

13º Congresso de Inovação, Ciência e Tecnologia do IFSP - 2022

DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO DE ANÁLISE PARA DETERMINAR HESPERIDINA E NARINGINA EM SUCO DE LARANJA POR CLAE-DAD COM ETANOL COMO MODIFICADOR ORGÂNICO DA FASE MÓVEL

NATHALIA CRISTINA DA SILVA TAVARES¹, CAROLINA LOURENCETTI²

¹ Graduanda em Engenharia de Alimentos, Bolsista PIBIFSP, IFSP, Câmpus Matão, tavares.c@aluno.ifsp.edu.br

² Docente (Doutora em Química), IFSP, Câmpus Matão, carollourencetti@ifsp.edu.br

Área de conhecimento (Tabela CNPq): 1.06.04.01-4 Química Analítica - Separação

RESUMO: O suco de laranja tem sido apontado como benéfico para humanos por conter, além da vitamina C, flavonoides, com ação anti-inflamatória e antioxidante. Hesperidina é um dos principais flavonoides nas laranjas doces, enquanto naringina, responsável pelo sabor amargo, destaca-se na toronja. Assim, naringina pode ser utilizada como marcador da adulteração de suco de laranja doce com toronja. Este estudo comparou condições de preparo de padrões e amostra para desenvolver um método para determinar hesperidina e naringina em suco de laranja utilizando etanol como modificador orgânico da fase móvel para cromatografia líquida de alta eficiência com detector de Arranjo de Diodos. Resposta e resolução cromatográfica foram comparadas em função do uso dos solventes água, metanol e etanol em diferentes valores de pH (aproximadamente 5, 8 e 11). Melhores resultados para resolução cromatográfica, sensibilidade e linearidade foram obtidos para curva de calibração ($0,005\text{--}0,10\text{ mg mL}^{-1}$) em meio aquoso e pH aproximadamente 11 (coeficiente angular igual a $1,58 \times 10^8$ e $1,40 \times 10^7$ para hesperidina e naringina, respectivamente, com $R^2 > 0,999$). Maiores concentrações em 100 mL de suco de laranja doce (10,7 mg hesperidina) e toronja (8,4 mg hesperidina e 40,2 mg naringina) foram observados com diluição da amostra em água (1:1, v/v).

PALAVRAS-CHAVE: química verde; suco de laranja; flavonoides.

METHOD DEVELOPMENT TO DETERMINE HESPERIDIN AND NARINGIN IN ORANGE JUICE BY CLAE-DAD WITH ETHANOL AS ORGANIC MODIFIER FOR MOBILE PHASE

ABSTRACT: Orange juice has been shown to be beneficial for humans because it contains, in addition to vitamin C, flavonoids, with anti-inflammatory and antioxidant action. Hesperidin is one of the main flavonoids in sweet oranges, while naringin, responsible for the bitter taste, stands out in grapefruit. Thus, naringin can be used as a marker of adulteration of sweet orange juice with grapefruit. This study compared standard and sample preparation conditions to develop a method to determine hesperidin and naringin in orange juice using ethanol as an organic mobile phase modifier for high performance liquid chromatography with a Diode Array detector. Chromatographic response and resolution were compared as a function of the use of water, methanol and ethanol as solvents at different pH values (approximately 5, 8 and 11). Better results for chromatographic resolution, sensitivity and linearity were obtained for the calibration curve ($0.005\text{--}0.10\text{ mg mL}^{-1}$) in aqueous medium and pH approximately 11 (slope as 1.58×10^8 and 1.40×10^7 for hesperidin and naringin, respectively, with $R^2 > 0.999$). Higher concentrations in 100 mL of sweet orange juice (10.7 mg hesperidin) and grapefruit (8.4 mg hesperidin and 40.2 mg naringin) were observed with sample dilution in water (1:1, v/v).

KEYWORDS: green chemistry; orange juice, flavonoids.

INTRODUÇÃO

O suco de laranja é o mais popular e consumido suco de frutas no mundo e o Brasil, juntamente com os Estados Unidos (Flórida), destaca-se como um dos maiores produtores mundiais de laranja. As indicações de efeitos benéficos deste suco para a saúde humana (MEYER, 1994; EVANS; MILLER; PAGANDA; 1997) têm sido atribuídos à presença da vitamina C e dos flavonoides, que são compostos biologicamente ativos (WANG; CHUANG; HSU, 2008; SHARMA *et al.*, 2017).

Um dos flavonoides maioritários nos sucos de laranja doces é a hesperidina, cujo teor encontrado depende do tipo de cultura e safra (BOCCO *et al.*, 1998; WANG; CHUANG; HSU, 2008). O flavonoide naringina é responsável pelo gosto amargo de sucos de toronja (*Citrus paradisi*) (grapefruit em inglês) e pode ser utilizado como um marcador de adulteração de suco de laranja pela adição de suco de toronja quando o preço deste citrina híbrido cai em relação ao suco de laranja (WIDMER, 2000).

Considerando a viabilidade do etanol como modificador orgânico da fase móvel para determinar hesperidina e naringina por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de Arranjo de Diodos (CLAE-DAD) (GRANDO; LOURENCETTI, 2021) e a importância de métodos de análise simples e eficientes para determinar o teor de hesperidina em sucos e detectar fraudes pela presença de naringina, este estudo apresenta o desenvolvimento de um método comparando diferentes condições experimentais de preparo de padrões e amostra para determinar esses dois flavonoides em suco de laranja.

MATERIAL E MÉTODOS

O equipamento utilizado para a identificação e quantificação de hesperidina e naringina foi o CLAE-DAD Prominence Liquid Chromatograph 20A da marca Shimadzu equipado com degaseificador (DGU-20A5), sistema de bombeamento (LC-20AT), amostrador automático (SIL-20A), forno da coluna (CTO-20A), detector DAD (SPD-M20A) e comunicador (CBM-20A) com o software LC Solutions para o registro e leitura dos cromatogramas. A coluna cromatográfica foi de fase reversa C18 (Restek®, 150 mm × 4,6 mm × partícula de 5 µm, intervalo de pH de 2,5-8,0). As condições cromatográficas consistiram em modo de eluição em gradiente, com fase móvel A composta por solução aquosa de ácido acético (1 %, v/v) e fase móvel B, por etanol. A programação consistiu em manter a condição inicial A:B (75:25, v/v) por 10 min, sendo alterada para A:B (10:90, v/v) aos 15, permanecendo nessa condição até os 20 min e retornando à condição inicial, A:B (75:25, v/v) aos 25 min com permanência nessa condição até os 33 min. Vazão da fase móvel de 0,1 mL min⁻¹, temperatura do forno de 30 °C e volume de injeção de 10 µL foram empregados. Aquisição dos cromatogramas foi feita entre 200 e 550 nm, com quantificação da hesperidina e naringina em λ igual a 283 nm.

A partir de 10 mg dos padrões analítico de hesperidina (94 % de pureza, Sigma Aldrich®) e naringina (99 % de pureza, Sigma Aldrich®) preparou-se soluções estoque mista (100 mL) em diferentes condições de pH (adição ou não de solução de NaOH 1 mol L⁻¹) e os solventes água deionizada Milli-Q®, etanol (Tedia Company, grau HPLC), metanol (Tedia Company, grau HPLC) e fase móvel inicial utilizada no CLAE (ácido acético 1 % e etanol (75:25, v/v), com subsequentemente diluições nos respectivos meios. Essas soluções foram utilizadas para obtenção das curvas de calibração (0,005-0,10 mg mL⁻¹) e quantificação de hesperidina e naringina em amostras de suco de laranja. A solução resultante homogeneizada foi filtrada com membranas de 0,45 µm (PTFE hidrofílico, 25 mm) e transferida para vials para posterior análise cromatográfica.

Amostras de laranja pera (*Citrus Sinensis*) foram adquiridas em comércio local, a casca foi lavada com detergente neutro e após enxague com água de torneira e água destilada, foi seca com papel toalha. O procedimento experimental para a extração de hesperidina e naringina em sucos de laranja foi adaptado de Widmer (2000) e, em um primeiro momento, consistiu na diluição com diferentes solventes (água, metanol e etanol) e variação do pH (adição ou não de solução de NaOH 1 mol L⁻¹). Inicialmente, retirou-se o suco in natura de maneira manual dos frutos, peneirou-se (malha 1 mm) e adicionou-se em um tubo Falcon de 50 mL para centrifugação à 9000 r.p.m. durante 30 minutos para possibilitar a separação da polpa do suco. Em seguida, em triplicata, transferiu-se uma alíquota de 3 mL do sobrenadante para um tubo Falcon de 15 mL contendo 3 mL dos solventes utilizados para o preparo das soluções padrão estoque, e submeteu-se esta mistura em agitação com auxílio do vórtex por 30 segundos. O extrato foi filtrado (membranas de 0,45 µm (PTFE hidrofílico, 25 mm)) com auxílio de uma seringa, para posterior determinação cromatográfica. Medidas de pH foram feitas utilizando pHmetro (DELLAB), calibrado com soluções padrão com pH 4,0, 7,0 e 10,0 (Certipur®, Merck).

A eficiência do método foi avaliada comparando a solubilidade, resposta cromatográfica (valor de área e coeficiente angular das curvas de calibração) e resolução cromatográfica (separação dos picos cromatográficos da hesperidina e naringina). Em meio aquoso, comparou-se a concentração de hesperidina e naringina presente em suco de laranja pera e toronja em função do pH.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ao comparar as diferentes condições experimentais para o preparo da solução padrão mista dos padrões dos analitos, pode-se observar que a adição de 0,9 mL da solução de NaOH 1 mol L⁻¹, resultando em valor de pH próxima a 11, auxiliou na solubilização dos padrões quando água e metanol foram utilizados como solventes. A não completa solubilização ou não desprotonação das moléculas de hesperidina e naringina, em algumas das condições estudadas, resultaram em cromatogramas com baixa resolução cromatográfica (Figura 1), com baixa intensidade de possível pico da hesperidina ou não separação das substâncias. Resultado similar foi obtido quando do uso da condição inicial da fase móvel para o CLAE (ácido acético (1%): etanol, 75, 25, v/v), não sendo possível a separação dos dois analitos.

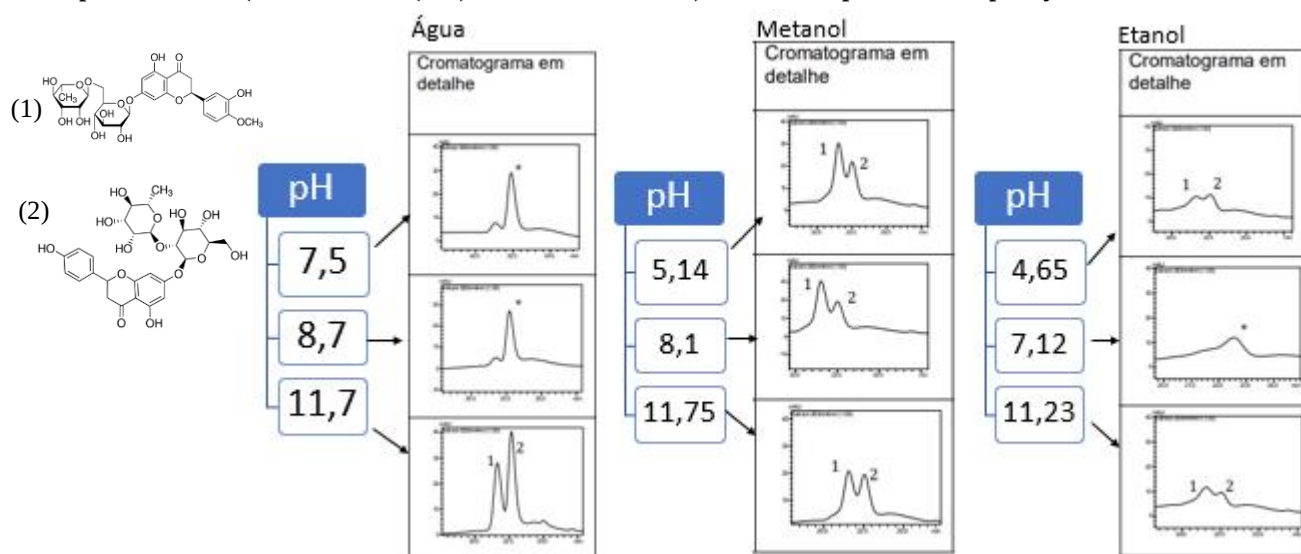


FIGURA 1. Cromatogramas da solução padrão mista de hesperidina (1) e naringina (2) (0,005 mg mL⁻¹) em função do solvente e pH. *: possível coeluição.

A similaridade das estruturas moleculares dos analitos justifica a proximidade dos tempos de retenção da hesperidina (aproximadamente 21,6 min) e naringina (aproximadamente 22,6 min). Embora o uso do etanol como modificador orgânico da fase móvel e fluxo de 0,1 mL min⁻¹ não tenha resultado em completa separação dos picos cromatográficos, como discutido por Grando e Lourencetti (2021), o software LC Solution apresenta a ferramenta para integração manual do cromatograma com divisão dos picos cromatográficos para quando não há total separação de duas substâncias.

Construíram-se curvas de calibração para hesperidina e naringina quando da possibilidade de tratamento (integração) dos cromatogramas empregando o Origin®. Os parâmetros da equação linear são apresentados na Tabela 1. Quando disponível, utilizou-se a equação da curva para a quantificação de hesperidina em amostra de suco de laranja diluída (1:1, v/v) com o solvente utilizado para o preparo da curva de calibração e ajuste do pH feito com solução de NaOH 1 mol L⁻¹ (Tabela 1).

Embora resultados satisfatórios foram obtidos para a linearidade (coeficiente de determinação R² > 0,99) e sensibilidade (altos e similares valores de coeficiente angular da curva de calibração para hesperidina e naringina nas diferentes condições avaliadas), é importante ressaltar a necessidade da visualização dos cromatogramas (Figura 1) para observar melhor resolução cromatográfica quando o meio aquoso e pH aproximadamente 11 é utilizado para o preparo das curvas de calibração.

Independente do solvente e condição de pH utilizado para a diluição da amostra de suco de laranja, foi possível observar um pico cromatográfico com boa resolução da hesperidina, estreito e simétrico. Entretanto, quando utilizado o solvente etanol, o pico apresentou-se largo, o que pode ter influenciado nos valores discrepantes (18,4 e 40,1 mg de hesperidina por 100 mL de suco de suco) quando comparado com a média obtida para as outras condições experimentais utilizando água e metanol como solvente (10,8 mg em 100 mL suco).

TABELA 1. Parâmetros da curva de calibração para hesperidina e naringina em função do preparo das soluções padrão e quantificação de hesperidina em suco de laranja.

	Solvente	pH	Curva calibração				Amostra suco laranja (n=3)		
			tr (min)	Coefficiente angular	Coefficiente linear	R ²	tr (min)	[Hesperidina] mg/100 mL	(DPR)
Hesperidina	Água	7,56	#						
		8,7	#						
		11,7	21,548	1,58.10 ⁸	-170014,8	0,9996	21,529	10,6	1,0
	Metanol	5,14	22,018	1,52.10 ⁸	37628,5	1	21,475	6,6	1,6
		8,1	21,502	1,16.10 ⁸	251373,6	0,9999	21,491	10,8	0,4
		11,75	21,548	1,33.10 ⁸	33402,3	0,9976	21,516	15,1	1,1
	Etanol	4,65	21,608	5,29.10 ⁷	75714,5	0,9997	21,288	18,4	0,7
		7,12	#						
		11,23	21,578	5,15.10 ⁷	-108581,6	0,9864	21,402	40,1	0,4
	FM	3,9	&						
Naringina	Água	7,56	#						
		8,7	#						
		11,7	22,581	1,41.10 ⁷	156225,5	0,9997	-	-	-
	Metanol	5,14	22,492	1,26.10 ⁷	-12976,0	1	-	-	-
		8,1	22,481	1,28.10 ⁷	-130096,2	0,9996	-	-	-
		11,75	22,52	9,82.10 ⁷	26116,6	0,9931	-	-	-
	Etanol	4,65	22,553	5,57.10 ⁷	-51539,7	0,9994	-	-	-
		7,12	#						
		11,23	22,506	1,98.10 ⁷	-35391,8	0,9864	-	-	-
	FM	3,9	22,545	1,79.10 ⁸	-11041,6	0,9999	-	-	-

#: Não completa solubilização dos padrões e possível coeluição. &: Possível coeluição. -: não encontrado na amostra. FM: Fase móvel (condição inicial da fase móvel utilizada no CLAE). *: Diluição em função do solvente.

Utilizou-se curvas de calibração preparadas com água e valor de pH aproximadamente 11, para quantificar hesperidina e naringina em amostras de suco de laranja (pH = 3,6) e toronja (pH = 3,09), disponíveis no comércio local considerando diferentes valores de pH para a diluição do suco. Após a centrifugação das amostras de sucos da laranja e toronja, procedeu-se com a diluição adicionando-se 3 mL da amostra de suco, e 3 mL de água na ausência (condição 1, pH próximo aos valores dos sucos) e presença de solução de NaOH (3 mL da mistura água e NaOH para atingir valores crescentes de pH do suco diluído, como apresentado na Tabela 2). Em todas as condições o volume final da amostra foi 6,0 mL. Após agitação em vórtex por 30 segundos, as amostras foram filtradas e transferida para frasco amostrados (vials) para determinação cromatográfica. Foi possível verificar a resposta dos analitos e resolução cromatográfica em diferentes valores de pH. Para a condição 3 (uso de 2,5 mL de água e 0,5 mL de solução de NaOH) foi possível obter alto valor de pH para a amostra de suco de laranja, mas não para o suco de toronja, pH = 5,77. Desta forma, novas condições foram testadas para obter valores de pH mais elevados para o suco de toronja.

TABELA 2. Influência do pH para o preparo das amostras de sucos (n=2) de laranja e toronja.

	Condição	pH	tr (min)	[Hesperidina]	DPR	tr (min)	[Naringina]	
			Hesperidina	mg/100mL	(%)	Naringina	mg/100mL	DPR (%)
Laranja	1	3,88	21,529	10,7	1,4	-	-	-
	2	8,13	21,544	10,5	0,8	-	-	-
	3	10,98	21,544	8,9	0,2	-	-	-
Toronja	1	3,15	21,728	8,4	3,2	22,618	40,2	0,1
	2	4,71	21,636	8,0	1	22,604	35,6	18,1
	3	5,77	21,562	8,2	1,6	22,535	40,3	0,7
	4	11,71	21,495*	5,5	-	22,530	25,2	-
	5	12,11	21,323	3,74	13,2	22,485	17,9	12,9

*n = 1. tr = tempo de retenção. DPR: desvio padrão relativo

Como apresentado na Tabela 2, maiores valores de concentração de hesperidina nas diferentes amostras foram obtidos com a diluição do suco em meio aquoso, sem adição de solução de NaOH. Para a amostra de toronja, houve maior redução das concentrações de hesperidina e naringina com o aumento do pH do meio. Considerando a boa resolução cromatográfica observada também para a diluição apenas com água (Figura 2), a continuidade do estudo para a validação do método seguirá com esta condição de preparo da amostra.

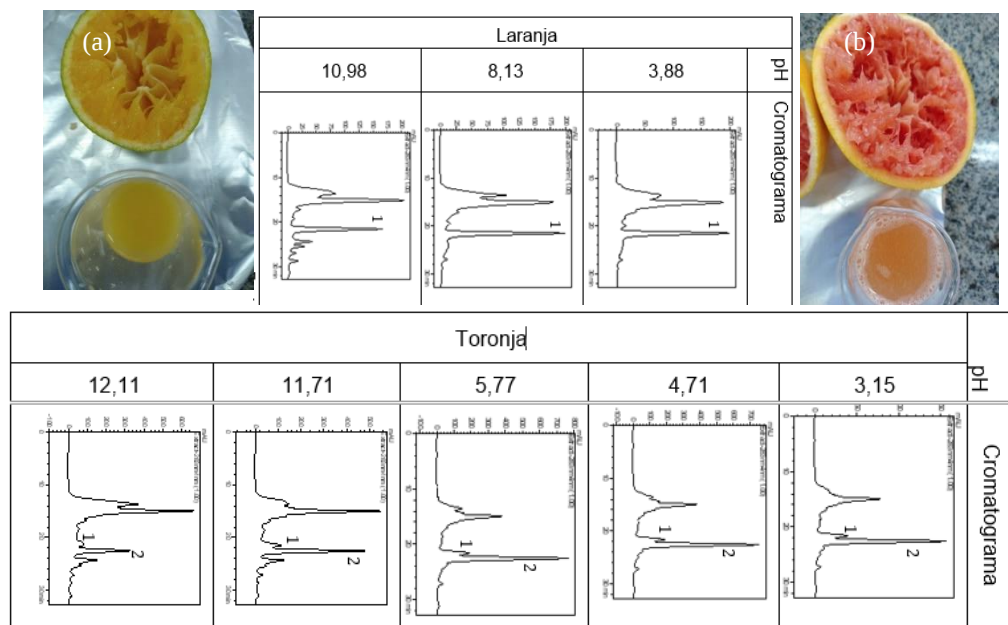


FIGURA 2. Cromatogramas das amostras de suco de laranja (a) e toronja (b) diluídas em água.

CONCLUSÕES

As condições de preparo das soluções padrão em meio aquoso e pH aproximadamente 11 e diluição da amostra de suco de laranja em água (1:1, v/v) foram as mais eficientes para a determinação de hesperidina e naringina. O uso do etanol como modificador orgânico da fase móvel apresentou-se viável e será utilizado para a validação do método de análise.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao IFSP - Câmpus Matão pela infraestrutura disponível e pela bolsa PIBIFSP, assim como aos técnicos do laboratório pelo suporte técnico

REFERÊNCIAS

- BOCCO, A.; CUVELIER, M. E.; RICHRAD, H.; BERSSET, C. Antioxidant activity and phenolic composition of citrus peel and seed extracts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, p. 2123-2129, 1998.
- EVANS, C.R.; MILLER, N. J.; PAGANDA, G. Antioxidant properties of phenolic compounds. **Trends in Plant Science**, v. 2, p. 152-159, 1997.
- GRANDO, D.; LOURENCETTI, C. **Viabilidade do uso de etanol como modificador orgânico para determinar flavonóides em sucos de frutas cítricas**. 2021. In: Congresso de Inovação, Ciência e Tecnologia do IFSP (CONICT), nº 12, 2021, Cubatão.
- MEYER, O. C. Safety and security of Daflon 500 mg in venous insufficiency and in hemorrhoidal disease. **Angiology**, v. 45, p. 579-84, 1994.
- SHARMA, K.; MAHATO, N.; CHO, M. H.; LEE, Y. R. Converting citrus wastes into value-added products: Economic and environmently friendly approaches. **Nutrition**, v. 34, p. 29-46, 2017.
- WANG, Y-C.; CHUANG, Y-C. HSU, H.-W. The flavonoid, carotenoid and pectin content in peels of citrus cultivated in Taiwan. **Food Chemistry**, v. 106, p. 277-284, 2008.
- WIDMER, W. Determination of naringin and neohesperidin in orange juice by liquid chromatography with UV detection to detect the presence of grapefruit juice: collaborative study. **Journal of AOAC International**, v. 83, n. 5, p. 1155-1165, 2000.