por modo negativo onde a narirutina forma além da molécula desprotonada m/z 271 dois outros fragmentos em m/z 313 e m/z 459, não formados pela naringina. No entanto, a técnica cromatográfica hifenada, apesar da alta capacidade analisadora do detector de massas em questão, proporcionou a diferenciação das moléculas por tempo de retenção nas amostras e nos padrões: a narirutina apresenta retenção de 0,99 minutos e a naringina se estivesse presente na amostra eluiria em aproximadamente 1,13 minutos.

Conforme mostra a figura 3 que representa cromatogramas e espectros de massas de uma amostra de suco de tangerina (A), um padrão de narirutina (B) concentrado e um padrão de naringina (C) diluído 100 vezes. Pode-se perceber a presença das espécies mais abundantes: ions com massa/carga (m/z) 581

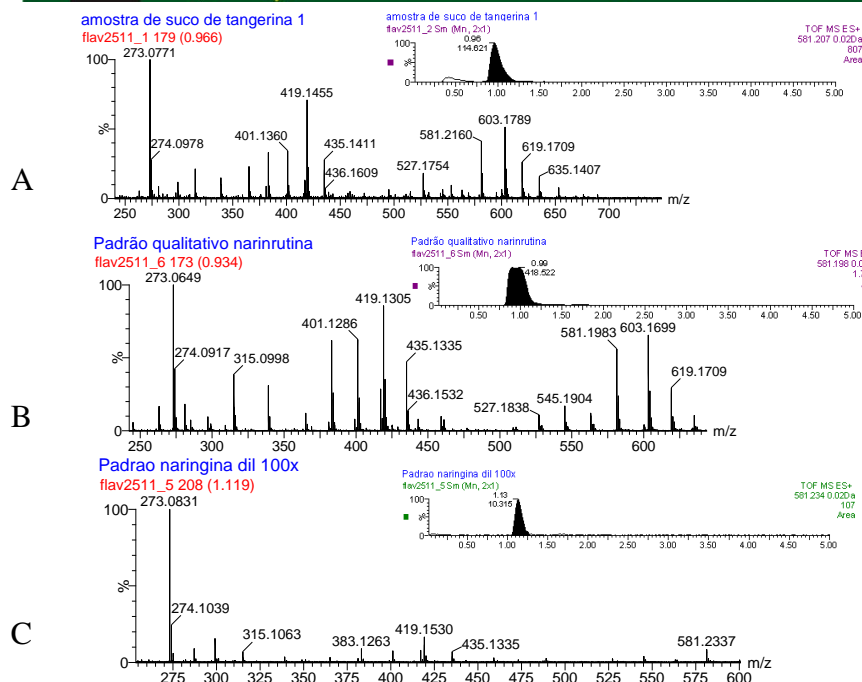


Figura 3: Cromatograma de massas sobre respectivos espectros. A – de uma amostra de suco de tangerina murcote extraído do íon de m/z 581; B – padrão de narinrutina (concentrado); C – padrão de naringina (diluído). Desconsiderar o termo narinrutina nas figuras acima.

correspondentes às moléculas protonadas de naringina e narinrutina. As espécies de m/z 273 correspondem a uma molécula núcleo de naringina e também seriam produzidas por ambos os isômeros. Nem mesmo a informação de massa exata serviria como diferenciação entre as espécies neste caso.

As espécies com m/z 603 e 619 correspondem às moléculas com adutos de sódio e potássio, respectivamente. Segundo Ma *et al.*, (2011) os fragmentos em m/z 401 correspondem à perda do radical glicosil e água, pela molécula protonada ($[M+H-162-18]^+$). Os fragmentos em m/z 419 correspondem à perda do glicosil ($[M+H-162]^+$) e os fragmentos em m/z 435 correspondem à perda de raminosil ($[M+H-146]^+$).

4. CONCLUSÃO

Foi possível concluir que a narinrutina está presente nas amostras e não a naringina, sendo a técnica cromatográfica hifenada muito importante nesta conclusão, mediante a separação dos isômeros. Desta forma, a ausência da naringina e também da neohesperidina sugerem o amargor à presença de limonóides nestas amostras.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

MA, C.; GAO, W.; GAO, Y.; MAN, S.; HUANG L. LIU, C. Identification of Chemical Constituents in Extracts and Rat Plasma from Fructus Aurantii by UPLC-PDA-Q-TOF/MS. *Phytochem. Anal.* v.22, p. 112–11, 2011.

PETERSON, J.J.; DWYER, J.T.; BEECHER, G. R.; Bhagwat, S. A.; GEBHARDT, S. E.; HAYTOWITZ, D.B.; HOLDEN, J.M. Flavanones in oranges, tangerines (mandarins), tangors, and tangelos: a compilation and review of the data from the analytical literature. *J. of Food Compos. and An.* v.19, p. S66–S73, 2006.

SUN, M.; LU, J.; ZHANG, H.; ZHANG, Q.; XIAO, N.; XI, R. Differentiation of Four Pairs of Isomers by Comparing Their Relative Abundances of Fragment Ions. *Chem. Res. Chinese Univ.*, v.26, n.1, p. 27–32, 2010.