

SÍLVIA MENDONÇA VIEIRA

**METODOLOGIA ANALÍTICA PARA AMINAS
BIOATIVAS COMO ÍNDICE DA AUTENTICIDADE E
DA PROPORÇÃO DE SUCO EM REFRIGERANTE
DE LARANJA**

**Faculdade de Farmácia da UFMG
Belo Horizonte, MG
2006**

SÍLVIA MENDONÇA VIEIRA

**METODOLOGIA ANALÍTICA PARA AMINAS
BIOATIVAS COMO ÍNDICE DA AUTENTICIDADE E
DA PROPORÇÃO DE SUCO EM REFRIGERANTE
DE LARANJA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor em Ciência de Alimentos.

Orientadora: Prof. Dra. Maria Beatriz A. Glória

Dedico este trabalho aos meus pais Hélio e Estela, por tantas coisas que já fizeram por mim, aos meus irmãos, Lígia, Mateus, Marcelo e Jane, pelo apoio e incentivo, e ao Ricardo por seu carinho e dedicação.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por mais esta etapa vencida em minha vida.

À Profa. Dra. Maria Beatriz Abreu Glória, pela orientação, apoio e amizade. Durante este tempo em que convivemos aprendi a admirar seu profissionalismo e dedicação ao trabalho, mas pude também desfrutar da sua amizade, pois acompanhou momentos importantes de minha vida, algumas dificuldades pessoais, pudemos compartilhar momentos de alegria e de tristeza (graças a Deus, mais alegrias que tristezas) e vibrou comigo a cada vitória alcançada.

Ao Prof. Dr. José Virgílio Coelho pelo auxílio nas metodologias físico-químicas, por estar sempre pronto a esclarecer alguma dúvida e pelo espírito divertido e amigo.

Aos demais Professores do Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, pela contribuição em minha formação científica.

Aos Srs. Luís Bagnariol Netto, Marcos Augusto Calera, Maurílio Rodrigues Pego e Sérgio Aparecido e a empresa Citrosuco Paulista, pelo fornecimento das amostras de suco concentrado durante as safras de produção de laranja e pela atenção dispensada durante as visitas na unidade de Limeira (SP).

Ao Sr. José Mauro de Moraes, Danielle Michel Serafim e a empresa Refrigerantes Minas Gerais Ltda., pelo fornecimento das amostras de refrigerante para a realização deste trabalho.

À Scheilla Vitorino Carvalho de Souza pelos ensinamentos sobre validação.

À prof. Lígia Maria Moreira de Campos do Departamento de Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia que gentilmente emprestou o refratômetro para as análises físico-químicas.

Ao CNPq pela bolsa e pelo apoio financeiro ao projeto.

Aos colegas:

Da Pós-Graduação: Maria José Rubin Gomes, Carol Líliam Coelho Silva e Luciana Rodrigues Faleiro. Cada uma seguiu o seu caminho, mas deixaram boas lembranças da época do mestrado.

Do Laboratório de Bioquímica de Alimentos: Flávia Beatriz Custódio, Renata Adriana Labanca, Tânia Maria Leite da Silveira, Ana Amélia Paolucci Almeida, Lúcia Peret de Almeida, Giuliana Elisa de Oliveira, Cristina da Cunha Naguethini, Paula Santiago Silva, Flávia Vitorino Freitas, Cyntia Karine Barreto Batista, Ana Paula Souza Moreira, Karine Helena Theodoro, Milton Cabral de Vasconcelos Neto, Vilma Silva Vieira, Maria Cristina

Cassiano de Oliveira, Beatriz Depes Tallon Neto, Érico Tavares, Leonardo Lacerda Rocha, Marcos Laje, Ana Paula Querubino, Tássia Souza. Aprendi muito com vocês sobre aminas, também fiz boas amizades. Encontrei sempre alguém pronto para ajudar ou opinar sobre um pôster, um trabalho, para almoçar na cantina... Vou sentir muitas saudades das conversas, das risadas, das festinhas, enfim, desta boa convivência.

Aos alunos de Iniciação científica que ajudaram em algumas etapas do trabalho: Fernanda Caroline Góes, Paloma Souza dos Santos, Márcia Cassimira Marcos.

Ao João Tavares Neto que muito contribuiu na época em que participou como bolsista de Iniciação científica.

Ao meu pai, que trilhou pelos caminhos da carreira docente e foi um exemplo de dedicação, humildade e perseverança, e que também me ensinou que a nobreza de caráter é o maior valor do ser humano.

À minha mãe, que abriu mão de muitos de seus sonhos para dedicar-se à minha formação e de meus irmãos.

Ao Sr. Humberto Terrazas Salas e D. Bernadete Bezerra de Terrazas pelo carinho, amizade e estímulo.

Ao Ricardo por seu carinho, paciência, senso de humor e por ser meu grande companheiro durante esta fase de dificuldades, de incertezas, pouco dinheiro, mas que foi muito importante para meu crescimento profissional e amadurecimento pessoal.

Aos meus irmãos, os quais, cada um, tem qualidades que me enchem de admiração e orgulho. A Lígia, sua força e coragem diante das adversidades da vida; Jane, mãe dedicada e profissional exemplar; Marcelo, excelente escritor, quem o conhece sabe que é muito sensível e amigo apesar da cara de bravo; Mateus, exemplo de fé e de vida dedicada a Deus.

Aos meus sobrinhos: Gabriel, Bruno e Arthur que me enchem de orgulho.

A todos que de alguma forma contribuíram para que este trabalho chegasse ao fim.

Muito Obrigada!

“O maior perigo é não correr risco nenhum. Aqueles que nada arriscam e nada fazem, não tem nada e nada são. Podem evitar sofrimento e tristeza, mas simplesmente não podem aprender, sentir mudar, crescer, amar e viver. Só quem se arrisca é livre.”

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	10
LISTA DE FIGURAS	12
RESUMO	14
ABSTRACT	15
INTRODUÇÃO	16
REVISÃO DA LITERATURA	18
1 LARANJA	18
1.1 HISTÓRICO E PRODUÇÃO DA LARANJA	18
1.2 MORFOLOGIA DA LARANJA	18
1.3 FISILOGIA DA LARANJA	20
2 SUCO DE LARANJA	22
2.1 PROCESSAMENTO DE SUCO DE LARANJA CONCENTRADO	24
2.2 COMPOSIÇÃO DO SUCO DE LARANJA	27
3 REFRIGERANTE	27
4 AUTENTICIDADE DO SUCO DE LARANJA	31
5 AMINAS BIOATIVAS	33
5.1 AMINAS EM LARANJA E DERIVADOS	38
5.1.1 EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO	40
5.1.2 SEPARAÇÃO	42
5.1.3 DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO	43
6 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS	44
CHAPTER I. ION-PAIR HPLC METHOD FOR THE DETERMINATION OF SYNEPHRINE, OCTOPAMINE AND TYRAMINE IN ORANGE PRODUCTS	49
ABSTRACT	49
1 OBJECTIVE	50
2 MATERIALS AND METHODS	50
2.1 Chemicals and reagents	50
2.2 Liquid chromatography system	51
2.3 Procedures	51
2.3.1 Optimization of the chromatographic conditions for the separation of the amines	51
2.3.2 Extraction and purification of the amines from orange products	51
2.3.3 Validation of the developed method	52
Linearity	52
Detection limit	53
Quantification limits	53
Selectivity	53
Accuracy and precision	53
2.3.4 Standard solution stability	53
2.3.5 Levels of octopamine, synephrine and tyramine in orange juice and orange soft drinks	53

3	RESULTS AND DISCUSSION	54
3.1	Optimization of the chromatographic conditions for the separation of the amines	54
3.2	Extraction and purification of the amines from orange products	56
3.3	Validation of the developed method	56
	Calibration curve linearity	56
	Detection and quantification limits	60
	Accuracy and precision	61
3.4	Standard solution stability	62
3.5	Levels of octopamine, synephrine and tyramine in orange juice and orange soft drinks	62
4	CONCLUSION	64

CAPÍTULO II. PERFIL E TEORES DE AMINAS BIOATIVAS EM SUCOS E REFRIGERANTES DE LARANJA 65

	RESUMO	65
1	OBJETIVOS	66
2	MATERIAL E MÉTODOS	66
2.1	Material	66
2.2	Métodos de análise	67
	Aminas bioativas	67
	Potencial hidrogeniônico	68
	Sólidos solúveis totais	68
	Acidez total	68
	Densidade	68
	Açúcares totais	68
2.3	Análise estatística	69
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	69
3.1	Perfil e teores de aminas bioativas em suco de laranja	69
3.2	Características físico-químicas do suco de laranja	73
3.3	Perfil e teores de aminas bioativas em refrigerantes de laranja	75
3.4	Características físico-químicas	77
4	CONCLUSÃO	78

CAPÍTULO III. INFLUÊNCIA DO PROCESSAMENTO NOS TEORES DE AMINAS BIOATIVAS E DE PROLINA E NAS CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DE SUCO DE LARANJA CONCENTRADO 80

	RESUMO	80
1	OBJETIVO	81
2	MATERIAL E MÉTODOS	81
2.1	Material	81
2.2	Métodos de análise	81
	Potencial hidrogeniônico	81
	Acidez total titulável	82
	Densidade relativa	82
	Açúcares redutores, não redutores e totais	82
	Prolina	83
	Aminas bioativas	83

		9
2.3	Análise estatística	84
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	84
3.1	Características físico-químicas do suco de laranja	84
3.2	Aminas bioativas	87
3.3	Teores de prolina	88
4	CONCLUSÃO	89

CAPÍTULO IV. INFLUÊNCIA DA ÉPOCA DE COLHEITA NOS TEORES DE AMINAS BIOATIVAS E DE PROLINA E NAS CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DE SUCO DE LARANJA CONCENTRADO 90

	RESUMO	90
1	OBJETIVOS	91
2	MATERIAL E MÉTODOS	91
2.1	Material	91
2.2	Métodos de análise	91
	Aminas bioativas	91
	Prolina	92
	Potencial hidrogeniônico	92
	Acidez total	92
	Densidade	92
	Açúcares totais	93
	Análise estatística	93
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	93
3.1	Aminas bioativas	93
3.2	Teores de prolina	98
3.3	Características físico-químicas de suco de laranja	100
3.4	Equação para determinar a autenticidade de suco de laranja baseada nos teores de sinefrina	101
4	CONCLUSÃO	104

CAPÍTULO V. MODELO PARA VERIFICAR A PROPORÇÃO DE SUCO EM REFRIGERANTE DE LARANJA 105

	RESUMO	105
1	OBJETIVOS	106
2	MATERIAL E MÉTODOS	106
	Amostras	106
	Determinação das aminas	106
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	107
3.1	Teores de aminas no suco de laranja concentrado	107
3.2	Correlação entre o percentual de suco adicionado e o teor de aminas	108
3.3	Percentual de suco adicionado em refrigerante de laranja	109
4	CONCLUSÃO	110

	CONCLUSÕES INTEGRADAS	111
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	113

LISTA DE TABELAS

1	Composição química aproximada da laranja e do suco de laranja	23
2	Características físico-químicas do suco de laranja	23
3	Aminoácidos presentes no suco de laranja	28
4	Tipos de aminas bioativa detectadas em frutas e hortaliças	37
5	Teores de aminas fenólicas em sucos de frutas cítricas	39
6	Metodologias para a extração e purificação de aminas	41
7	Metodologias utilizando cromatografia de troca iônica para a separação e detecção de aminas em produtos de laranja	43
8	Metodologias utilizando CG para a separação e detecção de aminas em laranja	43
9	Metodologias utilizando CLAE para a separação e detecção de sinefrina	44

CHAPTER I

I.1	ANOVA statistics for regression analysis of octopamine, synephrine and tyramine including lack of fit test	60
I.2	Homocedasticity evaluation by Levene's test for octopamine, synephrine and tyramine	60
I.3	Mean recoveries and coefficients of variation for octopamine, synephrine and tyramine in soft drink spiked with different concentrations of standards, cleaned-up with Sep-Pak C18 and analysed by HPLC	61
I.4	Mean levels of octopamine, synephrine and tyramine (mg/L) in different brands of orange juice and orange soft drinks	63

CAPÍTULO II

II.1	Teores médios de aminas bioativas em diferentes marcas de suco de laranja	72
II.2	Características físico-químicas de amostras de diferentes marcas de suco de laranja	74
II.3	Correlação significativa em nível de 99% de probabilidade entre os teores de aminas bioativas e os parâmetros físico-químicos no suco de laranja	74
II.4	Teores médios de aminas bioativas em amostras de diferentes marcas de refrigerantes de laranja	76
II.5	Características físico-químicas de amostras de diferentes marcas de refrigerante de laranja	77
II.6	Correlação significativa em nível de 99% de probabilidade entre os teores de aminas bioativas e os parâmetros físico-químicos no refrigerante de laranja	78

CAPÍTULO III

III.1	Valores de pH, acidez, ratio e densidade de suco de laranja em diferentes etapas de seu processo de fabricação	85
-------	--	----

III.2	Teores de açúcares redutores, não redutores e totais de suco de laranja em diferentes etapas de seu processo de fabricação	86
III.3	Teores médios de aminos bioativas em amostras de suco de laranja coletados em sete diferentes pontos da linha de produção de uma indústria processadora	87
III.4	Correlação significativa em nível de 99% de probabilidade entre os teores de aminos bioativas e os parâmetros físico-químicos em suco de laranja	89

CAPÍTULO IV

IV.1	Teores de aminos bioativas em amostras de suco de laranja coletados durante o período de agosto de 2003 a dezembro de 2005 em uma indústria processadora	94
IV.2	Comparações múltiplas entre os teores de sinefrina em amostras de suco de laranja coletados durante o período de agosto de 2003 a março de 2004 em uma unidade processadora	96
IV.3	Teste de Kruskal-Wallis para verificação de diferença nos teores de putrescina em amostras de suco de laranja obtidos em três diferentes safras de produção de laranja	96
IV.4	Comparações múltiplas entre os teores de espermidina e espermina em amostras de suco de laranja coletados durante o período de agosto de 2003 a dezembro de 2005 em uma unidade processadora	97
IV.5	Comparações múltiplas entre os teores de prolina em amostras de suco de laranja coletados durante o período de agosto de 2003 a março de 2004 em uma unidade processadora	99
IV.6	Características físico-químicas de amostras de suco de laranja coletados durante o período de agosto de 2003 a dezembro de 2005 em uma indústria processadora	100
IV.7	Análise de variância para o modelo relacionando sinefrina e relação Brix/Acidez ajustado	102
IV.8	Modelo ajustado relacionando sinefrina e relação Brix/Acidez e testes dos parâmetros	102
IV.9	Teste de Ryan-Joiner para verificação da suposição de normalidade dos resíduos	102

CAPÍTULO V

V.1	Teores de sinefrina encontrados e percentual de suco adicionado calculado em refrigerantes de laranja	109
-----	---	-----

LISTA DE FIGURAS

1	Principais países produtores de laranja no ano de 2005	19
2	Corte transversal de uma laranja	20
3	Estágios de desenvolvimento da laranja	21
4	Etapas para a obtenção do suco concentrado de laranja	25
5	Biossíntese de aminas bioativas em vegetais	36
6	Estrutura química de algumas aminas presentes no suco de laranja	39
7	Síntese de aminas fenólicas em citros	40

CHAPTER I

I.1	Ultra-violet spectra of octopamine, synephrine and tyramine at the concentration of 12 µg/mL in 0.1 M sodium acetate and 10 mM sodium octanesulfonate (pH 4.9):acetonitrile (91:9, v/v)	54
I.2	Typical chromatogram of a standard solution (12 µg/mL) of octopamine, synephrine and tyramine and of an orange juice sample cleaned-up with Sep Pak C18	55
I.3	Influence of the purification of orange juice with n-butanol and Sep-Pak C18 and of orange soft drink with Sep-Pak C18 spiked with three levels of amines on the recoveries of octopamine, synephrine and tyramine	57
I.4	Residual plots for outlier diagnosis by Jackknife standardized residuals test for octopamine, synephrine, and tyramine	58
I.5	Normality diagrams of residues for octopamine, sinephrine and tyramine according to the Ryan-Joiner test	59
I.6	Levels of octopamine, synephrine and tyramine in standard solution during storage for 120 days at 5-8 °C	62

CAPÍTULO II

II.1	Ocorrência das aminas bioativas em amostras de suco de laranja	69
II.2	Cromatograma de aminas bioativas detectadas por CLAE par-iônico detecção fluorimétrica e detecção no UV-VIS (275 nm)	70
II.3	Contribuição percentual de cada amina ao teor total em diferentes marcas de suco de laranja	73
II.4	Ocorrência de aminas bioativas em amostras de refrigerantes de laranja	75
II.5	Contribuição percentual de cada amina ao teor total de aminas em diferentes marcas de refrigerante de laranja	76

CAPÍTULO III

III.1	Fluxograma da produção de suco concentrado de laranja indicando os pontos nos quais foram feitas coletas de amostras	82
III.2	Sólidos solúveis (expressos em °Brix) de amostras coletadas durante diferentes etapas do processamento de suco de laranja concentrado	85
III.3	Variação nos teores de sinefrina durante o processamento de laranja para obtenção de suco concentrado	88
III.4	Variação nos teores de prolina durante o processamento de laranja para obtenção de suco concentrado	88

CAPÍTULO IV

IV.1	Teores de sinefrina em amostras de suco de laranja coletados durante o	
------	--	--

	período de agosto de 2003 a dezembro de 2005 em uma indústria processadora	95
IV.2	Teores totais de aminos bioativas em amostras de suco de laranja coletados durante o período de agosto de 2003 a dezembro de 2005 em uma indústria procesadora	95
IV.3	Teores de putrescina em amostras de suco de laranja coletados durante o período de agosto de 2003 a dezembro de 2005 em uma indústria processadora	97
IV.4	Teores médios de prolina em suco concentrado de laranja obtidos no período de agosto de 2003 a dezembro de 2005	98
IV.5	Valores ajustados versus resíduos padronizados para o modelo relacionando sinefrina e relação Brix/Acidez	103
IV.6	Gráfico de ordem de observações versus resíduos padronizados para o modelo relacionando sinefrina e relação Brix/Acidez	103

CAPÍTULO V

V.1	Teores das aminos octopamina e sinefrina em diferentes amostras de suco de laranja (10,5° Brix) utilizado no preparo de refrigerantes	107
V.2	Influência do nível de adição de suco em refrigerante nos teores de octopamina e sinefrina em refrigerante de laranja	108

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo avaliar o potencial de utilização de aminos bioativas e prolina como índice da autenticidade e da proporção de suco em produtos de laranja. Uma metodologia por CLAE-par iônico para quantificar sinefrina em produtos de laranja foi desenvolvida e validada. Sucos de laranja disponíveis no mercado consumidor foram caracterizados quanto aos teores de aminos bioativas e parâmetros físico-químicos. Foi detectada a presença de nove aminos em suco de laranja estando três (sinefrina, putrescina e espermidina) presentes em todas as amostras. Os teores de sinefrina não variaram significativamente ao longo do período de colheita. Entretanto diferença significativa foi observada nos teores de prolina, de espermidina, na relação brix/acidez e de acidez e de pH. Estes resultados foram similares nas três safras consecutivas estudadas. Conclui-se que a sinefrina seria índice adequado para detectar a presença de laranja em produtos de laranja. Uma equação foi proposta para estimar o teor de suco adicionado em refrigerante de laranja. Nesta equação, os teores de sinefrina poderão ser ajustados em função da relação brix/acidez do suco adicionado. Amostras de refrigerantes de laranja disponíveis no mercado foram analisadas quanto aos teores de sinefrina. Com base na correlação proposta, apenas 43% das amostras de refrigerante contêm o percentual de suco estipulado pela legislação brasileira.

Palavras-chave: aminos bioativas, prolina, laranja, suco, refrigerante, sinefrina.

ABSTRACT

THE POTENTIAL OF USING BIOACTIVE AMINES AND PROLINE TO DETERMINE THE AUTHENTICITY AND THE PROPORTION OF JUICE ADDED TO ORANGE PRODUCTS. The objective of this study was to investigate the potential of using bioactive amines and proline as an index of authenticity and of the proportion of juice added to orange products. An ion-pair-HPLC method was developed and validated for the determination of synephrine in orange products. Orange juice samples available in the market were characterized according to the levels of bioactive amines, proline and physico-chemical parameters. Nine amines were detected with three (synephrine, putrescine and spermidine) present in every sample analysed. The levels of amines remained unchanged throughout the production of orange juice concentrate. The levels of synephrine did not change significantly throughout the harvest period. However significant difference was observed on the levels of proline, spermidine, on the brix/acidity ratio and on the acidity and pH. These results were similar in the three consecutive harvests. Based on these results, synephrine would be the most appropriate index for the detection of orange in orange products. An equation was proposed to estimate the amount of juice added to orange soft drink. In this equation, the levels of synephrine can be estimated according to the brix/acidity ratio of the orange juice. Samples of soft drink from the market were analysed for synephrine. Only 43% of the samples contained the percent of orange juice stipulated by the Brazilian legislation according to the relation proposed between synephrine and orange juice content.

Key words: bioactive amines, proline, orange, juice, soft drink, synephrine.

INTRODUÇÃO

Sucos e produtos à base de frutas exercem um importante papel na nutrição humana e na indústria de alimentos em todo o mundo. Os sucos cítricos são excelentes fontes de vitamina C e carotenóides. Estes sucos abrangem uma parcela considerável de todos os sucos de frutas consumidos (SOMOGY et al., 1996).

O Brasil destaca-se como o maior produtor mundial de suco concentrado de laranja, tendo exportado 1,01 milhões de toneladas de suco congelado em 2004, arrecadando 790 milhões de dólares em rendimentos (FAO, 2006). A produção de refrigerantes é também um importante segmento, visto o crescente aumento no consumo deste produto pela população brasileira. A indústria de refrigerantes no Brasil possui um enorme parque fabril espalhado por quase todo o território nacional, e foi responsável pela produção e distribuição de 12 bilhões de litros em 2004 (ABIR, 2006).

Refrigerante é a bebida gaseificada, obtida pela dissolução, em água potável de suco ou extrato vegetal, adicionada de açúcares. De acordo com os padrões de identidade e qualidade, os refrigerantes que apresentarem características sensoriais próprias de frutas deverão conter, obrigatoriamente, suco natural ou concentrado da respectiva fruta, na quantidade mínima prevista por decreto. No caso do refrigerante de laranja, este deverá apresentar um mínimo de 10% em volume de suco natural ou equivalente em concentrado de laranja (BRASIL, 1997). Assim sendo, o refrigerante de laranja seria a bebida composta por água, adoçantes, acidulantes, corantes, aromatizantes e gás carbônico, além do suco da fruta em um volume mínimo de 10 % (TOCCHINI & NISIDA, 1995).

Vários trabalhos têm sido realizados no intuito de desenvolver metodologia para detectar adulterações em bebidas cítricas. Estes se baseiam na determinação de prolina (TING & DESZYCK, 1960), betaína (LEWIS, 1966), serina (MORGAN, 1966), aminas fenólicas (COFFIN, 1968) e aminoácidos (VANDERCOOK & PRICE, 1972; 1974). Porém, destas metodologias, algumas são demoradas e outras não oferecem a desejada confiabilidade e segurança nos resultados. O teor de prolina livre é usado na Europa para detectar diluições excessivas do suco de laranja, como também, detectar a adição de suco de tangerina (*Citrus reticulata* sp.) ao suco de laranja através do decréscimo de prolina e aumento no nível de éster de criptoxantina, pigmento abundante na tangerina (OLIVEIRA et al., 2002). No Brasil, o controle para verificar o percentual de suco adicionado na elaboração do refrigerante de laranja era feito através de notas fiscais

referentes à compra de suco, dando margem a adulterações, pois este não é um controle efetivo. O teor de prolina foi proposto pelo Ministério da Agricultura como critério de qualidade de bebidas não alcoólicas (BRASIL, 2005). Entretanto, estudos são inexistentes com relação aos níveis deste aminoácido em sucos produzidos com as variedades brasileiras de laranja.

Foi sugerido por STEWART & WHEATON (1964) e CANCELON (1999) que as aminas bioativas poderiam ser utilizadas na determinação do teor de suco de laranja em produtos derivados. Dentre as aminas bioativas encontradas em laranja tem-se a metiltiramina, feruloilputrescina, noradrenalina e triptamina em menores quantidades, e a sinefrina, em maiores quantidades (WHEATON & STEWART, 1965; HALÁSZ et al., 1994). Dentre estas aminas, a sinefrina, principal amina bioativa encontrada no suco de laranja, é característica desta espécie, não sendo comumente detectada em outros produtos alimentícios (GLÓRIA, 2005).

Assim sendo, este trabalho teve como objetivo geral avaliar a qualidade de sucos e refrigerantes de laranja e o potencial de utilização de aminas bioativas e prolina para determinar a autenticidade e a proporção de suco em produtos de laranja.

Os objetivos específicos foram: (i) desenvolver metodologia analítica por CLAE para a determinação quantitativa de sinefrina e octopamina em suco e produtos de laranja e validá-la; (ii) determinar o perfil e os teores de aminas bioativas em produtos de laranja e correlacioná-los com as características físico-químicas; (iii) determinar a influência do processamento de suco de laranja concentrado no perfil e teores de aminas bioativas, nos teores de prolina e nas características físico-químicas; (iv) determinar a influência da safra no perfil de aminas bioativas, nos teores de prolina e nas características físico-químicas de suco de laranja concentrado; (v) propor um índice para detectar a adição de suco em produtos de laranja baseado em sinefrina.

REVISÃO DA LITERATURA

1. LARANJA

1.1. HISTÓRICO E PRODUÇÃO DA LARANJA

A laranja é originária do sudeste da Ásia e hoje cresce nas regiões tropical e subtropical a 40° latitude norte e 40° latitude sul, em regiões úmidas e áridas (SEYMOUR et al., 1993). No Brasil, foram introduzidas pelas primeiras expedições colonizadoras, provavelmente na Bahia, tanto assim que, em 1540 já existiam laranjais espalhados pelo litoral brasileiro de norte a sul (PORTAL..., 2004).

Foi, no entanto, no centro sul, graças ao estabelecimento de grandes núcleos populacionais, que a citricultura encontrou seu principal centro de desenvolvimento. Com início em Limeira, São Paulo, nos anos 50, a citricultura expandiu-se na década seguinte para Bebedouro e Araraquara. O impulso do circuito produtivo citrícola no Brasil, especialmente em São Paulo (principal região produtora), deveu-se à instalação das grandes indústrias de suco de laranja concentrado na década de 60. Sua implantação e expansão nesse estado proporcionaram o desenvolvimento do maior parque citrícola do mundo que, desde seu nascimento, teve como destino principal o mercado internacional (TOLEDO & CASTILLO, 2004). A motivação para a instalação destas indústrias foi a grande geada que, em 1962, destruiu grande parte da citricultura da Flórida, Estados Unidos, que era o maior produtor mundial de suco concentrado. Os danos causados foram enormes e a recuperação muito lenta. A falta de suco provocada pela geada transformou o Brasil em um pólo alternativo para os mercados norte-americanos e europeus (ABECITRUS, 2001).

Impulsionado pelo crescimento das exportações e pelo desenvolvimento da indústria citrícola, o Brasil é hoje o maior produtor mundial de laranjas e o estado de São Paulo é responsável por mais de 70% da produção nacional. De acordo com a FAO (2006), o Brasil produziu cerca de 17,8 bilhões de toneladas de laranja em 2005, correspondendo a 35,5% do total da produção mundial (Figura 1).

1.2. MORFOLOGIA DA LARANJA

A laranja é composta de três diferentes partes morfológicas: epicarpo, mesocarpo e endocarpo. De acordo com suas características morfológicas, é classificada como um

fruto carnoso e são designados como hesperídeos, ou seja, apresenta epicarpo contendo glândulas oleosas, mesocarpo esponjoso e endocarpo membranoso, com tricomas (vesículas) repletas de suco (CHITARRA & CHITARRA, 2005).

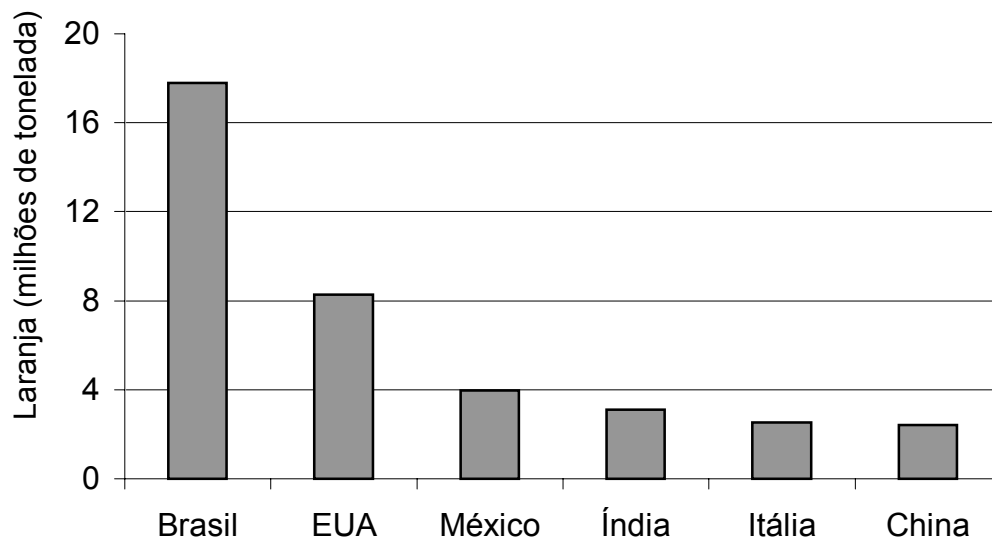


Figura 1. Principais países produtores de laranja no ano de 2005.

Fonte: FAO (2006).

O epicarpo, que consiste da porção colorida da casca, é também conhecido como flavedo. No flavedo estão localizadas as células que contêm os carotenóides, os quais dão a cor característica dos frutos cítricos. As glândulas de óleos, também encontradas no flavedo, são as estruturas que contêm os óleos essenciais característicos de cada cultivar. Imediatamente sob o epicarpo está localizado o mesocarpo ou albedo, que é uma camada tipicamente espessa, branca e esponjosa. O albedo consiste de grandes células parenquimatosas ricas em substâncias pécticas e hemicelulose. Envolve completamente o endocarpo, que é a porção comestível da fruta. Juntos, o flavedo (epicarpo) e albedo (mesocarpo) recebem o nome de pericarpo (Figura 2) (TING & ROUSEFF, 1986).

A parte comestível do fruto (endocarpo) é composta de carpelos ou segmentos. Dentro de cada segmento estão localizadas as vesículas de suco. Muitos constituintes químicos estão distribuídos entre os vários tecidos. Alguns destes mais concentrados em algum tecido que em outro. Por exemplo, flavononas glicosiladas são encontradas em maior concentração no albedo do que em outras vesículas de suco ou flavedo. A limonina, que é um composto amargo, é encontrada em maiores teores nas sementes e membranas. Os açúcares são bem distribuídos nas células de todos os tecidos,

entretanto, as células do suco estocam a maior quantidade (nos vacúolos), os quais também possuem a maior acidez titulável (TING & ROUSEFF, 1986).

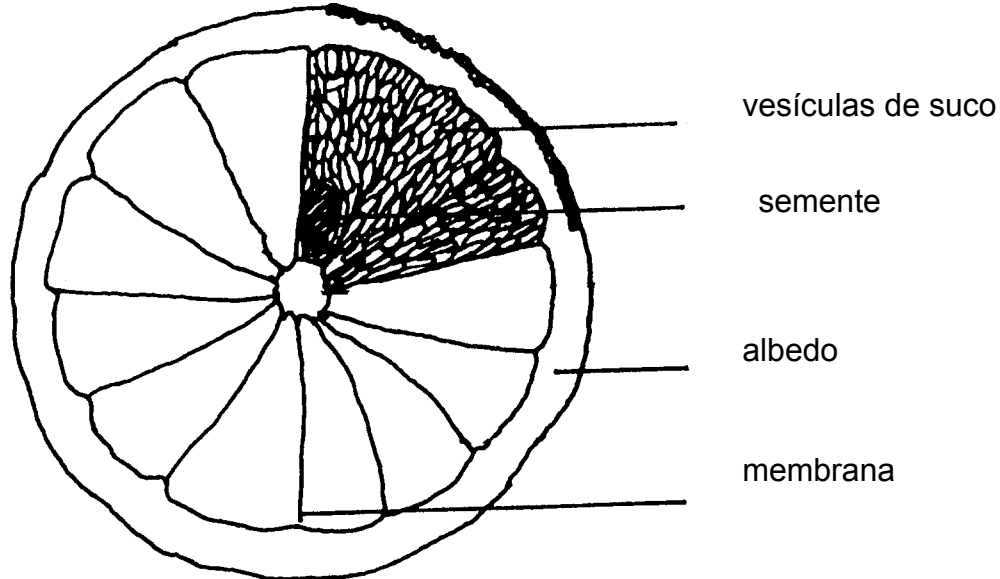


Figura 2. Corte transversal de uma laranja.
Fonte: TING & ROUSEFF (1986).

A pectina ocorre em citros como pectato de cálcio das paredes celulares ou como protopectina. São mais abundantes no albedo, mas também estão bem distribuídas em outras partes do fruto. A enzima pectinesterase ocorre naturalmente em citros, e é encontrada em vesículas do suco (em maiores concentrações) e também no albedo e flavedo. Esta enzima pode causar a clarificação do suco, entretanto, quando o suco é centrifugado, o sobrenadante possui muito pouca atividade enzimática. O ácido cítrico é encontrado principalmente nas vesículas de suco. A quantidade de ácido cítrico varia de acordo com a época de colheita (TING & ROUSEFF, 1986).

1.3. FISILOGIA DA LARANJA

O desenvolvimento fisiológico da laranja consiste na formação, crescimento, maturação e senescência. Estes ocorrem mediante uma série dinâmica de processos fisiológicos e bioquímicos geneticamente programados, culminando com a senescência e morte celulares (CHITARRA & CHITARRA, 2005).

O crescimento do fruto é dividido em três estágios, conforme pode ser observado na Figura 3. Muitos constituintes químicos começam a se acumular durante o

desenvolvimento do fruto. Como a fruta continua a aumentar de tamanho durante o estágio II e parte do estágio III, ocorre geralmente um gradual decréscimo de alguns constituintes, mas isto é devido à diluição resultante do aumento de volume.

Durante a maturação ocorrem mudanças consideradas como fatores de qualidade: gradual aumento no teor de sólidos solúveis, diminuição da acidez titulável e ácido ascórbico. A maturidade fisiológica refere-se ao estágio de desenvolvimento da fruta ou hortaliça, no qual ocorrem o crescimento máximo e a maturação adequada, para que a ontogenia continue após a colheita. Nas frutas, está associado ao completo amadurecimento. O estágio “fisiologicamente maduro” é seguido pela senescência.

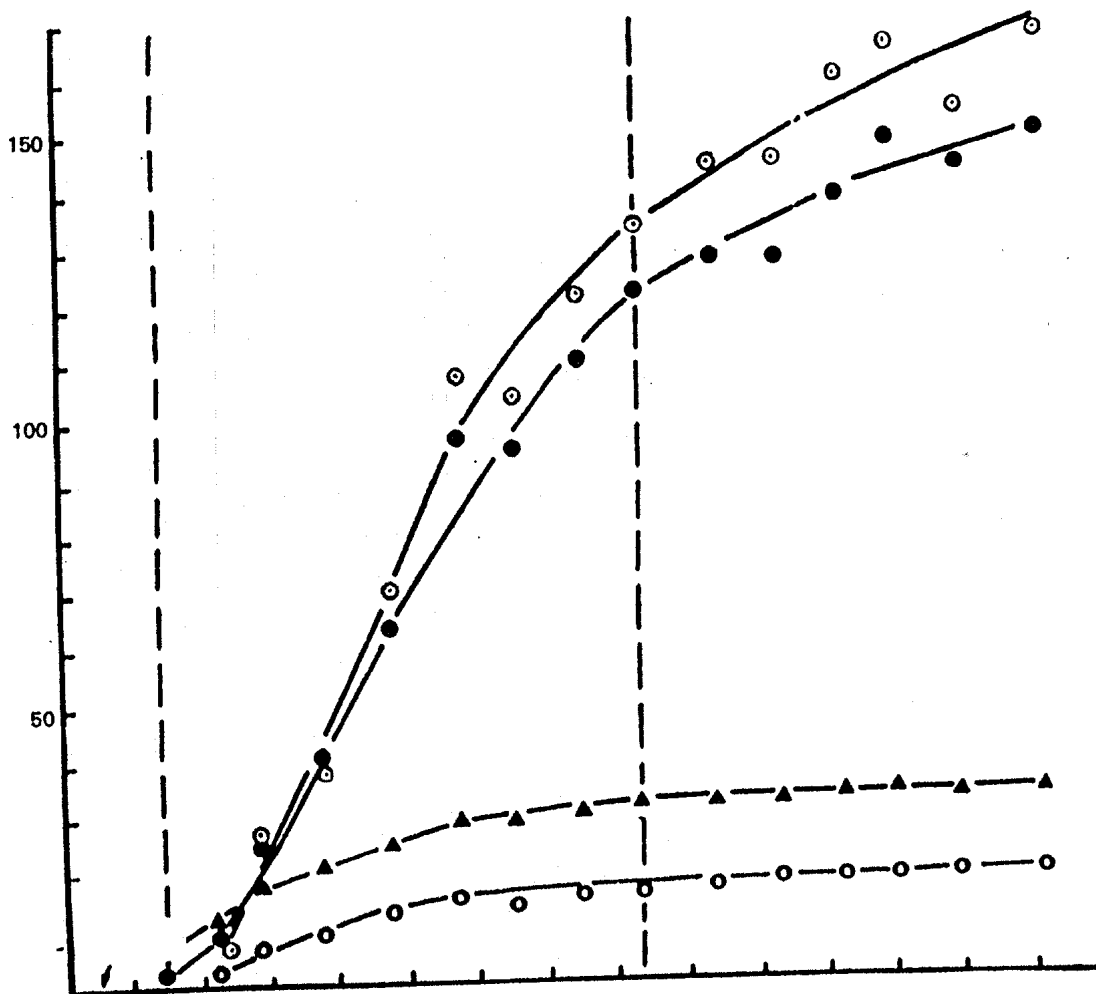


Figura 3. Estádios de desenvolvimento da laranja.

Fonte: TING & ROUSEFF (1986).

A senescência corresponde aos processos que ocorrem após a maturidade fisiológica e que, por serem predominantemente degradativos, resultam na morte dos

tecidos. A fase final da maturação é designada como amadurecimento, sendo, porém, excluída do desenvolvimento, uma vez que nessa etapa há predominância de processos degradativos. No amadurecimento há um aprimoramento das características sensoriais, ou seja, sabores e odores específicos desenvolvem-se em conjunto com o aumento da doçura, com a redução da acidez e da adstringência. O fruto torna-se mais macio e mais colorido, em decorrência da degradação da clorofila e do desenvolvimento acentuado de pigmentos carotenóides (CHITARRA & CHITARRA, 2005).

A atividade metabólica geralmente está associada com a produção de etileno e intensidade da atividade respiratória. A laranja é considerada um fruto não-climatérico, ou seja, só completa o amadurecimento quando permanecem na planta, uma vez que não têm aumento da produção de etileno depois de colhidos.

Dentre os fatores ambientais que exercem influência no crescimento/ desenvolvimento da laranja pode-se citar: temperatura, luz, umidade relativa, vento, altitude, pluviosidade e textura do solo. As frutas usualmente são colhidas na maturidade fisiológica. A época ideal para a colheita corresponde ao espaço de tempo no qual o produto apresenta características de qualidade adequadas para o consumo ou para a comercialização. Os parâmetros de maturidade estabelecidos para laranja são teor de suco, acidez e relação açúcar/ácido (índice de maturidade). Os sólidos solúveis (SS) dão uma idéia do teor de açúcares do produto. A leitura é feita em refratômetro de campo. A acidez total titulável (ATT) é dosada pela titulação com solução de NaOH 0,1 N. A relação SS/ATT dá indicação do sabor do produto (CHITARRA & CHITARRA, 2005).

2. SUCO DE LARANJA

No setor agroindustrial do Brasil, o suco de laranja é o produto de maior destaque. O suco de laranja constitui-se em um dos itens de maior importância na balança de exportação brasileira e tem acrescentado às divisas brasileiras bilhões de dólares, sendo exportado para diferentes países. Iniciada na década de 60, a indústria de suco concentrado de laranja tem tido um contínuo desenvolvimento em termos de volume processado e correspondente exportação. Só na década de 90, as exportações foram em média 916 mil toneladas (TODA FRUTA, 2004).

Em 2004, o Brasil exportou 1,01 milhões de toneladas de suco de laranja congelado, arrecadando 790 milhões de dólares em rendimentos. Cerca de 70% dessas exportações foram para a Europa, e 15% foi enviada aos Estados Unidos (FAO, 2006).

O suco de laranja é um produto complexo (Tabela 1), constituído de uma mistura aquosa de vários componentes orgânicos voláteis e instáveis, responsáveis pelo seu sabor e aroma, além de açúcares, ácidos, sais minerais, vitaminas e pigmentos (CORRÊA NETO & FARIA, 1999). Sob o ponto de vista nutricional, o suco de laranja é considerado excelente fonte de carotenóides e da vitamina C (FRANCO, 1992).

Por definição, o suco de laranja é um líquido límpido ou turvo, extraído do fruto da laranjeira (*Citrus sinensis*), por meio de processo tecnológico adequado, não fermentado, submetido a um tratamento que assegure sua apresentação e comercialização até o momento do consumo. De acordo com os padrões de identidade e qualidade, o suco de laranja deve possuir coloração amarela, sabor e aroma próprios e composição conforme apresentado na Tabela 2 (BRASIL, 1997).

Tabela 1. Composição química aproximada da laranja e do suco de laranja

Constituinte	Quantidade (por 100 g)	
	Fruta	Suco
Calorias (kcal)	42,00	40,00
Proteínas (g)	0,80	0,40
Gorduras (g)	0,20	0,30
Carboidratos (g)	10,50	9,30
Água (g)	11,90	90,00
Cálcio (mg)	34,00	11,00
Fósforo (mg)	20,00	15,00
Ferro (mg)	0,70	0,70
Sódio (mg)	1,00	1,00
Vitamina A (µg)	40,00	40,00
Vitamina B ₁ (mg)	0,09	0,05
Vitamina B ₂ (mg)	0,03	0,02
Niacina (mg)	0,20	0,20
Vitamina C (mg)	59,00	53,00

Fonte: OLIVEIRA et al. (1982).

Tabela 2. Características físico-químicas do suco de laranja

Características	Teor	
	Mínimo	Máximo
Sólidos solúveis a 20 °C (°Brix)	10,5	-
Relação de sólidos solúveis (Brix/acidez, em g/100 g de ácido cítrico anidro)	7,0	-
Açúcares totais, naturais da laranja (g/100 g)	-	13,0
Ácido ascórbico (mg/100 g)	25,0	-
Óleo essencial de laranja %(v/v)	-	0,035

Fonte: BRASIL (1997).

A qualidade do suco de laranja é influenciada por fatores microbiológicos, enzimáticos, químicos e físicos, que comprometem suas características sensoriais (aroma, sabor, cor, consistência, estabilidade da turbidez, separação de fases sólido/líquido) e nutricionais (vitaminas). Em conjunto, esses fatores e as alterações durante o acondicionamento, distribuição e armazenamento irão influenciar a vida-de-prateleira do produto (GRAUMLICH et al., 1986; CORRÊA NETO & FARIA, 1999).

2.1. PROCESSAMENTO DE SUCO DE LARANJA CONCENTRADO

A indústria de suco concentrado tem se esforçado para reduzir o volume de sucos cítricos por eliminação do conteúdo de água sem marcadamente prejudicar a qualidade. Esta redução é importante por duas principais razões. Primeiro, por facilitar o transporte marítimo pela redução no tamanho dos containeres. Em segundo lugar, pode ser vantajoso do ponto de vista de preservação, pois é sabido que alimentos com mais de 65% de açúcares não serão fermentados se mantidos em um container higiênico e fechado (BRAVERMAN, 1949).

O processamento da laranja baseia-se em praticamente quatro variedades: Hamlin como precoce, a Pêra como meia estação, e a Natal e Valência como tardias. Com essas quatro variedades, a indústria processa citros de julho a dezembro de cada ano com maiores índices de sazonalidade, e até fevereiro do ano seguinte com menores índices, sendo março a maio o período de entre safra. Outras variedades de laranja, que também pertencem à espécie *Citrus sinensis* utilizadas, mas em menores proporções são: Cravo, Lima, Rubi e Westin (TODA FRUTA, 2004).

No processamento industrial para a obtenção do suco de laranja concentrado, as frutas sadias que chegam à unidade processadora passam por diversas etapas. Na Figura 4 pode-se observar, resumidamente, a seqüência destas etapas.

As frutas podem ser diretamente descarregadas dentro da unidade para imediato processamento, ou podem ser estocadas de forma a proporcionar uma provisão que capacita abastecer a planta para o processamento ininterruptamente, pois as unidades de processamento geralmente funcionam durante 24 horas por dia, especialmente durante a época de colheita (SOMOGY et al., 1996).

Uma amostra representativa de um lote das frutas que chegam à indústria é coletada ao acaso e analisada em laboratório com a finalidade de estimar o rendimento do suco e a qualidade: % suco, °Brix, acidez total e índice de maturidade (relação Brix/acidez total). Após a análise, se a fruta preencher os requisitos e for considerada de

boa qualidade, é então descarregada e armazenada em silos, sendo ideal que não permaneça por um tempo superior a 36 horas até chegar à linha de produção (TOCCHINI et al., 1995; MADRID et al., 1996; SOMOGYI et al., 1996).

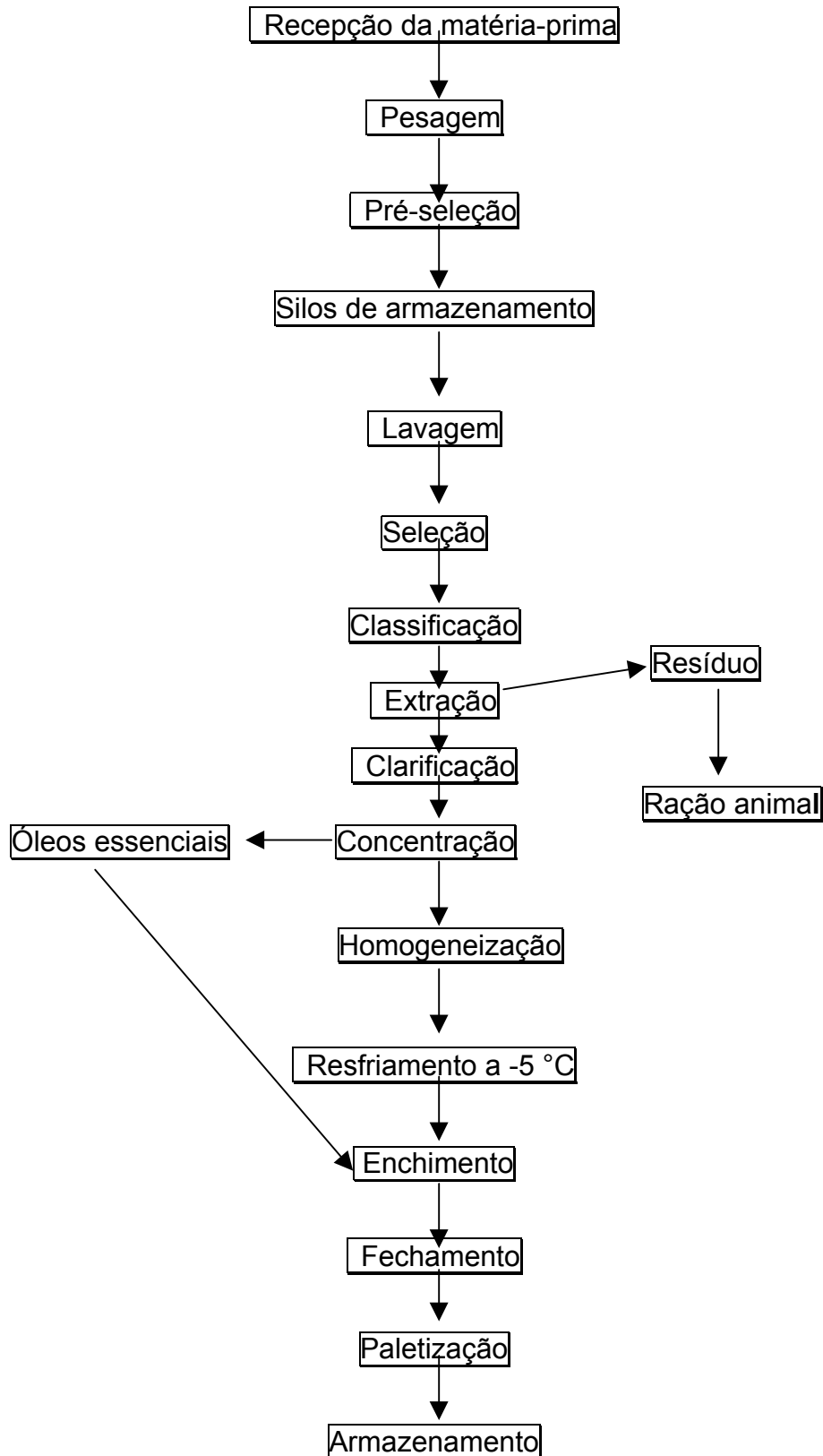


Figura 4. Etapas para a obtenção do suco concentrado de laranja.

Fonte: Adaptada de TOCCHINI et al. (1995).

A lavagem dos frutos na linha de produção remove resíduos de cera e permite que o fruto seja transportado mais eficientemente. As frutas lavadas entram para o processamento limpas e livres de lixos, insetos e níveis excessivos de microrganismos (SOMOGY et al., 1996).

A extração do suco é feita em unidades que funcionam à base de compressão do fruto integral, possibilitando a saída do suco por um cilindro, de forma a impedir a incorporação de material estranho ao suco. Antes da etapa de evaporação, o suco passa por um sistema de centrifugação (clarificação). A clarificação tem por finalidade estabelecer o teor final de polpa no suco por meio do processo de centrifugação. A concentração do suco é feita em evaporadores a vácuo. Nestes equipamentos, o suco é submetido inicialmente a um aquecimento à temperatura de 90 a 95 °C durante 30 a 40 segundos. A evaporação proporciona várias vantagens, dentre elas: reduz o espaço de estocagem, pasteuriza o suco, desnatura enzimas pectinases (encontradas naturalmente no suco) que afetam a turbidez, previne a deterioração por aumentar a viscosidade prolongando a vida de prateleira, e, finalmente, por questões de custo de transporte.

O equipamento utilizado para concentração do suco funciona em até oito estágios. A temperatura de evaporação do suco varia de 85 °C no primeiro estágio até 40 °C no último. Durante a concentração do suco, parte dos componentes aromáticos é carregada pela água evaporada, visto que são substâncias químicas de baixo ponto de ebulição, como ésteres, éteres, etc. Assim, a unidade evaporadora deverá vir acompanhada de uma outra unidade para a recuperação dos aromas.

O aroma recuperado pode ser readicionado ao suco posteriormente. Durante a concentração, o suco passa de aproximadamente 11 para 65 °Brix. As determinações da concentração são efetuadas por meio de leitura do °Brix em refratômetro. Assim, controla-se o fluxo do suco em função do °Brix final desejado. Normalmente, para os mercados de exportação e interno, a preferência é sucos com 65 °Brix, visto que o custo do armazenamento e de transporte é bem menor, como também é mais fácil a sua conservação (TOCCHINI et al., 1995; MADRID et al., 1996).

Após a concentração, o suco é conduzido para tanques de homogeneização e resfriamento, onde é resfriado até -5 °C. O enchimento é feito por um sistema automático de enchedeiras no qual o suco é acondicionado em tambores que são imediatamente fechados. O armazenamento é feito em câmaras à temperatura de -25 °C (TOCCHINI et al., 1995).

O suco deve preferencialmente ser transportado em ambiente refrigerado para preservar a qualidade e o conteúdo de vitamina C. No suco concentrado, mesmo quando

armazenado em baixas temperaturas, a manutenção de sua qualidade não é totalmente satisfatória, pois algumas mudanças enzimáticas ainda podem ocorrer, se os produtos são mantidos por vários meses (BRAVERMAN, 1949).

Apesar do suco de laranja concentrado congelado ser o principal produto da laranja, as indústrias produzem vários outros subprodutos: óleos essenciais, limoneno, terpenos e farelo de polpa cítrica. Esses subprodutos possuem diferentes aplicações no mercado interno e externo, que incluem alimentação animal, fabricação de produtos químicos e solventes, aplicação em indústrias de tintas, cosméticos, entre outras (ABECITRUS, 2001).

2.2. COMPOSIÇÃO DO SUCO DE LARANJA

Os principais componentes do suco natural de laranja são os carboidratos, que constituem mais de 70% dos sólidos solúveis. O segundo, em participação são os ácidos orgânicos, principalmente o cítrico e o málico, que representam até 10% dos sólidos solúveis. O restante é composto de aminoácidos livres, bases nitrogenadas (6%), íons inorgânicos (aproximadamente 3%), vitaminas (2,5%), lipídios (1,2%), flavonóides (1,2%) e outros. Aproximadamente 70% dos compostos nitrogenados são aminoácidos livres e o restante do nitrogênio encontra-se na forma de proteínas, enzimas, aminas, nucleotídeos, ácidos nucléicos, fosfolipídios e vitaminas (TING, 1967; VANDERCOOK, 1977).

Dentre os aminoácidos presentes no suco de laranja encontram-se em maior quantidade: prolina, ácido γ -aminobutírico, arginina, asparagina, ácido aspártico e serina, conforme pode ser observado na Tabela 3. A prolina é aminoácido predominante no suco de laranja madura, representando em torno de 50% do total de aminoácidos livres (TADEO et al., 1988).

3. REFRIGERANTE

O Brasil é o país com a terceira maior indústria de refrigerantes do mundo depois dos Estados Unidos e do México. Apresenta extraordinário potencial de crescimento e reúne todas as condições para atrair mais e mais investimentos, internos e externos, destinados a desenvolver e consolidar o setor. Apesar da imensidão do mercado, o consumo anual *per capita* de refrigerantes no país não ultrapassa 65 litros, volume muito

inferior ao registrado, por exemplo, nos Estados Unidos, cuja indústria mantém a marca dos 180 litros/habitante/ano. Com mais de 800 fábricas espalhadas pelo país, a indústria de refrigerantes obteve um volume de vendas em 2004, de cerca de 12 bilhões de litros (ABIR, 2006).

Tabela 3. Aminoácidos presentes no suco de laranja

Aminoácido	Teor médio (percentual molar)
Ácido aspártico	6,50
Ácido glutâmico	2,10
Ácido γ -aminobutírico	17,00
Alanina	3,20
Arginina	10,40
Asparagina	6,90
Fenilalanina	0,71
Glutamina	0,50
Histidina	0,22
Isoleucina	0,18
Leucina	0,24
Lisina	1,20
Metionina	0,12
Prolina	44,00
Serina	4,90
Tirosina	0,33
Valina	0,50

Fonte: VANDERCOOK & PRICE (1972).

De acordo com a legislação brasileira, refrigerante de suco de frutas é a bebida gaseificada, obtida pela dissolução, em água potável, de suco de fruta de sua origem, edulcorantes, agentes aromáticos naturais e aditivos diversos, devidamente autorizados. Os aromas serão sempre naturais, e poderão conter corantes naturais e/ou artificiais, conservantes, emulsificantes e estabilizantes autorizados (BRASIL, 1997).

Os refrigerantes que apresentarem características sensoriais próprias de frutas deverão conter, obrigatoriamente, sucos natural, concentrado ou liofilizado, da respectiva fruta, na quantidade mínima estipulada prevista por decreto. No caso do refrigerante de laranja, este deverá apresentar um mínimo de 10 % em volume de suco natural com um mínimo de 10,5 °Brix ou equivalente em concentrado ou liofilizado de laranja (BRASIL, 1997).

As bebidas refrigerantes devem satisfazer as seguintes condições gerais: ser elaboradas exclusivamente com os produtos autorizados para cada tipo de bebida; ter aspecto normal, cor, aroma e sabor característicos; e ter isenção de impurezas e microrganismos, em qualquer de suas formas. Em linhas gerais, na industrialização de

refrigerantes tem-se como principais componentes: água, xarope de açúcar/adoçantes, acidulantes, estabilizantes, conservantes, corantes, aromatizantes e anidrido carbônico (TOCCHINI & NISIDA, 1995; MADRID et al., 1996; VARNAM & SUTHERLAND, 1997).

A água é o componente majoritário, em torno de 90% do total. A qualidade da água empregada na elaboração tem repercussão direta sobre a qualidade do produto final (VARNAM & SUTHERLAND, 1997). Por ser o produto principal em volume e veículo para os demais componentes, deve apresentar como características: ser incolor e livre de sabor estranho, de microrganismos contaminantes, de íons ferro e de matéria orgânica, além de apresentar baixa alcalinidade (TOCCHINI & NISIDA, 1995).

O principal adoçante utilizado em refrigerantes é o açúcar (sacarose), podendo, algumas vezes, utilizar-se adoçantes artificiais (sacarina, aspartame, dentre outros). Os açúcares utilizados além da sacarose são: xaropes de glicose, frutose, açúcares invertidos, açúcar líquido, etc. O açúcar é um importante componente do refrigerante, sendo responsável pelo sabor e corpo do produto, além de contribuir com o aroma. O açúcar é adicionado à base de 8 a 14% do produto final formado, junto com a água. Os demais componentes são adicionados em quantidades inferiores a 1% (TOCCHINI & NISIDA, 1995).

A adição de ácidos ao produto, além de colaborar com o sabor e aroma, propicia a sua conservação, devido à redução do pH abaixo de 4,0, combinado com pasteurização ou adição de conservantes químicos. Os ácidos possuem importância considerável para determinar a qualidade sensorial dos refrigerantes, pois se deve cuidar para que a formulação tenha um adequado balanço de açúcares-ácidos. Em refrigerantes de frutas, o ácido cítrico é o mais utilizado (TOCCHINI & NISIDA, 1995; VARNAM & SUTHERLAND, 1997).

A coloração tem um efeito direto sobre as propriedades sensoriais do refrigerante e é feita como complementação à cor. Os corantes devem apresentar boas características na presença de luz, ácidos, compostos aromáticos e conservantes. Desta forma, os corantes artificiais são os mais empregados devido à estabilidade no produto final e alta capacidade cromática, e por isso são utilizados em baixas concentrações (20-70 mg/L) (VARNAM & SUTHERLAND, 1997).

Os refrigerantes apresentam baixa susceptibilidade ao crescimento de microrganismos, mas apesar disto, requerem o uso de conservantes para prevenir a aparição de alterações em períodos prolongados de armazenamento à temperatura ambiente. Nos refrigerantes são utilizados quatro tipos de conservantes: sulfito, ácido

benzóico e benzoatos, ésteres p-hidroxibenzóico (parabens) e ácido sórbico e sorbatos, sendo que os benzoatos são os mais utilizados.

A carbonatação consiste na saturação do líquido com CO₂ gasoso. O controle da carbonatação e das propriedades do xarope e da água possuem uma importância crítica. O nível ótimo de carbonatação varia de acordo com o aroma, sabor e com as características das bebidas distintas. Em termos gerais os refrigerantes de frutas são carbonatados a um nível baixo. O uso de garrafas de plástico grandes (2-3 L) requer um nível de carbonatação ligeiramente mais elevado que as de vidro, necessário para compensar as perdas de CO₂ por meio das paredes durante o armazenamento (VARNAM & SUTHERLAND, 1997).

Durante o processamento, o xarope de açúcar e os outros ingredientes são misturados em tanques de aço inoxidável dotados de agitadores desde a parte superior. Em seguida são engarrafados, carbonatados e armazenados em temperatura ambiente até a distribuição.

Refrigerante de laranja

O sabor laranja é bastante apreciado em refrigerantes no Brasil. Em 2004 foi responsável por 11% do total das vendas do setor, ocupando o terceiro lugar, depois dos sabores cola (44%) e guaraná (23%) (ABIR, 2006).

Os principais componentes do refrigerante de laranja são xaropes de açúcar, água, suco de laranja concentrado, acidulante, aromatizante, corante e gás carbônico. A adição de corantes se faz como complementação à cor decorrente da adição do suco da fruta adicionado. O corante utilizado é o artificial amarelo crepúsculo (BRAVERMAN, 1949; TOCCHINI & NISIDA, 1995).

A concentração de açúcar adicionado é de cerca de 13 a 14 % e o pH da bebida é de 3,5. O ácido mais comumente usado é o cítrico (0,08 %). Este é adicionado por ser característico de frutas cítricas, como é o caso da laranja, e por combinar-se melhor com os aromas e sabores dos refrigerantes produzidos. O aroma é fornecido pela adição do suco de laranja, juntamente com as essências naturais ou artificiais que imitam o sabor de laranja (TOCCHINI & NISIDA, 1995).

De acordo com a legislação, o refrigerante de laranja deve possuir um mínimo de 10% de suco natural com 10,5 °Brix, e acidez titulável de, no mínimo, 0,1 g/100 mL em ácido cítrico anidro (BRASIL, 1997). Em 2005, foi feita uma revisão nos métodos de análise de bebidas não alcoólicas e foi proposto um método por espectrofotometria para a

determinação do teor de prolina (BRASIL, 2005). Entretanto não foi estabelecida a faixa (limites) em que esta substância deve ser encontrada em produtos de laranja.

4. AUTENTICIDADE DO SUCO DE LARANJA

A adulteração de sucos de frutas e de bebidas à base de frutas (refrigerantes, refrescos e similares) tem sido uma preocupação para processadores e agências governamentais do mundo inteiro (WIDMER et al., 1992).

Das numerosas tentativas em estabelecer um método para o controle de adulteração, muitas envolveram os aminoácidos de alguma forma. Estes têm várias vantagens sobre outros constituintes tais como açúcares, ácidos ou minerais, pois não podem ser adicionados facilmente ou economicamente para compensar a diluição de produtos. A adição de misturas de aminoácidos com a finalidade de mascarar a diluição do produto não é prática, pois o custo dos aminoácidos sozinhos poderá exceder o preço do suco autêntico (VANDERCOOK & PRICE, 1972).

O efeito da maturação nos teores de aminoácidos foi investigado por vários pesquisadores. ROCKLAND (1961) reportou mudanças em vários aminoácidos em laranjas da variedade Califórnia de março a julho, mostrando um aumento nos teores de ácido aspártico, ácido glutâmico, serina, ácido γ -aminobutírico e arginina. A alanina permaneceu relativamente constante, enquanto a prolina aumentou até maio e então diminuiu.

TING & DEZYCK (1960) investigaram a variação do conteúdo de prolina do suco de laranja em diferentes épocas do ano (meia estação e tardia). Observaram que o teor de prolina variou em função da época do ano e, assim como o total de aminoácidos, correlacionaram positivamente com o conteúdo de cinzas. Estes pesquisadores avaliaram também os teores de prolina nos sucos resfriado e concentrado de laranja, encontrando um teor médio de 4,89 $\mu\text{mol/L}$ para ambos os sucos.

A concentração de serina foi proposta por MORGAN (1966) como possível índice do conteúdo do suco de laranja, porém, devido à complexidade do método de análise, não foi utilizado (VANDERCOOK, 1977).

Arginina e ácido γ -aminobutírico também foram pesquisados por VANDERCOOK & PRICE (1974) e por VANDERCOOK et al. (1975), que sugeriram que os teores destes, junto com a relação Brix/acidez e/ou outros constituintes poderiam ajudar na detecção de adulterações de suco de laranja. Os teores destes aminoácidos foram estudados por

VANDERCOOK & PRICE (1974) em sucos de laranja durante duas épocas do ano, porém os autores concluíram que os dados somente seriam significativos estatisticamente se fosse utilizada mais uma safra de produção. VANDERCOOK et al. (1975) desenvolveram um sistema analítico automático para determinar açúcares totais, açúcares redutores, acidez total, aminoácidos totais e compostos fenólicos em sucos de laranja. Sugeriram que os dados deste trabalho abririam campo para o desenvolvimento de equações para a determinação do conteúdo de suco e da autenticidade, entretanto o estudo não foi levado à frente.

Além da época do ano, de acordo com VANDERCOOK (1977), outros fatores exercem influência sobre os teores de aminoácidos, como região de produção, práticas culturais, e principalmente fatores climáticos.

O processamento também pode afetar os teores de compostos nitrogenados de sucos cítricos. ISMAIL & WOLFORD (1967) determinaram os teores de nitrogênio total, solúvel e insolúvel, bem como os aminoácidos totais do suco de laranja fresco e do suco reconstituído a partir do suco concentrado a 65 °Brix. Encontraram maiores teores de nitrogênio solúvel no suco reconstituído, porém quanto aos aminoácidos livres, maiores teores foram observados no suco fresco. Os autores associaram o aumento dos teores de nitrogênio solúvel no suco reconstituído à destruição da fração de nitrogênio insolúvel (como por exemplo, as proteínas) que podem sofrer degradação durante o aquecimento. Quanto aos teores de aminoácidos totais, a explicação reportada foi o fato de haver possibilidade de ocorrerem reações de escurecimento não enzimático durante o processamento.

O teor de prolina livre é usado na Europa para detectar diluições excessivas do suco de laranja, e também, detectar a adição de suco de tangerina (*Citrus reticulata* sp.) ao suco de laranja, através do decréscimo no valor de prolina e aumento no teor de éster de criptoxantina (corante abundante na tangerina) (KUNEMAN et al., 1988).

LEWIS (1966) propôs o uso de betaína como um indicador do conteúdo de suco em bebidas de laranja. Determinou o valor médio de betaína como sendo 72,4 mg/100 mL no suco de laranja (11 % de sólidos), com um desvio padrão de 4,5 e um coeficiente de variação de 6,2 %. Um estudo colaborativo foi realizado por ROGERS (1970) para avaliar o procedimento para a *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC) e o método foi adotado como oficial por este órgão. A metodologia adotada como oficial pelo Instituto Adolfo Lutz para bebidas baseadas em suco de frutas é a análise do teor de betaína (IAL, 1985). Porém, esta técnica possui um limite de detecção muito alto e não é sensível o suficiente para refrigerantes de laranja.

No Brasil, o órgão fiscalizador faz o controle da adulteração de refrigerantes por meio de um procedimento denominado Fiscalização Quantitativa. Este tem como objetivo verificar a equivalência quantitativa entre produto elaborado e ingrediente utilizado, observando se esta equivalência se encontra em conformidade com o padrão de identidade e qualidade (PIQ) e/ou composição registrada, dentro de um ciclo de produção definido. Este controle se dá por meio de notas fiscais de compra de matérias-primas, venda de produto acabado e mapas diários de produção. Mas isto não garante um controle efetivo.

As aminas bioativas também já foram sugeridas como índice da autenticidade de suco de laranja, especialmente a sinefrina, por ser característica de frutas cítricas e encontrada em maiores concentrações em laranjas (STEWART & WHEATON, 1964).

Recentemente, foi proposto pelo Ministério da Agricultura o uso de prolina como um dos critérios de qualidade de bebidas, a partir da publicação da Instrução Normativa nº 24 de 8 de setembro de 2005 que revoga a Portaria nº 276 de 27/11/1986, que até então regulamentava os métodos oficiais de análises de bebidas (BRASIL, 2005). Entretanto, estudos são inexistentes com relação aos níveis deste aminoácido em sucos produzidos com as variedades brasileiras de laranja.

O uso de aminas bioativas como critério de qualidade já foi proposto para vários alimentos, dentre eles peixe, queijo ralado, salame (MIETZ & KARMAS, 1979; CUSTÓDIO et al., 2006; CACCIOPPOLI et al, *in press*). No caso de produtos de laranja, a utilização de sinefrina como índice de adulteração também seria viável, uma vez que esta amina é característica de algumas frutas cítricas e é encontrada na laranja em quantidades apreciáveis.

5. AMINAS BIOATIVAS

Aminas bioativas são compostos nitrogenados, de baixo peso molecular nos quais um, dois ou três átomos de hidrogênio da amônia são substituídos por grupos alquila ou arila. As aminas são formadas durante processos metabólicos normais em todos os organismos vivos e, portanto, estão presentes nos alimentos (BARDÓCZ, 1995). São sintetizadas principalmente pela descarboxilação de aminoácidos ou por aminação e transaminação de aldeídos e cetonas (SMITH, 1980-81; BRINK et al., 1990; HALÁSZ et al., 1994; GLÓRIA, 2005).

As aminas bioativas podem ser classificadas em função do número de grupamentos amina, da estrutura química e da via biossintética. Quanto ao número de

grupamentos amina na molécula, se classificam em monoaminas (tiramina e feniletilamina), diaminas (histamina, triptamina, serotonina, putrescina e cadaverina) e poliaminas (espermina, espermidina e agmatina). Quanto à estrutura química, as aminas podem ser classificadas em alifáticas (putrescina, cadaverina, espermina, espermidina e agmatina), aromáticas (tiramina, feniletilamina, sinefrina) e heterocíclicas (histamina, triptamina). Ainda com relação à estrutura química, podem ser classificadas em função do grupo químico em catecolaminas (dopamina, noradrenalina, adrenalina), indolaminas (serotonina) e imidazolaminas (histamina). Quanto à via biossintética, as aminas se classificam em biogênicas e naturais. As biogênicas são formadas pela descarboxilação de aminoácidos por enzimas microbianas. Fazem parte deste grupo histamina, serotonina, tiramina, feniletilamina, triptamina, putrescina, cadaverina e agmatina. As aminas naturais putrescina, agmatina, espermina e espermidina são formadas *in situ* nas células à medida que são requeridas e a histamina está armazenada nos mastócitos e basófilos. Interessante observar que a histamina poderia se encaixar nestes dois grupos (GLÓRIA, 2005).

Sabe-se que a putrescina é precursora das poliaminas espermina e espermidina, sendo encontrada em menores concentrações nas células. A espermina e espermidina são amplamente distribuídas na natureza, estão presentes em elevadas concentrações nas células e têm seu conteúdo aumentado em tecidos com altas taxas de crescimento. São essenciais ao crescimento, renovação e metabolismo sendo, portanto, indispensáveis às células vivas. Apresentam diversas funções nas células, dentre elas, aumento da síntese do RNA, DNA e de proteínas, estabilização do RNA transportador e redução da taxa de degradação do RNA. São ainda importantes na estabilização das membranas (SMITH, 1980-81; BARDÓCZ, 1995; GLÓRIA, 2005).

Nos vegetais, além destas funções, as poliaminas participam da floração e desenvolvimento do fruto e da resposta ao estresse, além de inibir a produção de etileno e a senescência. A espermina, espermidina, putrescina e cadaverina são eficientes sequestrantes de radicais livres, podendo inibir a peroxidação lipídica e retardar a senescência. Algumas aminas são também importantes na síntese de metabólitos secundários de interesse biológico como nicotina e alcalóides (GLÓRIA, 2005).

As aminas podem ser psicoativas ou vasoativas. As psicoativas, como serotonina, dopamina, adrenalina e noradrenalina, atuam como neurotransmissoras no sistema nervoso central. As vasoativas atuam direta ou indiretamente no sistema vascular, podendo ser vasoconstritoras (pressoras) ou vasodilatadoras (CHIN & KOELER, 1983). Tiramina, feniletilamina, isoamilamina, dopamina, adrenalina, noradrenalina e triptamina

causam um aumento na pressão sanguínea por constrição do sistema vascular e aumento da velocidade e da força da contração cardíaca. A serotonina é vasoconstritora, broncoconstritora, reduz o volume e a acidez do suco gástrico. A histamina causa vasodilatação, reduz a pressão sanguínea, aumenta a contração e velocidade do batimento cardíaco, atua na contração e relaxamento do músculo liso, na regulação da secreção gástrica e como estimulante dos neurônios dos sistemas motor e sensorial (GLÓRIA, 2005). A sinefrina é uma substância simpatomimética que exibe várias atividades farmacológicas tais como vasoconstrição, elevação da pressão sanguínea e relaxamento do músculo bronquial. É encontrada em plantas cítricas e na urina humana depois da ingestão de suco de laranja (KUSU et al., 1996).

O acúmulo de putrescina ocorre em resposta a vários estresses no vegetal, como: acidez, salinidade, osmose e deficiência mineral. Também ocorre acúmulo em decorrência dos danos causados pelo frio, conforme observado em frutos cítricos. A deficiência de minerais tem influência na biossíntese das aminas bioativas e os seus teores no vegetal podem ser indicativos do estresse. Já foi demonstrado que a agmatina e a putrescina acumulam-se em vegetais com deficiência de potássio e magnésio.

A principal via de biossíntese das poliaminas é a descarboxilação de aminoácidos por ação enzimática tendo como precursores básicos a ornitina e a arginina. A via metabólica das poliaminas (Figura 5) inicia-se com a transformação da ornitina em putrescina, pela ação da ornitina descarboxilase (ODC), etapa limitante da taxa de biossíntese.

A putrescina também é sintetizada a partir da arginina pela arginina descarboxilase (ADC), com agmatina e N-carbamoylputrescina como compostos intermediários. A transformação de putrescina em espermidina ocorre pela adição de um grupo aminopropila, derivado da metionina, formado pela mesma etapa inicial da via metabólica do etileno, ou seja, a metionina é transformada em S-adenosilmetionina (AdoMet ou SAM). Pela ação da SAM descarboxilase, é formada a SAM descarboxilada que é, então, usada como doadora de aminopropila para a formação de espermidina catalisada pela espermidina sintase. De modo semelhante, ocorre a formação da espermina pela ação da espermina sintase, a partir da espermidina e do SAM como doador de grupo aminopropila. A liberação do grupo aminopropila do SAM resulta na 5'-metiltioadenosina (MTA), a qual é convertida a metiltioribose (MTR) e essa em metionina, reciclando o grupo tiometila (-S.CH₃).

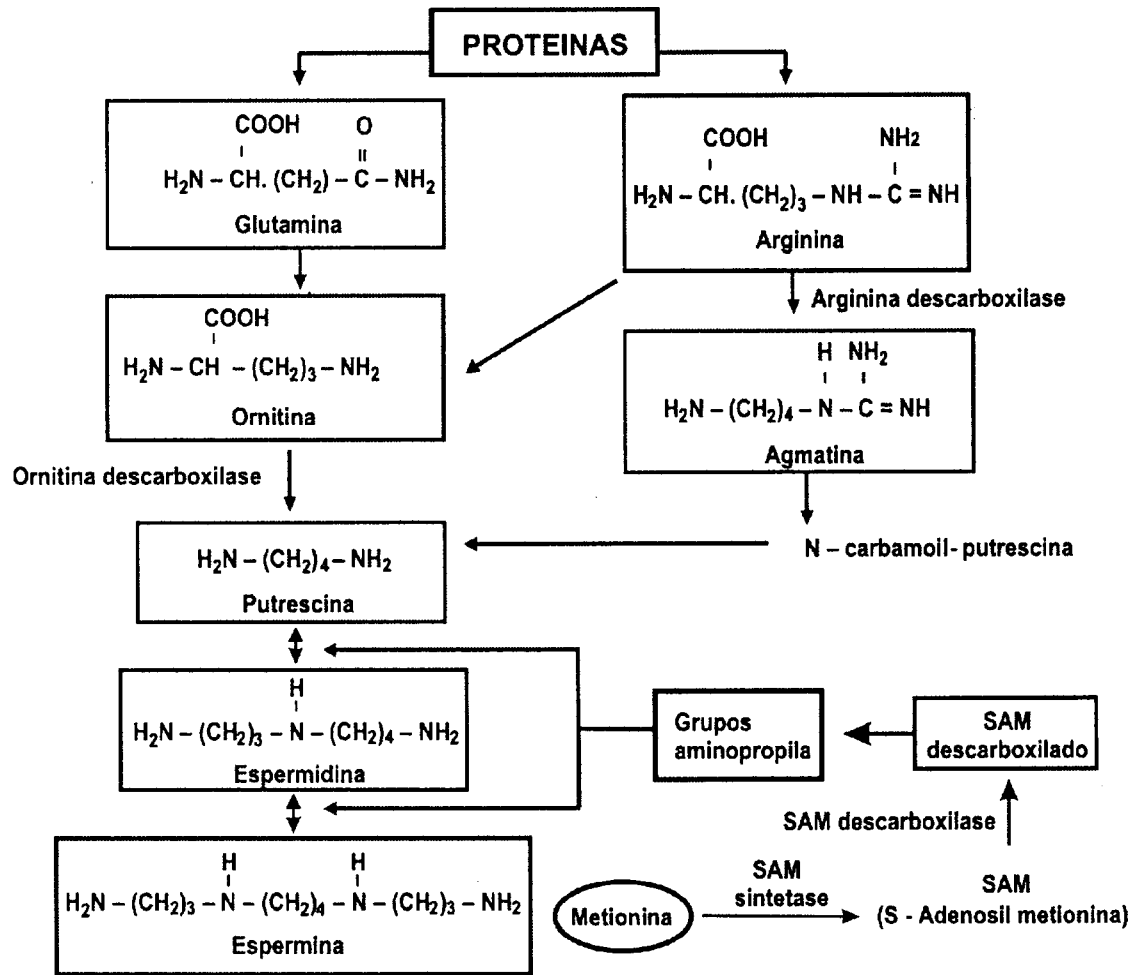


Figura 5. Biossíntese de aminas bioativas em vegetais.
Fonte: CHITARRA & CHITARRA (2005).

A quantidade e o tipo de aminas nos alimentos em geral, dependem da natureza, origem, etapas de processamento e microrganismos presentes (GLÓRIA, 2005). Em geral, as frutas são ricas em putrescina e espermidina, contendo pouca ou até mesmo nenhuma espermina. Os maiores teores de espermina são encontrados em produtos cárneos (BARDÓCZ, 1995).

Os perfis e teores de aminas naturalmente presentes em frutas e hortaliças variam dependendo da espécie vegetal e do tipo de tecido, do grau de maturação e/ ou de desenvolvimento. Entretanto, poucos estudos estão descritos na literatura quanto aos tipos e teores de aminas bioativas em frutas (CHITARRA & CHITARRA, 2005; GLÓRIA, 2005). Em frutas cítricas, aminas como tiramina, metil-tiramina, octopamina e sinefrina foram detectadas (WHEATON & STEWART, 1969).

A concentração de aminas nos tecidos vegetais varia com o grau de maturação, luz e temperatura. A maior concentração ocorre nos primeiros estádios de desenvolvimento

dos frutos (tecidos do mesocarpo), declinando em cerca de 30% até o completo amadurecimento. No entanto, os dados publicados sobre a sua concentração no mesmo tipo de fruto são variados, possivelmente em decorrência do grau de maturação à época da análise. Esses compostos parecem apresentar especificidade em relação às espécies vegetais, pois compostos diferentes foram identificados em espécies diversas, conforme ilustrado na Tabela 4.

Tabela 4. Tipos de aminas bioativas detectadas em frutas e hortaliças

Produtos	Aminas em Frutas e hortaliças
Abacate	Serotonina, tiramina e dopamina
Abacaxi	Serotonina, tiramina
Ameixa	Serotonina, triptamina, tiramina e noradrenalina
Banana	Espermidina, putrescina, serotonina, tiramina, histamina, feniletilamina, dopamina e noradrenalina
Framboesa	Tiramina
Laranja	Sinefrina, feroluilputrescina, octopamina, N-metiltiramina
Limão	Tiramina, sinefrina, octopamina
Maçã	N-metiletilamina, hexilamina, butilamina, etilamina, espermina, espermidina
Repolho	Tiramina, histamina
Tomate	Tiramina, histamina, serotonina e triptamina
Berinjela	Tiramina, histamina, serotonina e triptamina
Espinafre	Tiramina, histamina e dopamina
Batata	Tiramina e dopamina

Fonte: WHEATON & STEWART (1969); BELITZ & GROSH (1997); STARLING (1998); ADÃO & GLÓRIA (2005).

Segundo HALÁSZ et al. (1994) e SHALABY (1996), os fatores que governam a produção de aminas biogênicas incluem a disponibilidade de aminoácidos livres, a presença de microrganismos capazes de descarboxilar os aminoácidos e condições favoráveis para o crescimento de microrganismos e para a produção de enzimas descarboxilase.

As pesquisas sobre aminas bioativas têm evoluído em diferentes setores, notadamente pelos experimentos nos quais se utilizam biologia molecular e engenharia genética. Muitos genes que codificam as enzimas da biossíntese de poliaminas já foram clonados. Os efeitos da modificação no nível celular de poliaminas sobre o processo de

desenvolvimento da planta e das condições de estresse têm sido estudados com materiais transgênicos. Diferentes materiais genéticos têm sido desenvolvidos para caracterizar vários mutantes que apresentam modificação no metabolismo das poliaminas e desenvolvem fenótipos anormais.

5.1. AMINAS EM LARANJA E DERIVADOS

Um dos primeiros relatos sobre aminas bioativas em suco de laranja foi feito por HERBST & SNELL (1949) que identificaram a putrescina como sendo um fator de crescimento para *Hemophilus parainfluenzae* 7901. Mais tarde, UDENFRIEND et al. (1959) detectaram em laranjas a presença de tiramina em nível de 10 mg/Kg de fruta e triptamina em 0,1 mg/Kg. Entretanto, STEWART & WHEATON (1964) sugeriram que havia sinefrina ao invés de tiramina, justificando que o método utilizado por UDENFRIEND et al. (1959) provavelmente não distinguiu entre tiramina e sinefrina e esta foi erroneamente relatada como tiramina.

A sinefrina foi detectada por dois grupos de trabalhos independentes. PISANO et al. (1961) identificaram a sinefrina em urina humana. GJESSING & ARMSTRONG (1963) associaram a sinefrina na urina de pacientes ao consumo de grandes quantidades de laranja. O mesmo composto foi detectado por STEWART et al. (1964) durante um estudo da relação entre deficiências de elementos traços e aminoácidos livres em citros. Estes autores detectaram, em extratos de folhas de tangerina, um composto nitrogenado desconhecido que existia em quantidades maiores do que alguns outros compostos nitrogenados e que não estava presente em amostras de folhas de árvores com deficiência de manganês.

Enquanto faziam estudos de identificação de sinefrina, STEWART & WHEATON (1964) identificaram a tiramina e descobriram a octopamina em extratos de suco e folhas do limão Meyer (*Citrus ssp*). Em citros, foram encontradas octopamina, sinefrina, tiramina, N-metiltiramina, hordenina e feruloilputrescina (WHEATON & STEWART, 1969). A sinefrina foi encontrada em teores de 15 a 27 mg/L na laranja, 125 mg/L na tangerina, 2 mg/L no limão e 280 mg/L em mandarim, sendo esta amina considerada como típica desta espécie botânica. COFFIN (1969), pesquisando aminas fenólicas em suco de laranja, encontrou em todas as amostras analisadas teores de sinefrina entre 12,5 mg/L a 23,4 mg/L de suco. O conteúdo de algumas aminas em alguns sucos cítricos está listado na Tabela 5. Na Figura 6 estão apresentadas as estruturas de algumas aminas naturalmente presentes no suco de laranja.

Tabela 5. Teores de aminas fenólicas em sucos de frutas cítricas

Fruta	Teor de aminas (mg/L)					
	Octopamina	Sinefrina	Tiramina	N-metil-tiramina	Hordenina	Feruloil-putrescina
Laranja						
Hamlin	---	22	---	2	---	5
Navel	---	15	---	1	---	4
Pineapple	---	27	---	2	---	4
Valência	---	19	---	1	---	4
Pomelo						
Duncan	---	---	---	---	---	19
Marsh	---	---	---	---	---	41
Ruby red	---	---	---	---	---	25
Tangerina						
Dancy	1	125	1	15	---	---
Limão						
Bear (comum)	---	---	---	---	---	---
Meyer	4	2	25	1	---	---
Lima						
Key	---	---	---	---	---	---
Pérsia	---	---	---	---	---	---
Mandarim						
Cleópatra	2	280	traço	58	7	---

Fonte: WHEATON & STEWART (1965).

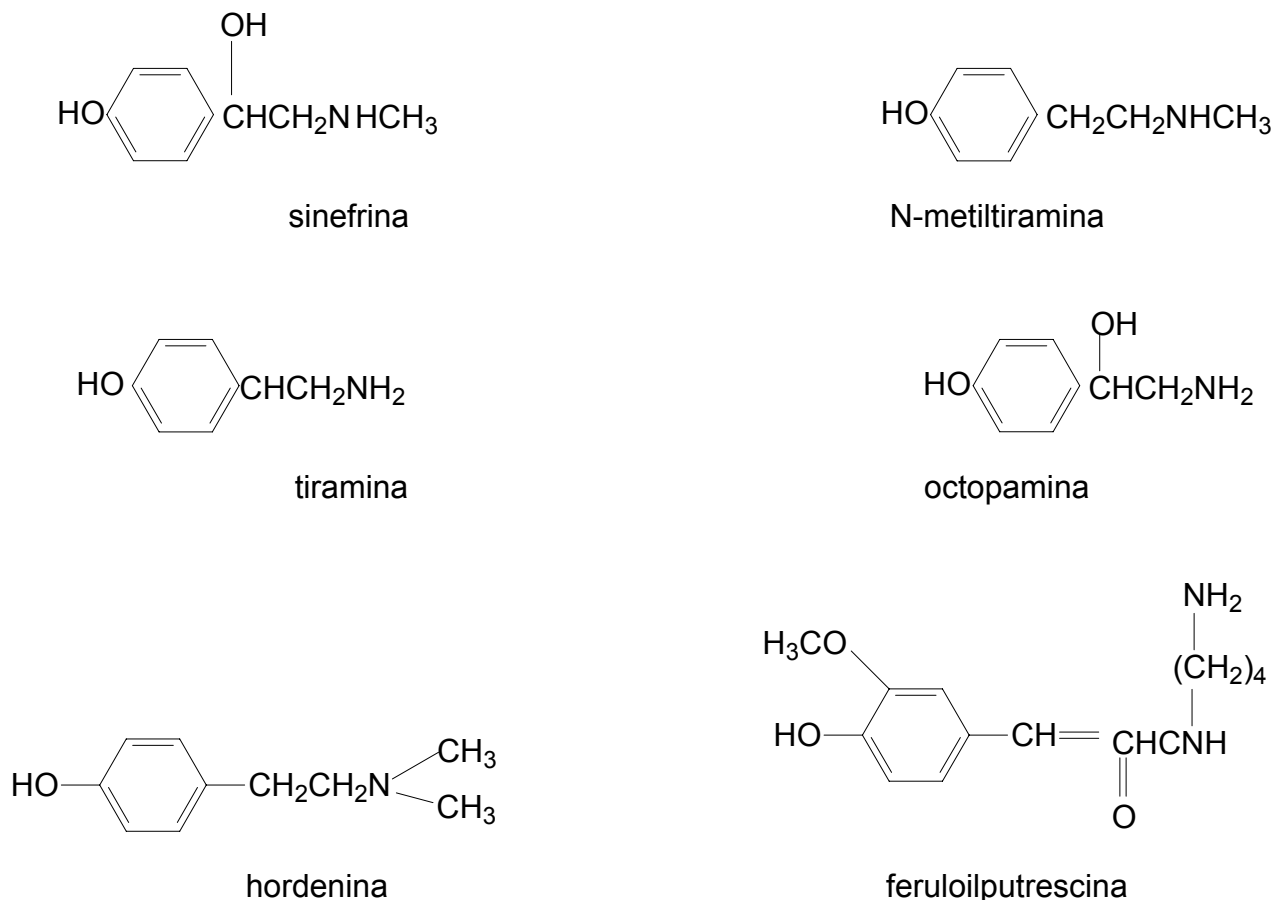


Figura 6. Estrutura química de algumas aminas presentes no suco de laranja.

A tirosina é o precursor de aminas fenólicas em citros. A sinefrina (simpatol) é formada em citros por um caminho que envolve a tiramina e N-metiltiramina, conforme demonstraram WHEATON & STEWART (1969). Segundo os autores, a tiramina pode ser convertida em N-metiltiramina, hordenina, octopamina e sinefrina, sendo que em mandarim da variedade Cleópatra, a tiramina foi muito mais rapidamente convertida em N-metiltiramina e sinefrina do que em octopamina (Figura 7).

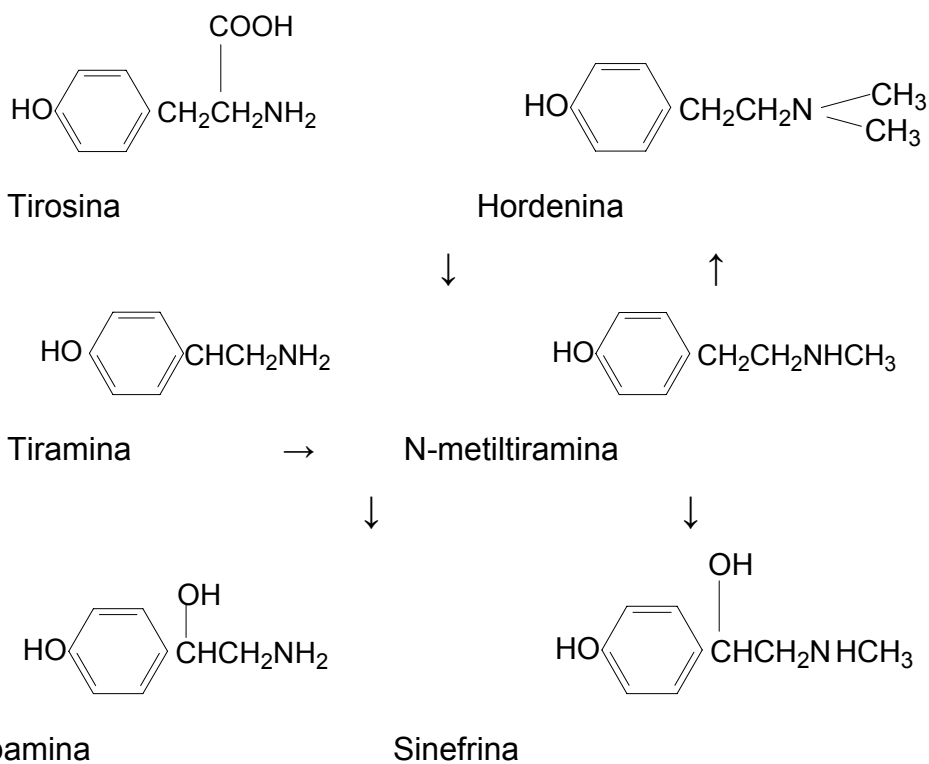


Figura 7. Síntese de aminas fenólicas em citros.

Fonte: WHEATON & STEWART (1969).

A determinação de aminas bioativas envolve as etapas de extração, purificação, separação, detecção e quantificação. Muitas vezes é necessário fazer uma derivação da amostra antes da etapa de separação ou de detecção (HURST, 1990; MORET & CONTE, 1996).

5.1.1. EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO

As etapas de extração e purificação são as mais críticas em termos da recuperação adequada de cada amina (MORET & CONTE, 1996; CUSTÓDIO et al., 2006). Nos

alimentos, estas substâncias geralmente ocorrem em misturas complexas e em baixas concentrações (CHIN & KOEHLER, 1983). Por este motivo, muitas vezes torna-se necessário fazer uma concentração ou, pelo menos, uma separação dos compostos interferentes.

De um modo geral, a extração é feita pela agitação da amostra triturada (no caso de amostra sólida) e adicionada de padrão interno, com ácido em agitador orbital. A adição de ácido, agitação e centrifugação são repetidas por mais vezes e os extratos são combinados e filtrados em papel de filtro. O extrato obtido pode ser utilizado diretamente ou passar por etapa de purificação antes da separação (VALE & GLÓRIA, 1997). Na Tabela 6 estão listadas resumidamente algumas metodologias descritas na literatura para a extração e purificação de aminas bioativas em frutas e sucos cítricos.

Tabela 6. Metodologias para a extração e purificação de aminas

Amina	Amostra	Extração	Purificação	Referência
Aminas fenólicas	sucos cítricos	Centrifugação a 20.000 g/30'		STEWART & WHEATON (1964)
Sinefrina e outras aminas	laranja e urina	HCl 0,2 N, centrifugação e filtração	Amberlite CG-120 (H ⁺), eluição com NH ₄ OH 3 N.	GJESSING & ARMSTRONG (1963)
Histamina	suco de laranja	Centrifugação a 11.180 g a 4 °C/20'		LIMA (1999)
Aminas fenólicas	suco de laranja	Filtração (Celite)	Resina (H ⁺), eluição com NH ₄ OH 1,0 N	COFFIN (1969)

No caso da laranja, várias técnicas de extração têm sido descritas: com água quente (WHEATON & STEWART, 1970), e com ácido clorídrico (UDENFRIEND et al., 1959; GJESSING & ARMSTRONG, 1963). Em trabalho realizado por LIMA (1999) para detectar histamina em suco de laranja, as amostras foram apenas centrifugadas e filtradas.

Uma purificação da amostra pode ser feita para evitar interferência de algumas substâncias como carboidratos, lipídeos, aminoácidos e pigmentos utilizando-se resinas de troca iônica. Esta é baseada na adsorção reversível e diferencial dos íons da fase móvel pelo grupo trocador da resina. A afinidade distinta entre os íons da fase móvel e da resina é devido à diferença de cargas, sendo possível controlá-la utilizando fatores como pH e força iônica (LIMA, 1999).

A purificação também pode ser realizada por outra técnica de separação líquido-sólido denominada extração em fase sólida, baseada nos mecanismos de separação da cromatografia de baixa pressão, também conhecida como cromatografia líquida clássica. Do ponto de vista prático, a extração em fase sólida, em sua forma mais simples e conhecida, comporta-se como uma cromatografia líquida empregando-se uma pequena coluna aberta, usualmente denominado cartucho de extração, a qual contém a fase sólida (LANÇAS, 2004a).

As resinas trocadoras de cátion do tipo arilsulfônica são fortemente ácidas. São deste tipo, as resinas Amberlite IR-120, Amberlite CG-120 e Dowex-50. As resinas que contêm grupos carboxílicos (-COOH), Amberlite CG-50 e Amberlite IRC-50, comportam-se como trocadoras de cátions fracamente ácidas (OHLWEILER, 1982). Na purificação com resinas de troca iônica, um ajuste inicial do pH do extrato é requerido, seguido por ativação da resina, lavagem, aplicação do extrato e etapas de eluição (MORET & CONTE, 1996).

A fase móvel pode ser constituída por soluções ácidas, básicas ou ainda por soluções tampões. Nestas, podem ser adicionados sais neutros ou solventes orgânicos, com a finalidade de se aumentar a seletividade para determinado propósito (COLLINS et al., 1997). GJESSING & ARMSTRONG (1963) extraíram aminas do suco de laranja com ácido clorídrico, fizeram a neutralização do extrato para pH 5, diluíram e clarificaram por centrifugação e, em seguida, purificaram por eluição com hidróxido de amônia (NH_4OH) 3 N em coluna de Amberlite (catiônica).

5.1.2. SEPARAÇÃO

As técnicas de separação incluem várias formas de cromatografia: de camada delgada (CCD), troca iônica, gás-líquido (CGL) e líquida de alta eficiência (CLAE), sendo as duas últimas mais específicas e sensíveis, permitindo a detecção de pequenas quantidades de aminas (COUTTS et al., 1986).

A cromatografia de troca iônica é uma técnica simples quando comparada com outros métodos de análise, pois requer simples preparo da amostra, além de ter a capacidade de separar um grande número de aminas com razoável eficiência (ZEE et al., 1983). Entretanto, esta técnica apresenta como desvantagem o longo tempo de corrida cromatográfica. Na Tabela 7 estão listadas algumas metodologias para separação de aminas bioativas utilizando cromatografia de troca iônica.

5.1.3. DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO

Vários são os métodos de detecção e quantificação da amostra, dependendo do tipo de separação empregado. Para detecção das aminas octopamina, sinefrina, hordenina, tiramina e metil-tiramina, WHEATON & STEWART (1965) determinaram a absorvância no UV a 238 nm, GJESSING & ARMSTRONG (1963) o fizeram a 272 nm e PISANO et al. (1961) a 323 nm.

Tabela 7. Metodologias utilizando cromatografia de troca iônica para a separação e detecção de aminas em produtos de laranja

Amina	Amostra	Coluna	Resina	Eluente	Referência
Sinefrina	urina	10 x 7 cm	Amberlite IRC-50	NH ₄ OH 4 N	PISANO et al. (1961)
Sinefrina e outras aminas	laranja e urina	1,5 x 20 cm	Dowex 50-X2 (H ⁺)	NH ₄ OH 1 N + etanol	GJESSING & ARMSTRONG (1963)
Aminas fenólicas	sucos cítricos		coluna na forma NH ₄ ⁺	gradiente NH ₄ OH	STEWART & WHEATON (1964)
Aminas fenólicas	sucos cítricos	135 x 0,64 cm	Poliestireno.SO ₃ H (fortemente ácida)	NH ₄ OH	WHEATON & STEWART (1965)

Na Tabela 8 estão indicadas algumas metodologias para detecção de aminas bioativas utilizando cromatografia gasosa.

Tabela 8. Metodologias utilizando CG para a separação e detecção de aminas em laranja

Amina	Amostra	Coluna	Detector	Derivação	Referência
Sinefrina, octopamina e tiramina	Suco de laranja	QF-1 (polar) + SE-30 (não polar) em Chromosorb W	FID	Diclorometano + anidrido trifluoracético (1+1)	COFFIN (1969)
Tiramina	Alimentos	OF-1 + SE-30 em Chromosorb	ECD	Anidrido trifluoracético + etilacetato anidro	SEN (1969)
Sinefrina	Urina		ECD + espectrômetro de massa	β- etoxipenta-fluoropropionil derivados	LAX et al. (1979)

ECD – detector de captura de elétrons; FID – detector por ionização de chamas.

A análise de aminas bioativas em alimentos por CLAE é muito utilizada e oferece a vantagem da separação e quantificação simultânea de aminas (VALE & GLÓRIA, 1997).

A maioria das aminas não apresenta absorção nas faixas de comprimento de onda UV visível ou fluorescência. Por esta razão, a derivação química é necessária para detectar os derivados das aminas após separação. A derivação pode ser feita antes ou depois da etapa de separação. Após a derivação, as aminas são detectadas por espectrofotometria ou fluorimetria, sendo a última a preferida por ser uma técnica mais sensível (IZQUIERDO-PULIDO et al., 1993).

Os reagentes de derivação mais empregados na análise de aminas são: 9-fluorenilmetil cloroformato, 5-dimetilaminonaftaleno-1-sulfonil-cloreto ou cloreto de dansila, cloreto de dabisila, fluorescamina e o-ftalaldeído (OPA).

A determinação no visível pode ser realizada, a 436 ou 460 nm, após a reação com cloreto de dansila ou com ninidrina a 570 nm (LIMA, 1999). Pode-se fazer também a derivação pós-coluna com o-ftalaldeído na presença de 2-mercaptoetanol ou com fluorescamina, os quais aumentam a sensibilidade do método (SEILER, 1986).

Na Tabela 9 estão resumidas algumas metodologias para a detecção de sinefrina utilizando CLAE.

Tabela 9. Metodologias utilizando CLAE para a separação e detecção de sinefrina

Amina	Amostra	Coluna	Fase móvel	Detector	Referência
Sinefrina	“zhishi”	C 18	Água-metanol (1:1) contendo 1-pentanosulfonato de sódio e ácido acético	UV 275 nm	XIANG et al. (1990)
	Fármacos orientais	C 18	Água-acetonitrila-SDS-ácido fosfórico		OHTA et al. (1994)
Sinefrina	Frutas, suco de laranja e urina	ODS OA-5000 ou OA-6000	Acetato de cobre II e acetato de amônia	eletro químico	KUSU et al. (1995, 1996)

6. VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

Os métodos analíticos são usados para análises quantitativas e qualitativas de amostras. O propósito da análise é gerar informações seguras, exatas e interpretáveis sobre a amostra. Para assegurar que o método analítico cumpre este objetivo, é submetido a uma minuciosa avaliação chamada validação (JENKE, 1996).

A *International Standards Organization* (ISO) define validação como sendo a confirmação, por exame e evidência objetiva, de que os requisitos para um determinado

uso pretendido são atendidos (ABNT, 2001). A validação de um método analítico é o processo de estabelecimento das características de desempenho e das limitações de um método; identificação dos possíveis fatores que podem afetar o seu desempenho e avaliação da extensão da influência desses fatores, sendo que o objetivo principal é demonstrar que o desempenho do método é adequado e satisfatório para resolver um determinado problema analítico.

Validar, em análise química, compreende estar com os objetivos voltados para a confiabilidade analítica do laboratório (LEITE, 1998) e para o conhecimento do potencial aplicativo e limitações de cada método (EURACHEM, 1998).

A NBR ISO/IEC 17025:2001 estabelece que métodos normalizados adaptados, não normalizados ou desenvolvidos pelos laboratórios devem ser validados (ABNT, 2001). O guia para a validação de métodos do EURACHEM, por sua vez, sugere que mesmo para métodos normalizados, verificações de figuras de mérito devem ser realizadas. SOUZA & BRITO (2002) complementam que a validação também deve ser realizada em casos como quando o controle de qualidade indicar alterações de um método com o tempo.

Embora não haja consenso sobre quais parâmetros devem ser incluídos em um processo de validação de um método analítico, pelo menos os seguintes normalmente fazem parte da maioria dos processos de validação: exatidão, precisão, fidelidade, linearidade, limite de detecção e limite de quantificação, sensibilidade, especificidade, recuperação, robustez, estabilidade e intervalo de aplicação (LANÇAS, 2004b).

JENKE (1996) avaliou a freqüência da utilização das figuras de mérito em publicações relacionadas à validação de métodos das áreas governamental, industrial e acadêmica. Foram mais freqüentes exatidão e precisão (repetibilidade e reprodutibilidade), seguidos de especificidade, linearidade, limite de quantificação, limite de detecção, robustez e sensibilidade. Considerou que a exclusão das figuras de mérito mais freqüentemente aplicadas nos protocolos de validação, exatidão e precisão, implicaria na necessidade de justificativas pertinentes, enquanto a exclusão de figuras de mérito menos freqüentes, como sensibilidade, seria menos controversa. Entretanto, SOUZA & BRITO (2002) ressaltaram que a seleção das figuras de mérito para um determinado protocolo deve estar estritamente relacionada com os objetivos da validação. Como exemplo, em protocolos de validação para comparação de métodos, é fundamental a avaliação da sensibilidade.

A estratégia de validação deve se preocupar com todas as etapas, desde a coleta e a preservação das amostras até a emissão do resultado final, passando pela documentação dos resultados obtidos em cada etapa (SOUZA et al., 2001).

As figuras de mérito mais comumente utilizadas em validação de métodos analíticos estão definidas a seguir:

Seletividade. Corresponde à capacidade de um método em determinar o analito de maneira inequívoca na presença de outras substâncias susceptíveis de interferirem na determinação (LANÇAS, 2004b). Se um método é específico, ele deve produzir resposta para um único analito. Um método seletivo produz resposta para vários analitos que podem se distinguir entre si. Geralmente, a especificidade é considerada como 100% de seletividade.

Para garantir a especificidade do método, deve-se avaliar se o sinal medido pelo equipamento é devido exclusivamente ao analito ou resulta da soma das contribuições de múltiplos componentes.

Limite de detecção. É a menor concentração de um analito na matriz que pode ser identificada com nível de confiança especificado (EURACHEM, 1998); ou seja, corresponde à menor quantidade de um analito que pode ser detectada, porém, não necessariamente quantificada como um valor exato (LANÇAS, 2004b).

Experimentalmente, o limite de detecção pode ser obtido por vários procedimentos, dentre os quais, por avaliação visual (diminuindo sucessivamente a concentração do analito); somente para métodos que apresentam ruído na linha de base, o limite de detecção corresponderá à concentração ou à massa do analito capaz de produzir um sinal com relação sinal/ruído de 3:1 ou 2:1.

Limite de quantificação. É a menor concentração do analito na matriz que pode ser determinada em níveis considerados aceitáveis de exatidão e precisão (EURACHEM, 1998). O critério de aceitabilidade deve ser definido pelo analista.

Linearidade e faixa de trabalho. A faixa de trabalho é o intervalo de padrões onde os requisitos de precisão, exatidão e linearidade são satisfeitos. O limite inferior da faixa de trabalho deve coincidir com o limite de quantificação.

Pode-se confirmar a linearidade e determinar a faixa de trabalho construindo-se curvas de calibração, da concentração do analito em função da resposta obtida no sistema de detecção, com replicatas em torno da concentração esperada do analito.

Exatidão. É o grau de aproximação entre a média de um conjunto de resultados obtidos experimentalmente e o valor verdadeiro ou reconhecido como tal. A exatidão indica a diferença entre o valor obtido e o valor real do analito na matriz, sendo geralmente expressa em termos de tendência (bias), ou seja, o desvio (positivo ou negativo) da média do valor obtido em relação ao valor real (EURACHEM, 1998).

Precisão. É o grau de dispersão dos resultados, obtidos sob condições especificadas, em torno do valor médio. A precisão pode ser avaliada em condições de repetibilidade ou reprodutibilidade, sendo expressa em termos de coeficiente de variação ou desvio padrão relativo (SOUZA & BRITO, 2002).

A repetibilidade é o grau de concordância entre os resultados obtidos pela aplicação de um mesmo procedimento analítico sob as mesmas condições de medida, em intervalos curtos de tempo. A repetibilidade representa a variabilidade obtida pelo mesmo analista, aplicando o mesmo método, no mesmo dia, sobre replicatas da mesma amostra. Se a mesma amostra é analisada por laboratórios diferentes, a medida de precisão recebe o nome de reprodutibilidade. Esta é definida como sendo o grau de concordância entre os resultados obtidos pela aplicação de um mesmo procedimento analítico, ao mesmo material, sob condições preestabelecidas (como diferentes laboratórios, operadores, equipamentos) podendo ser avaliada parcialmente pela variação de um ou mais fatores. Experimentalmente, as medidas de precisão podem ser obtidas realizando-se um mínimo de 10 determinações independentes do analito em concentrações diferentes (EURACHEM, 1998) ou um mínimo de 9 determinações (3 concentrações diferentes/3 replicatas de cada concentração) independentes (ICH, 1996).

Sensibilidade. É a capacidade de um método distinguir, alterando a resposta de medida do instrumento, com determinado nível de confiança, duas concentrações próximas (EURACHEM, 1998).

A sensibilidade do método não pode ser confundida com o limite de detecção. A sensibilidade representa a capacidade de discriminação entre amostras de teores de analito próximos.

Robustez. É a capacidade de permanência de resultados diante de pequenas variações em parâmetros operacionais e ambientais (EURACHEM, 1998).

Ao longo do uso rotineiro, variações nas condições de aplicação do método analítico podem ocorrer (pH, temperatura, fluxo de gases, fluxo de fase móvel,

estabilidade das soluções analíticas, etc) e afetar a sua “performance”. Em especial, algumas etapas do método são determinantes para o seu bom funcionamento. Durante o processo de validação, essas etapas devem ser investigadas e o seu efeito sobre o desempenho global do método deve ser avaliado usando testes de robustez.

Conformidade do sistema. É a verificação do sistema para garantir sua performance analítica antes e durante as análises. Baseia-se no conceito que equipamento, eletrônica, operações analíticas e amostras a serem analisadas constituem um sistema integral, que deve ser avaliado como tal.

CHAPTER I. ION-PAIR HPLC METHOD FOR THE DETERMINATION OF SYNEPHRINE, OCTOPAMINE AND TYRAMINE IN ORANGE PRODUCTS

ABSTRACT

An ion-pair HPLC procedure for the quantification of synephrine, octopamine and tyramine in orange juice and orange soft drink was developed and validated. Best results were obtained using a C18 column, isocratic elution with acetonitrile: 0.1 M acetate buffer and 10 mM sodium octanesulfonate and UV detection at 275 nm. Samples purification with Sep-Pak C₁₈ efficiently removed interfering compounds. The method was accurate and precise. Linearity of the calibration curves was confirmed by the ordinary least squares method including normality, homoscedasticity and independence of residuals. The quantification limits were $\leq 0.60 \mu\text{g/mL}$ for octopamine and synephrine, and $1.00 \mu\text{g/mL}$ for tyramine.

Keywords: Synephrine; orange; solid phase extraction; ion-pair HPLC; validation; linearity

1. OBJECTIVE

The objective of this work was to develop and validate an ion-pair HPLC method for the determination of synephrine, octopamine and tyramine in orange products. The method was applied on the characterization of these amines in orange juice and orange soft drink. The objectives were: (i) to investigate the conditions for the best resolution among the amines octopamine, synephrine and tyramine using acetate buffer:acetonitrile in different proportions and flow rates; (ii) to determine the best UV-VIS wavelength for the detection of the three amines simultaneously; (iii) to compare the efficiency of *n*-butanol partition and Sep pak on the purification of amines from orange products; (iv) to evaluate the method according to the performance parameters: linearity, detection and quantification limits, accuracy and recovery; (v) to determine the levels of octopamine, synephrine and tyramine found in samples of different brands of orange juice and orange soft drinks from the market.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Chemicals and reagents

Ultrapure water was obtained by filtering with a Milli-Q System (Millipore, Milford, MA, USA). Acetonitrile (HPLC grade) with UV Cut-off 190.0 nm was purchased from JT Baker (Phillipsburg, NJ, USA).

Amines standards were purchased from Sigma Chemical Co (St. Louis, MO, USA). A stock solution was prepared with 50.00 mg synephrine, 61.88 mg octopamine and 63.27 mg tyramine hydrochloride in 50 mL 0.1 *N* HCl to obtain a final concentration of 1 mg of each amine as free base/mL (stock solution). Standard solutions were prepared by diluting 0.05, 0.3, 0.6, 2.0, 3.0 and 4.0 mL of the stock solution in 50 mL 0.1 *N* HCl to obtain 1.0, 6.0, 12.0, 40.0, 60.0 and 80.0 µg/mL of each amine. Standard solutions were protected from light and stored under refrigeration.

Samples of orange juice and orange soft drinks from different brands (five different lots from each brand) were purchased at retail stores in Belo Horizonte, state of Minas Gerais, Brazil.

2.2. Liquid chromatographic system

RP-HPLC was carried out on a Shimadzu chromatographic system (Shimadzu, Kyoto, Japan) consisting of a LC-10AD solvent delivery unit, a 20 μ L loop Rheodyne manual injector, an in-line helium degasifier, a SPD-M10A diode array detector, and a system controller CBM-10AD connected to a PC. The equipment was at room temperature (23 ± 1 °C). A reversed-phase μ Bondapak C18 column (10 μ m, 300 x 3.9 mm) was used with a μ Bondapak C18 guard-pak insert (Waters, Milford, MA, USA). The mobile phase was comprised of two solutions: (1) solution A – 0.1 M sodium acetate 10 mM 1-octanesulfonic acid sodium salt adjusted to pH 4.9 with acetic acid; and (2) solution B – acetonitrile. The mobile phases were filtered and degassed before use. The filters were 0.45 μ m pore size HAWP membranes for aqueous and HVHP for organic solvents (Millipore, Milford, MA, USA).

2.3. Procedures

2.3.1. Optimization of the chromatographic conditions for the separation of the amines

Several compositions and flow rates of the mobile phase were tested in order to obtain optimal resolution of the amines in the shortest running time. Spectra from 180 to 280 nm were run in order to select the wavelength that best detected the three amines simultaneously.

2.3.2. Extraction and purification of the amines from orange products

Prior to analysis, the samples of concentrated orange juice were diluted to 10.5°Brix (RL1-PZO, Warszawa, Poland) which is the average concentration of fresh squeezed orange juice and the soft drink samples were degassed using a magnetic stirrer for 15 minutes. The samples were centrifuged at 11,180 x *g* (Jouan CR31 refrigerated centrifuge, Saint Herblain, France) for 20 minutes at 4 °C and filtered in qualitative filter paper. Extracts were purified and filtered through 0.45 μ m pore size HAWP membranes (Millipore Corp., Bedford, MA, USA) before injection into the HPLC.

Samples of orange juice were spiked with 0 (control), 10, 20 and 30 $\mu\text{g/mL}$ of synephrine, octopamine and tyramine. The efficiency of two different purification procedures on the clean up of the samples was determined in triplicate.

The methods used for the purification of the amine extracts were partition with *n*-butanol and solid phase extraction (SPE) using Sep-Pak C18. For the purification with *n*-butanol a 5 mL portion of the extract was transferred to test tubes containing 1 mL of 5 *N* NaOH. Granular Na_2CO_3 was added in excess and the mixture was agitated. *n*-Butanol (6 mL) was added, the mixture was agitated vigorously and the organic phase was separated after centrifugation ($11,180 \times g$) at 23 °C for 5 minutes (VALE & GLÓRIA, 1997). This procedure was repeated two more times. The *n*-butanol extracts were combined and 5 mL 0.1 *N* HCl was added. After agitation, the acid phase was collected and this procedure was repeated two times. The acid extracts were combined and filtered through 0.45 μm HAWP membrane. For the purification with Sep-Pak C18 (Waters, Milford, MA, USA), the cartridge was conditioned with acetonitrile (2 mL) and with ultra pure water (2 mL). A 5 mL portion of the extract was passed through the cartridge under atmospheric pressure. The collected eluate was filtered through 0.45 μm HAWP membrane (TAVARES-NETO et al., 2003).

The samples of orange soft drink were spiked with 0 (control), 3.0, 6.0 and 12.0 $\mu\text{g/mL}$ of synephrine, octopamine and tyramine and the efficiency of the SPE purification procedure on the clean up of the samples was determined in triplicate.

2.3.3. Validation of the developed method

All procedures were validated. Method reliability in terms of linearity, sensitivity (equipment detection and quantification limits), specificity, accuracy and precision was studied (EURACHEM, 1998; THOMPSON, 2002; SOUZA & JUNQUEIRA, 2005; EUROPEAN COMMISSION, 2002; CODEX, 1993).

Linearity. Calibration curves were built using standard solutions at six evenly spaced concentration levels (1.0 to 80 $\mu\text{g/mL}$), each level from three independent replicates. Calibration curves were plotted and the respective ordinary least square method – OLSM was used (THOMPSON, 2002; SOUZA & JUNQUEIRA, 2005). Linearity was confirmed by the residual plot visual inspection, outlier test (Jackknife standardized residuals), normality of residuals (Ryan-Joiner test), homoscedasticity (Levene's test) and independence tests (Durbin-Watson).

Detection limit. Standard solutions were injected in the HPLC at decreasing concentrations. The detection limits were the masses of the amines that showed responses of at least three times the noise level (EURACHEM, 1998).

Quantification limits. Standard solutions were injected in the HPLC at decreasing concentrations. The quantification limits were the lowest amines concentrations amines that attended the recoveries and standard deviations criteria established by the Codex Alimentarius (CODEX, 1993).

Selectivity. Orange juice samples spiked or not with 10, 20 and 30 $\mu\text{g/mL}$ and orange soft drinks spiked or not with 1.5, 3.0, 6.0 and 12.0 $\mu\text{g/mL}$ were used to investigate the interference of the matrix. The chromatograms were evaluated for the presence of interfering compounds, peak resolution and the agreement on the retention times of amines in the standard solution and in the samples.

Accuracy and precision. Method accuracy and precision were evaluated in terms of average recovery and coefficient of variation of samples (matrix) spiked with known concentrations of standard solutions. The spiking levels were 10, 20 and 30 $\mu\text{g/mL}$ for orange juice and 1.5, 3.0, 6.0 and 12.0 $\mu\text{g/mL}$ for orange soft drink. The criteria established by the Codex Alimentarius (CODEX, 1993) were used to evaluate recovery and coefficient of variation.

2.3.4. Standard solution stability

The stability of the amines (octopamine, synephrine and tyramine) in the standard solution (4 $\mu\text{g/mL}$) was evaluated during a four months period.

2.3.5. Levels of octopamine, synephrine and tyramine in orange juice and orange soft drinks

The method developed and validated was used in the determination octopamine, synephrine and tyramine in orange juice and orange soft drink samples from the market.

The results were submitted to analysis of variance and the means were compared by the Tukey test ($p \leq 0.05$).

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Optimization of the chromatographic conditions for the separation of the amines

The method described in this study is based on the HPLC procedure used to determine bioactive amines in food (VALE & GLÓRIA, 1997; SANTOS et al., 2003; GLÓRIA, 2005; GLÓRIA et al. 2005; ADÃO & GLÓRIA, 2005; VIEIRA et al., 2006; LAVIZZARI et al., 2006), which requires the use of a reversed-phase stationary phase to separate the amines as neutral ion-pairs formed with the octanesulfonate of the mobile phase. Then a post column reaction system allows derivatization with OPA followed by fluorimetric detection. However, OPA does not react with secondary amines such as synephrine. Therefore another form of detection had to be used. The maximum absorbance value for the three amines was 225 nm as indicated by the respective ultra-violet spectra (Figure I.1). However, several compounds that could interfere in the determination of the amines can also absorb at that wavelength. Therefore, 275 nm was chosen for the determination of synephrine, octopamine and tyramine. This wavelength was the second highest absorbance for the studied amines.

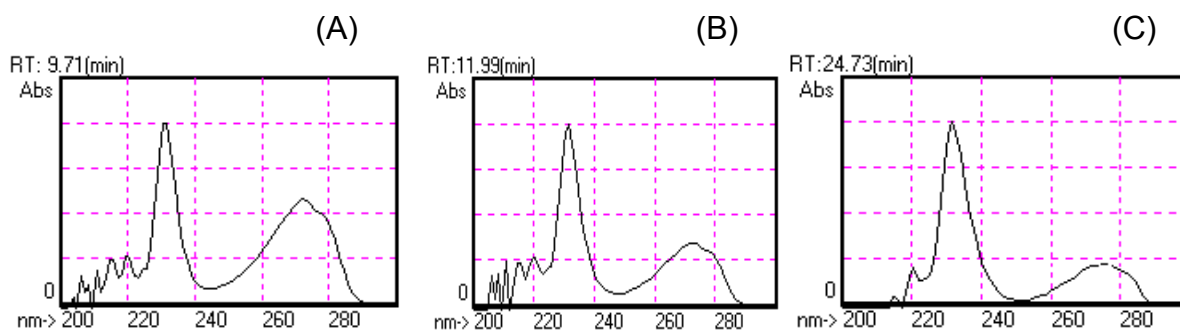


Figure I.1. Ultra-violet spectra of (A) octopamine, (B) synephrine and (C) tyramine at the concentration of 12 $\mu\text{g/mL}$ in 0.1 M sodium acetate and 10 mM sodium octanesulfonate (pH 4.9):acetonitrile (91:9, v/v).

LC conditions for optimum resolution of the amines in the standard solution and in the samples were obtained with an isocratic mobile phase composed of 91:9 (v/v) 0.1 M sodium acetate and 10 mM sodium octanesulfonate (pH 4.9):acetonitrile at a flow rate of 0.8 mL/min. This isocratic elution system allowed a well-resolved separation of octopamine, synephrine and tyramine in a single run of 18 minutes. Typical chromatogram

of the amines in the standard solution is shown in Figure I.2A. The identity of the amines was confirmed by spiking the sample with each compound individually and by comparison of the spectra with those from the standard solutions.

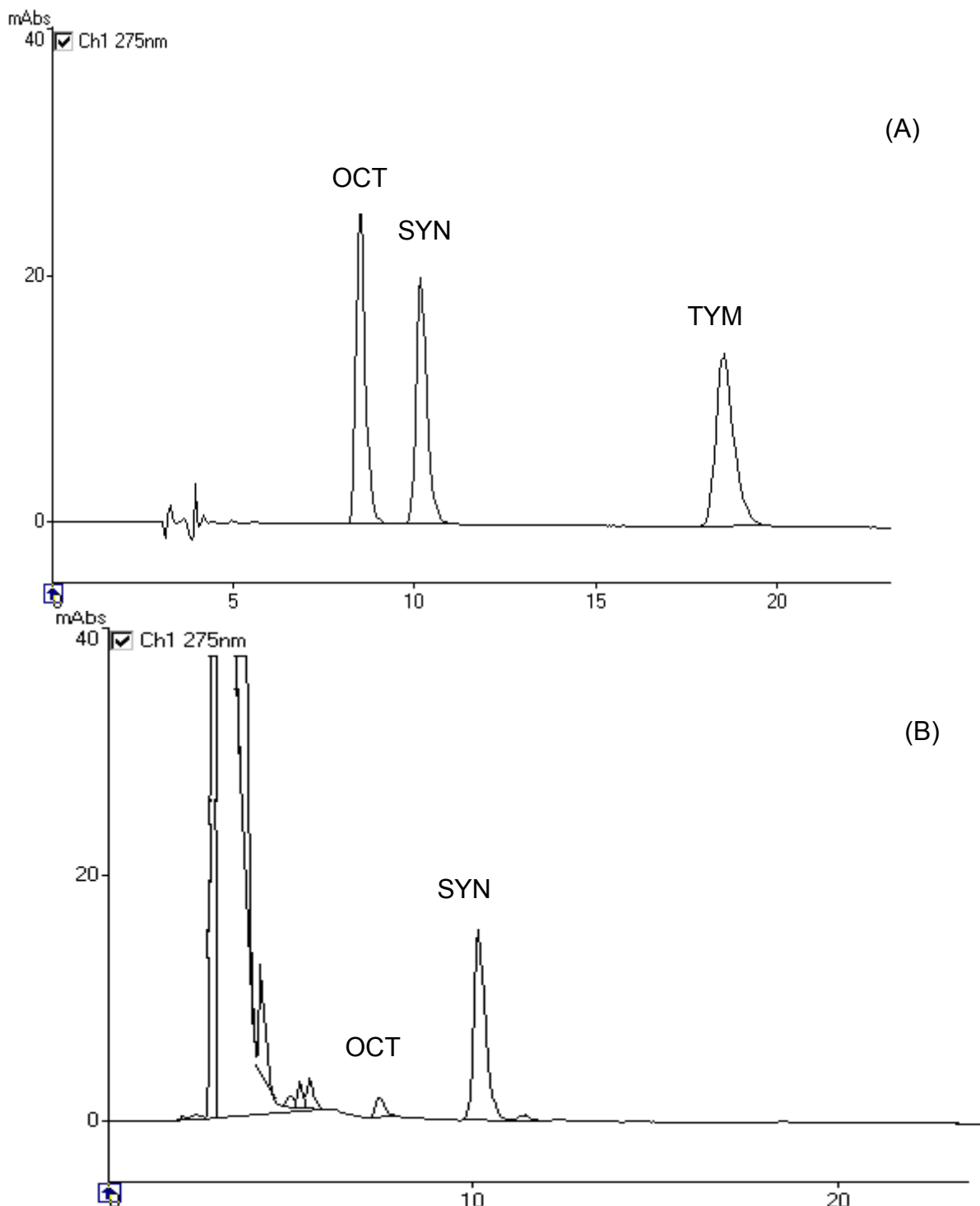


Figure I.2. Typical chromatograms of (A) a standard solution (12 $\mu\text{g/mL}$) of octopamine, synephrine and tyramine and of (B) an orange juice sample cleaned-up with Sep Pak C18. HPLC with a 20 μL loop injector, diode array detector at 275 nm, $\mu\text{Bondapak C18}$ column (10 μm , 300 x 3.9 mm) and guard-column, isocratic mobile phase of 91:9 (v/v) - 0.1 M sodium acetate and 10 mM sodium octanesulfonate (pH 4.9):acetonitrile at a flow rate of 0.8 mL/min. OCT = octopamine, SYN = synephrine, TYM = tyramine.

3.2. Extraction and purification of the amines from orange products

The mean recoveries of the amines during purification of samples of orange juice spiked with different concentrations of the amines are shown in Figure I.3. Without purification, an overestimated value was observed for all of the amines (data not shown), which indicated that a clean up step was required to eliminate the interfering compounds.

When comparing the efficiency of the purification procedures, partitioning with *n*-butanol (Figure I.3a) recovered a low percentage of octopamine and tyramine from the extract (average of 17.2% and 1.5% recovery, respectively). Furthermore, butanol partitioning was not capable of eliminating all of the compounds which interfered with the determination of synephrine resulting in excessive mean recoveries (130%). Best recoveries for the three amines at every spiking level were observed when solid phase extraction using Sep-Pak C18 was used (Figure I.3b), especially with respect to synephrine (average of 102% recovery). Moreover, clean up with Sep-Pak provided high reproducibility with coefficient of variation $\leq 6\%$. The mean recoveries and the coefficients of variation obtained are in accordance with the values established by the Codex Alimentarius (1993). A typical chromatogram of the amines in an orange juice sample cleaned up with Sep Pak is shown in Figure I.2B. The amines in the samples were identified on the basis of peak retention time and confirmed by spiking the sample with each individual amine and also by comparing UV spectra.

The samples of orange soft drink spiked with different amounts of octopamine, synephrine and tyramine were also submitted to the SPE purification procedure described for the orange juice. Good recoveries and high reproducibility were obtained (Figure I.3c) indicating the efficiency of the clean up procedure for the soft drink samples.

3.3. Validation of the developed method

Calibration curve linearity. Linearity of the detector response to the amines at six concentrations with values varying from 1 to 80 $\mu\text{g/mL}$ was verified by means of ordinary least square method (OLSM) statistics. Visual examination of the residual plots indicated possible outlier and revealed no other obvious deficiency. The points that were outside the accepted variation were confirmed as outliers by the Jackknife residual test. The residual plots and outliers removed for each curve are shown in Figure I.4. One outlier was detected in each amine curve. After discarding the outliers in the respective curves, no more outlier was detected. This step allowed the deletion of some points that could have an influence on the fitted regression equation.

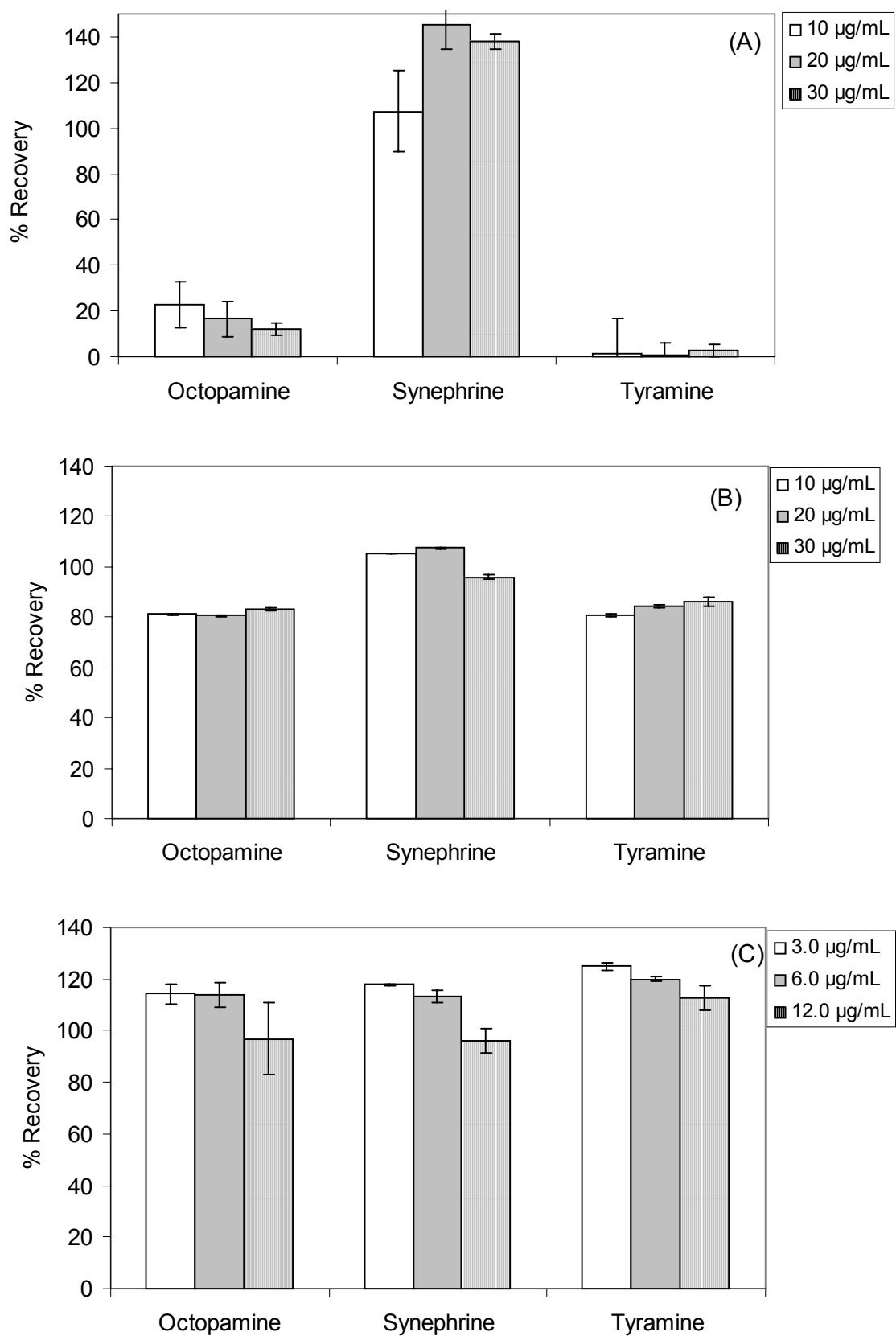


Figure I.3. Influence of the purification of orange juice with (A) n-butanol and (B) Sep-Pak C18 and of orange soft drink with (C) Sep-Pak C18 spiked with three levels of amines on the recoveries of octopamine, synephrine and tyramine.

The assumption that the residuals are normally distributed was confirmed by the Ryan-Joiner test (Figure I.5). The correlation coefficients were 0.989, 0.954 and 0.972 for octopamine, synephrine and tyramine, respectively, and the p-values were higher than 0.100 for every amine. This indicated no significant deviation from normality at $\alpha = 0.10$.

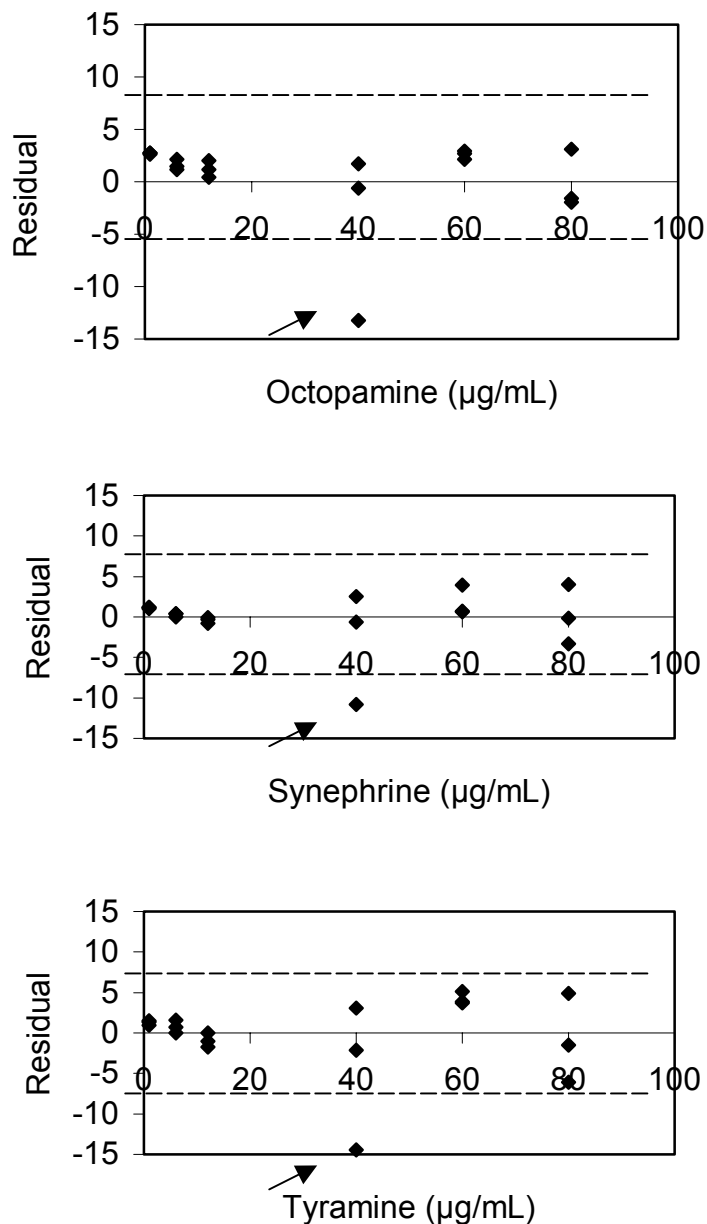


Figure I.4. Residual plots for outlier diagnosis by Jackknife standardized residuals test for octopamine, synephrine, and tyramine. Points with an arrow are outliers.

The residuals were statistically independent and the Durbin-Watson statistic was 1.798 ($p > 0.05$) for octopamine, 2.300 ($p > 0.05$) for synephrine, and 2.200 ($p > 0.05$) for tyramine, which demonstrated that no autocorrelation was observed (Table I.1). Homoscedasticity was confirmed by the Levene test. According to Table I.2, the residual

variability across all concentration levels was not significantly different ($p > 0.05$). Therefore, the variance in the residuals for the concentrations of the amines is constant, e.g., homoscedastic. These results confirm the linearity of the method in the concentration range studied.

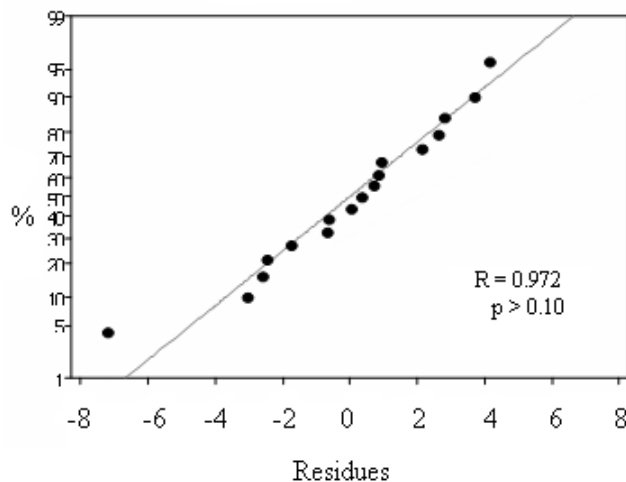
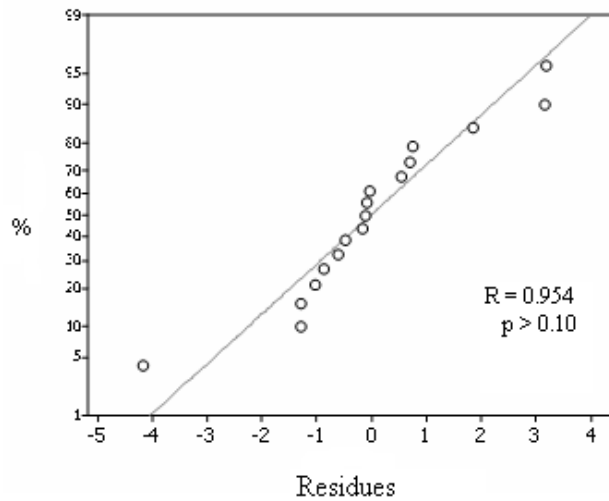
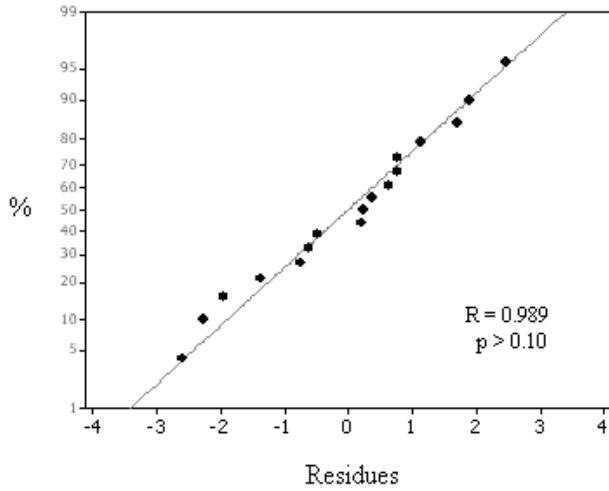


Figure I.5. Normality diagrams of residues for (A) octopamine, (B) synephrine and (C) tyramine according to the Ryan-Joiner test. R = correlation coefficient at p -values > 0.10 .

Table I.1. ANOVA statistics for regression analysis of octopamine, synephrine and tyramine including lack of fit test

Amines	Source	DF	SS	MS	F	p
Octopamine	Regression	1	2.68 x 10 ⁶	2.68 x 10 ⁶	1.16 x 10 ⁶	x 10 ⁻¹⁰
	Residual error	15	35	2		
	Lack of fit	4	14	3	1.82 x 10 ⁶	0.196
	Pure error	1	21	2		
	Total	16	2.68 x 10 ⁶			
Synephrine	Regression	1	2.16 x 10 ⁶	2.16 x 10 ⁶	6.76 x 10 ⁵	x 10 ⁻¹⁰
	Residual error	15	48	3		
	Lack	4	8	2	0.59	0.676
	Pure error	11	39	4		
	Total	16	2.16 x 10 ⁶			
Tyramine	Regression	1	4.38 x 10 ⁶	4.38 x 10 ⁶	5.02 x 10 ⁵	x 10 ⁻¹⁰
	Residual error	15	131	9		
	Lack of fit	4	53	13	1.86	0.188
	Pure error	11	78	7		
	Total	16	4.38 x 10 ⁶			

DF = degrees of freedom; SS = sum of squares; MS = mean square; F = variance ratio; p = significance. Durbin-Watson statistic = 1.798 for octopamine, 2.301 for synephrine and 2.200 for tyramine.

Table I.2. Homoscedasticity evaluation by Levene test for octopamine, synephrine and tyramine

Amine	Levene statistics	
	t critical	p value
Octopamine	0.84	0.547
Synephrine	1.80	0.193
Tyramine	2.69	0.080

t critical = t_{0.975}.

Detection and quantification limits. The equipment detection limits obtained for the amines were 0.06 mg for octopamine, 0.08 mg for synephrine and 0.32 mg for tyramine, indicating higher sensitivity for octopamine, followed by synephrine and by tyramine.

The detection and quantification limits of the method are respectively, 0.15 and 0.20 µg/mL for octopamine, 0.20 and 0.60 µg/mL for synephrine and 0.80 and 1.00 µg/mL for tyramine. The quantification limit for synephrine was lower than the one reported by Cancalon (CANCALON, 1999). The quantification limit observed for tyramine was similar to the one (1 µg/mL) described by WHEATON AND STEWART (1965), however it was higher than the limit obtained by post column derivatization with OPA and fluorescence detection (GLÓRIA et al., 2005; ADÃO & GLÓRIA, 2005). Therefore, the analysis of tyramine by post column derivatization with OPA and fluorescence detection is recommended when higher sensitivity is required.

Based on these results, higher sensitivity was observed for octopamine and lower for tyramine, with synephrine showing intermediate sensitivity. These limits are considered adequate for the determination of amines in orange juice. However, the limits for tyramine and octopamine may not be good enough for their determination in soft drinks which contain only 10% of orange juice.

Accuracy and precision. The recoveries obtained during analysis of orange juice and orange soft drinks spiked with different amounts of the amines are indicated on Table I.3.

Table I.3. Mean recoveries and coefficients of variation for octopamine, synephrine and tyramine in soft drink spiked with different concentrations of standards, cleaned-up with Sep-Pak C18 and analyzed by HPLC

Amine / Spike level ($\mu\text{g/mL}$)	Percent (%)	
	Mean recovery	Coefficient of variation
Orange juice		
Octopamine		
10	81.1	6.4
20	80.5	0.9
30	83.3	2.1
Synephrine		
10	105.3	7.8
20	107.4	0.4
30	95.9	1.4
Tyramine		
10	80.5	10.0
20	84.3	15.0
30	86.1	
Orange soft drink		
Octopamine		
1.5	87.7	3.5
3.0	114.2	3.2
6.0	113.8	0.4
12.0	96.9	1.6
Synephrine		
1.5	76.4	9.2
3.0	117.8	4.1
6.0	113.2	2.3
12.0	96.2	0.8
Tyramine		
1.5	96.0	6.5
3.0	124.9	11.0
6.0	120.0	4.3
12.0	112.8	4.2

The mean recoveries and the coefficients of variation are within the acceptable intervals described by the Codex Alimentarius (1993) for analytes at the concentration usually found in the orange products.

3.4. Standard solution stability

The standard solution stored at 5-8 °C and analyzed periodically, showed results as indicated in Figure I.6. The variation observed is within the limits established (20%) by Pomeranz & Meloan (1994). Therefore, the solution was considered stable during the 120 days period studied.

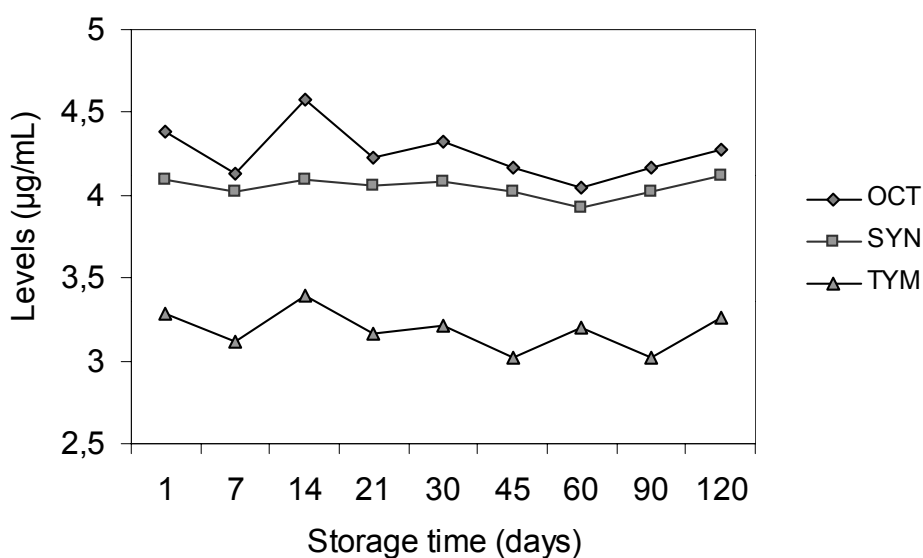


Figure I.6. Levels of octopamine (OCT), synephrine (SYN) and tyramine (TYM) in standard solution ($\mu\text{g/mL}$) during storage for 120 days at 5-8 °C.

3.5. Levels of octopamine, synephrine and tyramine in orange juice and orange soft drinks

The levels of octopamine, synephrine and tyramine found in samples of different brands of orange juice and orange soft drinks from the market are shown in Table I.4. The three amines were detected in the orange juice samples. Synephrine and tyramine were present in 100% of the samples, whereas octopamine was present in only 29%. Synephrine was the predominant amine followed by octopamine or by tyramine depending on the brand. No significant difference was observed on tyramine levels among the different brands. However, the levels of octopamine and synephrine varied significantly with levels from not detected (nd) to 1.29 $\mu\text{g/mL}$ and 10.1 to 17.9 $\mu\text{g/mL}$, respectively.

These values are representative of a mixture of Hamlin, Valencia, Natal and Pera oranges which are used in Brazil for the production of orange juice (TODAFRUTA, 2004).

Table I.4. Mean levels of octopamine, synephrine and tyramine (mg/L) in different brands of orange juice and of orange soft drinks

Samples / Brand ¹	Mean levels of amines ² in $\mu\text{g/mL}$ (% CV)		
	Octopamine	Synephrine	Tyramine
Orange juice			
A	0.88 (24) ^b	16.3 (11) ^{ab}	0.02 (33)
B	1.29 (1) ^a	21.8 (1) ^a	0.02 (33)
C	nd ^c	15.8 (10) ^{a,b}	0.04 (33)
D	nd ^c	14.7 (28) ^b	0.67 (0)
E	nd ^c	17.9 (21) ^{a,b}	0.51 (0)
F	nd ^c	15.5 (11) ^{a,b}	0.13 (0)
G	nd ^c	10.1 (13) ^b	0.12 (0)
Orange soft drink			
H	nd	2.31 (6,5) ^a	nd
I	nd	2.11 (8,7) ^a	nd
J	nd	0.31 (0) ^{bc}	nd
K	nd	0.94 (22) ^{cd}	nd
L	nd	nd ^d	nd
M	nd	2.05 (13) ^a	nd
N	nd	0.84 (17) ^c	nd

¹ Five lots of each brand were analyzed.

² Quantification limits were: 0.60 $\mu\text{g/mL}$ for octopamine and synephrine and 1.00 $\mu\text{g/mL}$ for tyramine. Mean values with different letters in the same column for each orange product varied significantly (Tukey test, $p < 0.05$).

The levels of synephrine detected were similar to those found by CANCELON (1999) for mature Hamlin and Valencia juices and by STEWART AND WHEATON (1964) for several varieties of oranges (Hamlin, Parson Brown, Pineapple, Valencia, Pope, Navel and Temple). However higher levels were reported for Murcott and Seville sour (PENZAK, 2001) orange juices. The levels of octopamine were similar to those reported for Navel and Temple orange juices (STEWART & WHEATON, 1964). The presence of tyramine in orange was reported in the literature but the levels were described for the first time.

The brands of orange soft drink included in this study only contained synephrine at levels from nd to 2.31 $\mu\text{g/mL}$, varying significantly among the different brands analyzed. No information was found in the searched literature on the levels of amines in orange soft drinks.

4. CONCLUSIONS

The quantitative determination of octopamine, synephrine and tyramine in orange juice and soft drinks was possible by ion pair-HPLC, isocratic run and UV detection at 275 nm in a 18 min run. After extraction, a purification step was required to avoid interference from the food matrix. Solid phase extraction using Sep-pak C18 provided better recoveries compared to partition with *n*-butanol. The method was validated, showing efficiency in terms of linearity, accuracy and precision. The quantification and detection limits were sufficiently low for the determination of these amines in orange juice, however only synephrine showed detection limits adequate for other orange products like orange soft drinks. The standard solution was stable during storage for up to 120 days at 5 – 8 °C. The three amines were found in orange juice, whereas only synephrine was found in orange soft drinks. The levels of octopamine and synephrine varied significantly among different brands of orange juice and synephrine levels varied among orange soft drink brands.

CAPÍTULO II. PERFIL E TEORES DE AMINAS BIOATIVAS EM SUCOS E REFRIGERANTES DE LARANJA

RESUMO

Os teores de aminos bioativas, pH, sólidos solúveis, acidez total, densidade e açúcares redutores foram avaliados em diferentes marcas de sucos e refrigerantes de laranja. A determinação das aminos bioativas foi feita por CLAE-par-iônico em coluna C18 e detecção por UV-VIS e por fluorescência do derivado *o*-ftalaldeído. As características físico-químicas foram determinadas por métodos tradicionais de análise. Foram encontradas 09 das 12 aminos pesquisadas no suco de laranja com teores totais de 34,9 a 66,6 mg/L. Putrescina foi a amina predominante, seguida da sinefrina e da espermidina. Espermina, agmatina, tiramina, octopamina, histamina e serotonina estavam presentes em teores inferiores a 1,0 mg/L. As amostras atenderam à legislação vigente quanto aos parâmetros físico-químicos, não havendo diferença entre marcas. Foram detectadas cinco aminos no refrigerante, com teores totais de 1,67 a 7,53 mg/L. Putrescina foi a amina predominante, seguida da sinefrina, espermidina e espermina. Os teores destas aminos no refrigerante variaram de 5,0 a 7,6% do nível médio encontrado no suco de laranja. Houve correlação positiva entre os teores de espermidina e putrescina e entre sinefrina e putrescina. Estudos são necessários para verificar qual seria a influência de outros fatores nos teores de aminos em suco de laranja utilizado para a produção de refrigerantes.

Palavras-chave: laranja, suco, refrigerante, aminos bioativas, sinefrina, octopamina.

1. OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo avaliar os tipos e teores de aminas bioativas e as características físico-químicas em sucos e refrigerantes de laranja disponíveis no mercado consumidor de Belo Horizonte, MG. Os objetivos específicos foram: (i) determinar o perfil e teores de 12 aminas (agmatina, cadaverina, histamina, feniletilamina, putrescina, serotonina, espermidina, espermina, triptamina, tiramina sinefrina e octopamina) e as características físico-químicas (pH, °Brix, acidez, °Brix/acidez, densidade e açúcares totais) em amostras de suco e refrigerantes de laranja; (ii) verificar a existência de correlação entre as aminas encontradas e as características físico-químicas em amostras de suco e refrigerantes de laranja.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material

Amostras de sucos (três lotes de sete marcas) e refrigerantes de laranja (cinco lotes de sete marcas) foram adquiridas no mercado consumidor de Belo Horizonte, MG, no período de agosto a setembro de 2002. Das amostras de sucos de laranja, duas marcas indicaram nos rótulos serem constituídas do suco integral, sendo as demais, compostas por sucos reconstituídos, obtidos a partir do suco concentrado. Quanto às amostras de refrigerantes de laranja, todas indicaram nos rótulos serem constituídas de água gaseificada, açúcar ou adoçante, suco de laranja, ácido cítrico, benzoato de sódio e corante artificial amarelo crepúsculo.

Para as análises, os reagentes utilizados foram de grau p.a. Para as determinações por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foram utilizados solventes grau cromatografia e água com condutividade de 18,2 mΩ obtida em Milli-Q (Millipore Corporation, Milford, MA, EUA), filtrados em membrana HAWP de 0,45 µm de tamanho de poro.

Todas as aminas utilizadas como padrão foram adquiridas da Sigma (St. Louis, MO, EUA). Foi preparada uma solução padrão contendo 10 aminas utilizando-se: sulfato de agmatina, dihidroclorato de cadaverina, dihidroclorato de histamina, dihidroclorato de feniletilamina, dihidroclorato de putrescina, 5-hidroxitriptamina (serotonina), trihidroclorato

de espermidina, tetrahidrocloreto de espermina, triptamina, e tiramina. As aminas foram dissolvidas separadamente em HCl 0,1 mol/L, de modo a obter soluções estoque de 1 mg/mL de cada amina. Foi feito um “pool”, misturando-se alíquotas de cada uma das soluções individuais, obtendo-se soluções com 0,5; 1,0; 2,0; 5,0; 7,0 e 10,0 µg/mL de cada amina.

Sinefrina (base livre) e octopamina (hidrocloro de octopamina) foram utilizadas no preparo de soluções estoque, separadamente, na concentração de 1 mg/mL de HCl 0,1 mol/L. Em seguida foi feito um “pool”, misturando-se alíquotas de cada uma das soluções individuais, obtendo-se soluções contendo 1,0; 6,0; 12,0; 40,0; 60,0 e 80,0 µg/mL de cada amina.

2.2. Métodos de análise

Aminas bioativas. As amostras de sucos e refrigerantes de laranja foram centrifugadas a 11.180 g, a 4 °C por 20 minutos e filtradas em filtro qualitativo. As amostras de refrigerante foram também desgaseificadas utilizando-se agitador magnético. Os extratos obtidos foram filtrados em membrana HAWP de 0,45 µm de tamanho de poro (Capítulo I).

A separação das aminas foi feita por CLAE-par-iônico em coluna µBondapak C₁₈ de 300 mm de comprimento e 10 µm de diâmetro (Waters, Milford, Massachusetts, EUA), a 22 ± 2 °C, utilizando-se dois sistemas distintos. Para a determinação da espermina, espermidina, putrescina, agmatina, cadaverina, histamina, tiramina, serotonina, triptamina e feniletilamina, foi utilizado um sistema gradiente de eluição, sendo o eluente A- tampão acetato 0,1 mol/L contendo octanossulfonato de sódio 10 mmol/L, pH ajustado para 4,9 com ácido acético glacial e o eluente B- acetonitrila, em fluxo de 0,7 mL/min. O gradiente de eluição foi de 12% B/0,01 min, 12% B/20 min, 13% B/22 min; 13% B/35 min; 26% B/43 min; 26% B/66 min; e 12%B/71 min. O cromatógrafo utilizado foi o modelo LC-10AD com câmara de mistura à alta pressão; conjunto de lavagem automática de pistão; e injetor automático modelo SIL-10AD VP (Shimadzu, Kioto, Japão). Após a separação, as aminas foram derivadas utilizando-se sistema de derivação pós-coluna com o-ftalaldeído na presença de mercaptoetanol e detecção por fluorescência (RF-551, Shimadzu, Kyoto, Japão) a 340 nm de excitação e 445 nm de emissão (ADÃO & GLÓRIA, 2005).

Para a determinação da octopamina e sinefrina, foi utilizado um sistema de detecção no ultravioleta. Foi necessário executar uma etapa prévia de purificação das amostras após a extração para eliminar interferentes, utilizando cartuchos Sep pak C18

(Waters, Milford, MA, EUA) (TAVARES-NETO et al., 2003). Para a separação das aminas foi utilizado um sistema isocrático de eluição (91 partes de tampão acetato 0,1 mol/L contendo octanossulfonato de sódio a 10 mmol/L, pH ajustado para 4,9 com ácido acético glacial e 9 partes de acetonitrila) a um fluxo de 0,8 mL/min. O sistema CLAE utilizado foi da marca Shimadzu (Kyoto, Japão) contendo bombas modelo LC-10AD com câmara de mistura à baixa pressão; conjunto de lavagem automática de pistão; detector de arranjo de diodos (SPD-M10AVP) a 275 nm e injetor manual Rheodyne com “loop” de 20 µL (Capítulo I).

A identificação das aminas foi baseada na comparação do tempo de retenção do padrão e da amostra, sendo confirmada pela adição de solução padrão contendo a amina suspeita à amostra. A quantificação das aminas foi feita por interpolação da área de cada amina da amostra nas respectivas curvas padrão, sendo os resultados expressos em mg/L (VALE & GLÓRIA, 1997; ADÃO & GLÓRIA, 2005).

Potencial hidrogeniônico. O valor do pH foi determinado em potenciômetro digital, marca Digimed modelo DM-20, após calibração do instrumento com soluções tampão de pH 4,0 e 7,0 (BRASIL, 1986).

Sólidos solúveis totais. Os teores de sólidos solúveis totais, expressos em °Brix foram determinados em refratômetro de bancada modelo RL1-PZO marca Warszawa (Polônia), equipado com termômetro. Após a leitura, foi feita a correção do °Brix para a temperatura de 20°C, utilizando tabela apropriada (BRASIL, 1986).

Acidez total. A acidez total foi determinada por titulação com solução de NaOH 0,1 mol/L padronizada, utilizando fenolftaleína como indicador (BRASIL, 1986).

Densidade. A densidade foi determinada em picnômetro de vidro, sendo calculada pela razão da diferença de peso entre o picnômetro com amostra e o picnômetro vazio e da diferença entre o picnômetro com água destilada e o picnômetro vazio, a 20 °C (BRASIL, 1986).

Açúcares totais. Os açúcares redutores e não-redutores foram determinados pelo método Lane-Eynon. As amostras clarificadas contendo iguais volumes das soluções de Fehling A e B foram tituladas com solução de glicose a 0,5% (BRASIL, 1986).

2.3. Análise estatística. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade utilizando o programa SPSS 12.0.1 versão windows (Chicago, Illinois, USA). A existência de correlação significativa entre os teores de amins e as características físico-químicas foi verificada utilizando-se a correlação de Pearson a 1% de probabilidade (SAMPAIO, 1998).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Perfil e teores de amins bioativas em suco de laranja

Dentre as 12 amins pesquisadas, nove foram encontradas no suco de laranja, dentre elas, espermidina, espermina, putrescina, agmatina, sinefrina, tiramina, octopamina, histamina e serotonina. Seis destas amins (espermidina, espermina, putrescina, sinefrina, tiramina e histamina) estavam presentes em todas as amostras analisadas (Figura II.1). A agmatina foi encontrada em 43% das amostras, a octopamina em 29% e a serotonina em 14% das amostras analisadas.

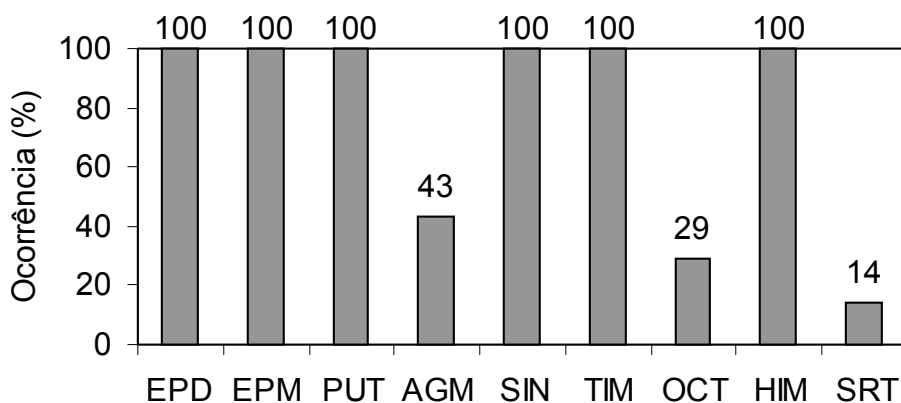


Figura II.1. Ocorrência das amins bioativas em amostras de suco de laranja (EPD = espermidina, EPM = espermina, PUT = putrescina, AGM = agmatina, SIN = sinefrina, TIM = tiramina, OCT = octopamina, CAD = cadaverina, HIM = histamina, SRT = serotonina).

O perfil dos padrões das amins bioativas pesquisadas pode ser observado na Figura II.1.

A presença de algumas amins em laranja já havia sido descrita na literatura. A presença de tiramina foi relatada por UDENFRIEND et al. (1959) e COUTTS et al. (1986);

a de sinefrina por WHEATON & STEWART (1965) e COUTTS et al. (1986); a de octopamina por WHEATON & STEWART (1965); a de putrescina por BARDOCZ et al. (1993), OKAMOTO et al. (1997), ELIASSEN et al. (2002) e TASSONI et al. (2004); a de espermidina por BARDOCZ et al. (1993), OKAMOTO et al. (1997) e ELIASSEN et al. (2002); e a de espermina por OKAMOTO et al. (1997) e ELIASSEN et al. (2002).

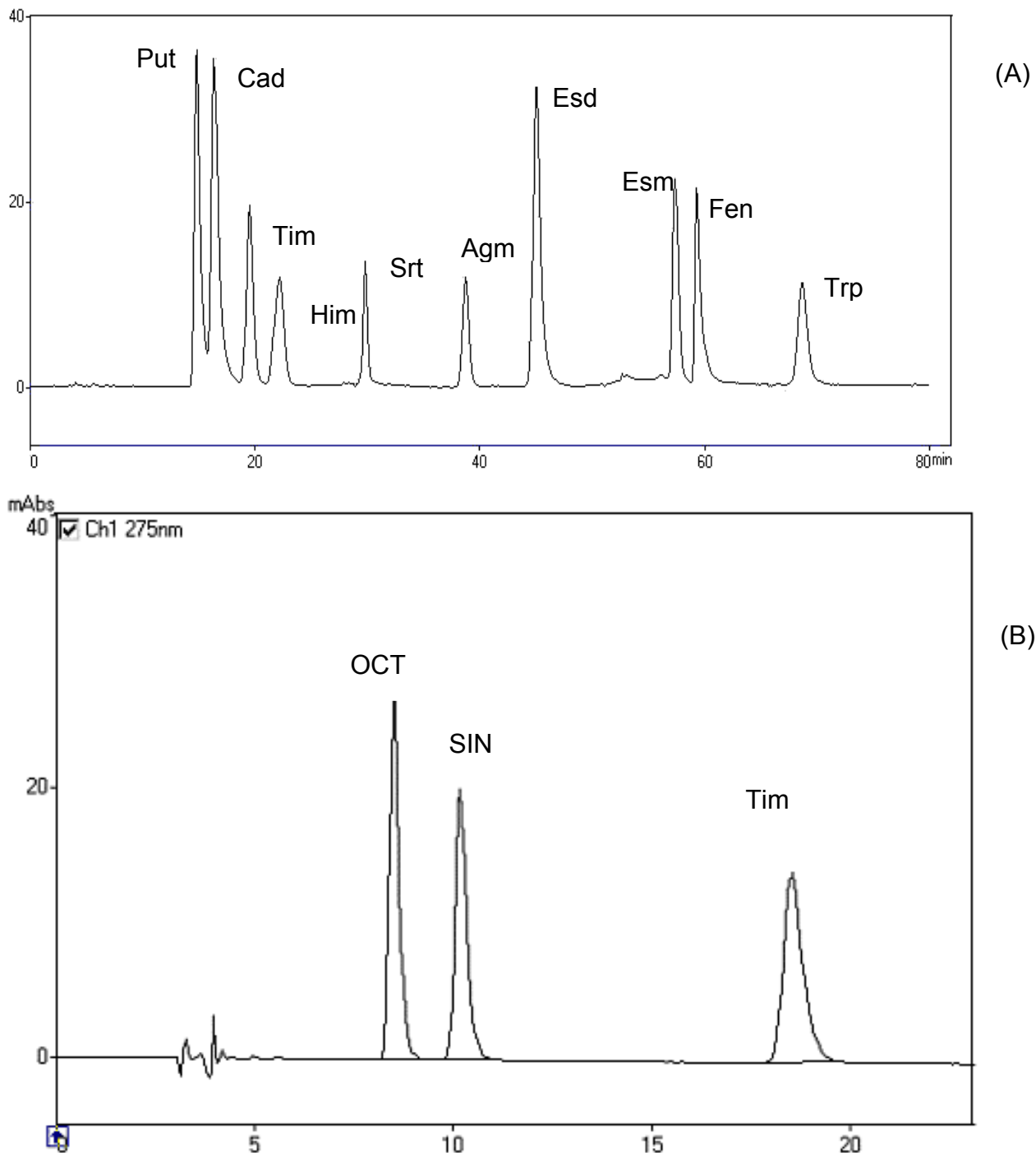


Figura II.2. Cromatograma de aminas bioativas detectadas por CLAE par-iônico (A) detecção fluorimétrica e (B) detecção no UV-VIS (275 nm).

Coluna μ Bondapak C18 (10 μ m, 300 x 3,9 mm), fase móvel – acetato de sódio 0,1 M contendo 10 mM de octanesulfonate de sódio (pH 4.9):acetonitrila. PUT = putrescina, CAD = cadaverina, TIM = tiramina, HIM = histamina, SRT = serotonina, AGM = agmatina, ESD = espermidina, ESM = espermina, FEN = feniletilamina, TRP = triptamina, OCT = octopamina, SIN = sinefrina.

A presença de espermidina era esperada por ser esta a poliamina predominante em tecidos vegetais. O mesmo ocorre para a putrescina que é um intermediário obrigatório na síntese da espermidina (FLORES et al., 1989; BARDOCZ et al., 1993; WALTERS, 2003). A sinefrina foi indicada por WHEATON & STEWART (1965) como sendo típica de plantas cítricas, sendo a tiramina uma precursora desta amina. O fato de não se encontrar octopamina em 100 % das amostras, sugere ser predominante a formação de sinefrina via tiramina.

Com relação às demais aminas detectadas, não foram encontrados dados na literatura consultada. A presença da agmatina, uma amina intermediária na síntese de poliaminas via arginina, pode indicar ser esta uma das possíveis vias de formação das poliaminas na laranja (FLORES et al., 1989; WALTERS, 2003). A histamina pode estar naturalmente presente em tecidos vegetais, a exemplo da berinjela (STARLING, 1998; BOTELHO et al., 2004), exercendo um papel importante de proteção da planta a predadores (FLORES et al., 1989). Pode também ser formada pela atividade descarboxilante do aminoácido histidina por microrganismos contaminantes (GLÓRIA, 2005). A serotonina tem sido encontrada em algumas plantas, dentre elas, banana, abacaxi, pêssigo, abacate, tomate, berinjela, café e nozes (UDENFRIEND et al., 1959; COFFIN, 1969; FLORES et al., 1989; ADÃO & GLÓRIA, 2005). De acordo com FLORES et al. (1989), esta amina também exerce papel importante na proteção de plantas a predadores. Mais estudos são necessários para determinar a origem destas aminas no suco. No caso de não serem inerentes à fruta, estas aminas poderiam ser utilizadas como critério de qualidade, a exemplo do que acontece para outros produtos alimentícios.

Conforme apresentado na Tabela II.1, os teores totais de aminas variaram de 34,9 a 68,9 mg/L para as diferentes marcas de suco disponíveis no mercado consumidor de Belo Horizonte, MG. Entretanto, não foi observada diferença significativa para os teores totais (teste de Tukey, 5% de probabilidade) entre as marcas de suco de laranja.

A contribuição percentual de cada uma das aminas ao teor total para as diferentes marcas de suco está indicada na Figura II.3. Observa-se que, em todas as marcas analisadas, a putrescina foi a amina predominante, contribuindo com percentuais de 51 a 63% (média = 57%), seguida da sinefrina com contribuição de 28 a 38% (média = 32%), e espermidina com contribuição de 4 a 6% (média de 5%). As demais aminas, quando somadas, contribuíram com menos de 2% do teor total de aminas. Uma maior contribuição de putrescina ao teor total de aminas foi também observada por BARDOCZ et al. (1993), OKAMOTO et al. (1997), ELIASSEN et al. (2002) e TASSONI et al. (2004) em amostras de laranja.

Tabela II.1. Teores médios de aminos bioativas em diferentes marcas de suco de laranja

Aminas ¹	Teores médios de aminos ² em mg/L (CV) / Marcas							Média
	A	B	C	D	E	F	G	
EPD	3,44 ^a (14)	1,80 ^b (24)	3,05 ^{a,b} (8)	2,68 ^b (30)	4,22 ^a (11)	2,21 ^b (4)	1,96 ^b (13)	2,77
EPM	0,25 ^{a,b} (18)	0,08 ^b (36)	0,34 ^a (3)	0,13 ^b (14)	0,34 ^{a,b} (5,7)	0,14 ^{a,b} (7)	0,07 ^b (3)	0,16
PUT	43,6 (36)	30,63 (34)	39,0 (20)	31,3 (14)	43,7 (35)	24,1 (47)	22,6 (44)	33,60
AGM	0,02 (33)	0,01 (33)	0,14 (33)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0,02
SIN	16,3 ^{a,b} (11)	21,8 ^a (1)	15,8 ^{a,b} (10)	14,7 ^b (28)	17,9 ^{a,b} (21)	15,5 ^{a,b} (11)	10,1 ^b (13)	16,01
TIM	0,02 (33)	0,02 (33)	0,04 (33)	0,67 (0)	0,51 (0)	0,13 (0)	0,12 (0)	0,21
OCT	0,88 ^b (24)	1,29 ^a (1)	0 ^c (0)	0 ^c (0)	0 ^c (0)	0 ^c (0)	0 ^c (0)	0,31
HIM	0,26 (70)	0,19 (46)	0,07 (45)	0,03 (2,5)	0,1 (60)	0,04 (17)	0,04 (58)	0,38
SRT	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0,48 (33)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0,07
Total	64,8 (25)	55,9 (19)	60,5 (18)	50,0 (5)	66,6 (24)	42,1 (22)	34,9 (24)	53,5 (28)

¹ EPD = espermidina; EPM = espermina; PUT = putrescina; AGM = agmatina; SIN = sinefrina; TIM = tiramina; OCT = octopamina; CAD = cadaverina; HIM = histamina; SRT = serotonina.

² Valores médios com uma mesma letra em uma linha não diferem significativamente (teste de Tukey, $p < 0,05$).

Foi observada grande variação nos teores de aminos em diferentes lotes de uma mesma marca de suco de laranja. Com relação aos teores de aminos encontrados nas amostras de diferentes marcas de suco de laranja (Tabela II.1), observa-se que a putrescina foi encontrada em maiores concentrações (média = 33,60 mg/L), seguida da sinefrina (média = 16,01 mg/L) e da espermidina (média = 2,77 mg/L). As demais aminos estavam presentes em concentrações inferiores a 1,0 mg/L.

Ao comparar os teores de aminos detectados em sucos de diferentes marcas, observou-se diferença significativa nos teores de espermidina, espermina, sinefrina e octopamina. A presença de agmatina em teores detectáveis foi observada apenas em amostras das marcas A, B e C; octopamina nas marcas A e B e serotonina foi encontrada apenas em amostras da marca D.

Os teores de putrescina, espermidina e espermina encontrados neste estudo são menores que aqueles relatados por BARDOCZ et al. (1993), OKAMOTO et al. (1997) e ELIASSEN et al. (2002) para laranja. Entretanto, detalhes não foram apresentados com relação ao preparo e concentração das amostras. Os teores de sinefrina encontrados foram semelhantes aos observados por STEWART & WHEATON (1964) para laranjas

das variedades Hamlin, Parson Brown, Pineapple, Valencia, Pope, Navel e Temple, porém inferiores aos da laranja Murcott. Com relação aos teores de octopamina e tiramina, a metodologia utilizada neste estudo foi mais sensível que a de WHEATON & STEWART (1965), cujo limite de detecção era 1 mg/L.

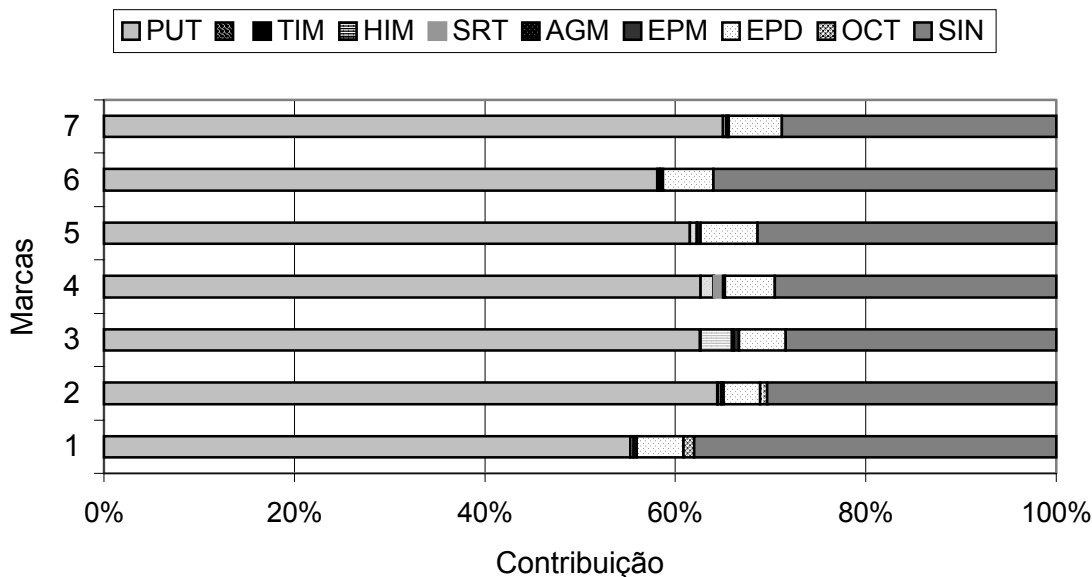


Figura II.3. Contribuição percentual de cada amina ao teor total em diferentes marcas de suco de laranja (EPD = espermidina; EPM = espermina; PUT = putrescina; AGM = agmatina; SIN = sinefrina; TIM = tiramina; OCT = octopamina; HIM = histamina; SRT = serotonina).

3.2. Características físico-químicas do suco de laranja

Os resultados obtidos com relação aos parâmetros físico-químicos para o suco de laranja estão apresentados na Tabela II.2. Observou-se baixos coeficientes de variação (< 13%) para os parâmetros físico-químicos em diferentes lotes de uma mesma marca, sugerindo que as indústrias de suco de laranja padronizam a qualidade em relação a estes parâmetros. Os valores de pH, acidez total e ratio (°Brix/acidez) variaram significativamente entre as marcas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Valores de pH significativamente mais elevados foram observados nas amostras das marcas A, C, D e E, e de acidez para as marcas A, B, C e E. Com relação ao ratio, as amostras D, F e G apresentaram valores significativamente maiores. Os teores de sólidos solúveis totais variaram de 10,44 a 11,10 °Brix, entretanto não foi encontrada diferença significativa entre as marcas. Os teores de açúcares totais variaram de 8,1 a 10,4 g/100 g. O ratio foi o parâmetro que mais variou entre as marcas analisadas, sendo os maiores valores

encontrados nas marcas D, F e G. Não foi encontrada diferença significativa com relação ao teor de sólidos solúveis ($^{\circ}$ Brix), açúcares totais e densidade ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Tabela II.2. Características físico-químicas de amostras de diferentes marcas de suco de laranja

Parâmetros	Valores médios* (CV) / Marcas							Média
	A	B	C	D	E	F	G	
pH	3,84 ^a (3)	3,50 ^{bc} (2)	3,84 ^a (1)	3,79 ^a (1)	3,84 ^a (1)	3,44 ^c (3)	3,43 ^c (3)	3,67 (5)
$^{\circ}$ Brix	11,0 (7)	10,5 (1)	11,1 (5)	11,0 (3)	10,6 (2)	10,5 (2)	10,4 (2)	10,73 (4)
Acidez total (g/100 mL)	0,85^a (5)	0,73^b (3)	0,73^c (2)	0,61^c (13)	0,75^{ab} (2)	0,65^{bc} (2)	0,63^{bc} (4)	0,71 (12)
Brix/Acidez ($^{\circ}$ Brix/g/100 mL)	12,91 ^b (3)	14,36 ^b (3)	15,15 ^{ab} (7)	18,25 ^a (14)	14,02 ^b (3)	16,02 ^{ab} (2)	16,48 ^a (6)	15,31 (13)
Densidade (g/mL)	1,047 (0)	1,046 (0)	1,045 (0)	1,046 (0)	1,046 (0)	1,044 (0)	1,044 (0)	1,045 (0)
Açúcares totais (g/100 g)	10,1 (3)	-	-	10,4 (1)	8,1 (2)	-	-	9,5 (13)

*Valores médios com a mesma letra em uma linha não diferem significativamente (teste de Tukey, $p < 0,05$).
- Amostras perdidas.

Todas as marcas de suco de laranja incluídas neste estudo estão de acordo com a legislação brasileira que estabelece teor de sólidos solúveis de, no mínimo, 10,5 $^{\circ}$ Brix a 20 $^{\circ}$ C e relação sólidos solúveis/acidez de, no mínimo, 7,0 $^{\circ}$ Brix/g/100 mL de ácido cítrico anidro e teores de açúcares totais de, no máximo, 13,0 g/100 g.

O estudo da correlação de Pearson entre os teores de aminas bioativas e os parâmetros físico-químicos indicou valores significativos conforme indicado na Tabela II.3.

Tabela II.3. Correlação significativa em nível de 99% de probabilidade entre os teores de aminas bioativas e os parâmetros físico-químicos no suco de laranja

Parâmetros	Coefficiente de Correlação
Histamina x agmatina	0,9975
Sinefrina x total de aminas	0,9153
Putrescina x pH	0,8906
Serotonina x densidade	0,8209
Sinefrina x acidez total	0,8333

A amina que mais afetou o teor de aminas total foi a sinefrina. A formação de algumas aminas parece ser afetada pelos mesmos parâmetros, dentre elas, histamina e agmatina. Encontrou-se correlação significativa entre o pH do suco e o teor de

putrescina, e entre a acidez do suco e o teor de sinefrina. Estudos de forma a esclarecer as correlações observadas seriam necessários para se otimizar os teores de aminos nos sucos de laranja.

3.3. Perfil e teores de aminos bioativas em refrigerante de laranja

Com relação às amostras de refrigerante de laranja, foram detectadas apenas cinco aminos, dentre elas, espermidina, espermina, putrescina, sinefrina e histamina (Figura II.4).

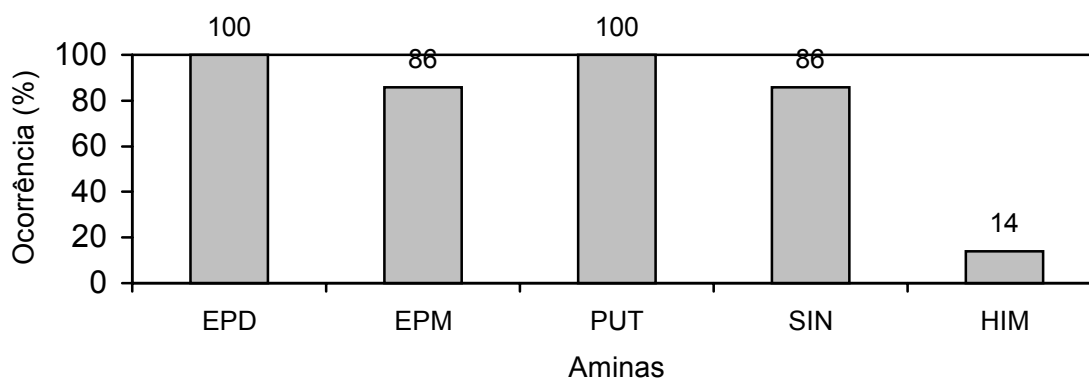


Figura II.4. Ocorrência de aminos bioativas em amostras de refrigerantes de laranja (EPD = espermidina, EPM = espermina, PUT = putrescina, SIN = sinefrina, HIM = histamina).

Espermidina e putrescina foram encontradas em 100% das amostras analisadas, espermina e sinefrina em 86% e histamina em 14%. Estas cinco aminos estavam presentes em 100% das amostras de suco analisadas. Possivelmente, algumas aminos não foram detectadas nas amostras de refrigerante em função do percentual de suco adicionado, o que causaria uma diluição de 10%.

Os teores totais de aminos nos refrigerantes variaram de 0,80 mg/L na marca J a 7,53 mg/L na marca M (Tabela II.4). A contribuição de cada uma das aminos ao teor total de cada marca de refrigerante de laranja está indicado na Figura II.5. Observa-se que, de um modo geral, a putrescina foi a amina predominante, contribuindo com 57 a 93% (média = 70%) dos teores totais, seguida da sinefrina contribuindo com 0 a 42% (média = 25%), espermidina com 1 a 5% (média = 3%), espermina com 0 a 4% (média = 1%) e histamina com 0 a 1 (média = 0,2%) dos teores totais.

Tabela II.4. Teores médios de aminas bioativas em amostras de diferentes marcas de refrigerantes de laranja

Aminas ¹	Teores médios de aminas ² em mg/L (CV) / Marcas							Média
	H	I	J	K	L	M	N	
EPD	0,21 ^b (14)	0,19 ^b (32)	0,01 ^c (5)	0,09 ^c (56)	0,09 ^c (52)	0,32 ^a (3)	0,02 ^c (13)	0,13
EPM	0,04 ^b (6)	0,25 ^a (44)	0,01 ^b (56)	0,02 ^b (34)	0,03 ^b (31)	0,02 ^b (29)	0,00 ^b (0)	0,05
PUT	4,12 ^a (24)	3,64 ^a (30)	0,69 ^b (18)	1,20 ^b (57)	1,69 ^b (6)	5,14 ^a (20)	1,12 ^b (9)	2,54
SIN	2,31 ^a (6,5)	2,11 ^a (8,7)	0,31 ^{bc} (0)	0,94 ^{cd} (22)	0,00 ^c (0)	2,05 ^a (13)	0,84 ^d (17)	1,12
HIM	0,00 (0)	0,00 (0)	0,03 (34)	0,00 (0)	0,00 (0)	0,00 (0)	0,00 (0)	0,00
Total	6,67 ^a (13)	6,19 ^a (21)	0,80 ^b (18)	1,67 ^b (71)	1,90 ^b (3)	7,53 ^a (16)	1,98 ^b (2)	3,85

¹ EPD = espermidina; EPM = espermina; PUT = putrescina; SIN = sinefrina; HIM = histamina.

² Valores médios com a mesma letra em uma linha não diferem significativamente (teste de Tukey, $p < 0,05$).

Foi observada grande variação nos teores de aminas em amostras de diferentes lotes de uma mesma marca ($CV < 57$). Houve diferença significativa nos teores de putrescina, espermidina, espermina e sinefrina entre as diferentes marcas analisadas. Teores significativamente maiores de putrescina foram encontrados nas marcas H, I e M; de espermidina na marca M; de espermina na marca I; e de sinefrina nas marcas H, I e M. Não foram encontrados dados na literatura consultada quanto aos teores de aminas em refrigerantes de laranja.

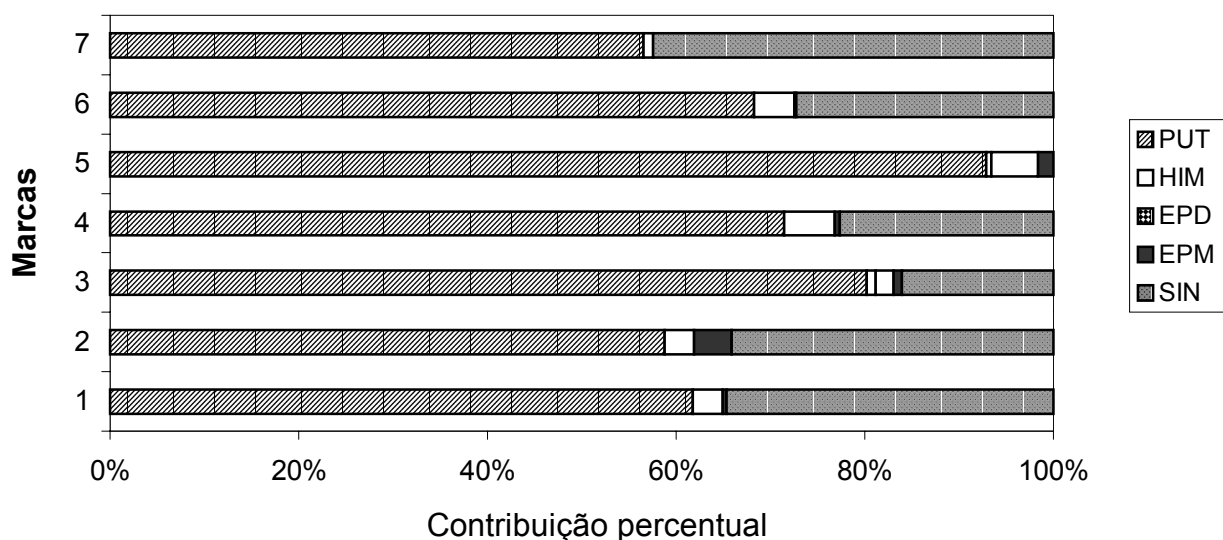


Figura II.5. Contribuição percentual de cada amina ao teor total de aminas em diferentes marcas de refrigerante de laranja.

Os teores de putrescina encontrados nas amostras de refrigerante, corresponderam a 2,6 a 15,4% do teor médio encontrado em sucos de laranja; a espermidina correspondeu a 0,7 a 11,5%; a espermina de 6,3 a 156%; a sinefrina de 0 a 12,4% e a histamina de 0 a 2,6%. Se o suco de laranja for a única fonte de aminos bioativas em refrigerantes de laranja, seria esperado encontrar 10% de cada uma, considerando-se que 10% de suco deve ser adicionado ao refrigerante de laranja. Os teores de espermina encontrados no refrigerante de laranja foram maiores do que aqueles encontrados no suco, portanto deve haver uma outra fonte desta poliamina no refrigerante. Os teores de putrescina, espermidina e sinefrina no refrigerante de laranja variaram de 0 a 15% dos teores encontrados no suco. Estes resultados sugerem que a adição do suco no refrigerante de laranja esteja ocorrendo em níveis menores do que os estipulados pela legislação. Entretanto, estudos são necessários para investigar a veracidade desta hipótese.

3.4. Características físico-químicas

Os resultados obtidos para as amostras analisadas com relação aos parâmetros físico-químicos estão apresentados na Tabela II.5. Os resultados obtidos estão de acordo com a legislação vigente, que estipula uma acidez titulável de 0,1 g/100 mL em ácido cítrico (BRASIL, 1997). Observou-se baixos coeficientes de variação ($CV < 32$) entre lotes de uma mesma marca, sugerindo que as indústrias de refrigerante de laranja padronizam a qualidade em relação a estes parâmetros.

Tabela II.5. Características físico-químicas de amostras de diferentes marcas de refrigerante de laranja

Parâmetros	Valores médios (CV) / Marca							Média
	H	I	J	K	L	M	N	
pH	3,75 ^a (0,5)	3,62 ^b (1,3)	3,35 ^d (0,7)	3,18 ^e (2,8)	3,49 ^c (0,8)	3,77 ^a (3,4)	3,32 ^d (0,4)	3,49
° Brix	11,96 ^a (1,0)	12,17 ^a (1,9)	11,10 ^c (2,0)	11,24 ^c (1,5)	0,74 ^d (0,0)	11,66 ^b (0,8)	11,74 ^{ab} (1,3)	9,88
Acidez total (g/100 mL)	0,18 ^b (4)	0,19 ^{ab} (3,3)	0,15 ^c (4,8)	0,21 ^a (5,1)	0,14 ^c (12,7)	0,19 ^b (1,3)	0,21 ^a (1,5)	0,18
Densidade (g/mL)	1,049 ^a (0,1)	1,049 ^a (0,1)	1,044 ^b (0,1)	1,043 ^b (0,1)	1,003 ^d (0,0)	1,050 ^a (0,1)	1,044 ^{bc} (0,1)	1,040
Açúcares totais (g/100 mL)	10,5 ^c (6,0)	11,0 ^{bc} (5,0)	14,7 ^{bc} (20)	12,9 ^c (14)	0,31 ^d (32)	18,2 ^b (14)	32,0 ^a (11)	11,6

*Valores médios com a mesma letra em uma linha não diferem significativamente (teste de Tukey, $p < 0,05$).

Foi observada diferença significativa entre marcas com relação a todos os parâmetros analisados. Maiores valores de pH foram observados nas amostras das marcas H e M; os teores mais elevados de sólidos solúveis foram os das marcas H e I; as marcas I, K e N apresentaram os maiores teores de acidez total; as marcas H, I e M apresentaram maior densidade; e a amostra N apresentou os maiores teores de açúcares totais. A marca L apresentou um baixo valor de grau brix, 0,74, provavelmente por ter sido adicionada de adoçantes artificiais, mesma razão pela qual foi encontrado um baixo teor de açúcares totais, conforme descrito no rótulo.

Estudo de correlação de Pearson entre os teores de aminos e as características físico-químicas das amostras de refrigerante de laranja indicou as correlações significativas (Tabela II.6). Houve correlação positiva entre espermidina e putrescina e entre sinefrina e putrescina. Estes resultados sugerem que fatores similares afetam a formação destas aminos. Foi também observado que a densidade correlacionou de forma significativa com os teores de sinefrina e de putrescina.

Tabela II.6. Correlação significativa em nível de 99% de probabilidade entre os teores de aminos bioativas e os parâmetros físico-químicos no refrigerante de laranja

Parâmetros correlacionados	Coefficiente de Correlação
Espermidina x putrescina	0,9752
Putrescina x densidade	0,9100
Sinefrina x putrescina	0,8985

4. CONCLUSÃO

Foram detectadas nove aminos em sucos de laranja, seis das quais já haviam sido relatadas na literatura (espermidina, espermina, putrescina, sinefrina, tiramina, octopamina) e três que foram relatadas pela primeira vez (agmatina, histamina, e serotonina). A putrescina foi a amina predominante, seguida da sinefrina e da espermidina. Todas as marcas avaliadas atenderam à legislação vigente com relação aos parâmetros físico-químicos. Diferenças significativas entre amostras de diferentes marcas foram observadas para os teores de espermidina, espermina, sinefrina e octopamina e quanto ao pH, densidade e relação Brix/Acidez. Foi observada correlação significativa entre alguns parâmetros: pH, densidade e acidez correlacionaram de forma positiva com os teores de putrescina, serotonina e sinefrina, respectivamente. Houve

correlação positiva significativa entre os teores de histamina e agmatina e entre sinefrina e os teores totais de aminas.

O perfil e teores de aminas bioativas em refrigerantes de laranja foram investigados pela primeira vez. Cinco aminas foram detectadas, sendo predominante a putrescina, seguida da sinefrina, espermidina, espermina e histamina. Todas as amostras analisadas atenderam à legislação vigente. Houve diferença significativa entre marcas com relação aos teores de todas as aminas, exceto histamina e com relação aos parâmetros físico-químicos. Houve correlação positiva significativa entre a densidade e os teores de sinefrina e putrescina e entre espermidina e sinefrina e a putrescina.

Os teores médios de aminas encontrados nas amostras de refrigerante, corresponderam a 5,0%; 31,0%; 7,6%; e 6,6% dos teores médios de espermidina, espermina, putrescina e sinefrina, respectivamente, encontrados no suco de laranja. Levando-se em consideração que 10% de suco deve ser adicionado ao refrigerante de laranja, esperava-se encontrar percentuais próximos a 10% para cada uma das aminas, especialmente para a sinefrina que é uma amina restrita a plantas cítricas. Estudos são necessários para verificar quais ingredientes do refrigerante poderiam ser fontes de aminas e, ainda, qual seria a influência de outros fatores como por exemplo, processamento, época de colheita da laranja nos teores de aminas em suco de laranja utilizado para a produção de refrigerantes.

CAPÍTULO III. INFLUÊNCIA DO PROCESSAMENTO NOS TEORES DE AMINAS BIOATIVAS E DE PROLINA E NAS CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DE SUCO DE LARANJA CONCENTRADO

RESUMO

Amostras foram coletadas em sete diferentes pontos da linha de produção de suco concentrado em uma indústria processadora em três dias, não consecutivos, e analisadas quanto ao teor de sólidos solúveis, pH, acidez, densidade, teores de açúcares redutores e não redutores e totais, teores de 12 aminos bioativas, e de prolina. O pH variou de 1,64 a 4,40, a acidez de 0,873 a 0,918 g ácido cítrico/100 mL, densidade de 1,0378 a 1,0970 g/mL e açúcares totais de 39,06 a 50,75 g/L. Dentre estes parâmetros, apenas o pH, a densidade e os teores de açúcares apresentaram diferenças significativas. Não foi observada variação nos teores de prolina. Dentre as 12 aminos pesquisadas, apenas putrescina, espermidina, e sinefrina foram encontradas no suco de laranja, em todas as etapas do processo de produção. Os teores totais das aminos variaram de 106,1 a 153,0 mg/L. Diferença significativa foi observada apenas para a espermidina. Observou-se que durante a etapa de re-incorporação de aroma, houve uma re-incorporação de substâncias ou características que haviam sido alteradas durante o processamento. Foi encontrada uma correlação positiva entre os teores de putrescina e aminos totais.

Palavras-chaves: aminos bioativas, cromatografia líquida, prolina, processamento, suco de laranja.

1. OBJETIVO

Este trabalho teve como objetivo geral avaliar a influência do processamento nos teores de aminos bioativas e de prolina em suco de laranja concentrado, obtido com as variedades brasileiras. O objetivo específico foi verificar a influência das diferentes etapas do processo de produção de suco de laranja concentrado, (i) nas características físico químicas do suco; (ii) nos teores de 12 aminos bioativas (agmatina, cadaverina, histamina, putrescina, serotonina, espermina, espermidina, tiramina, feniletilamina, triptamina, octopamina e sinefrina); e (iii) nos teores de prolina.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material

Amostras de suco de laranja foram coletadas em sete diferentes pontos da linha de produção de uma indústria processadora no estado de São Paulo (SP) durante três dias, não consecutivos, no mês de outubro de 2004, totalizando 21 amostras. Os pontos nos quais foram feitas as coletas foram: após a extração (extrato original), após a filtração, após a centrifugação, no início, meio e final do processo de evaporação, e após a correção do teor de sólidos e adição dos compostos voláteis (aroma) perdidos durante o processo. Estes pontos estão indicados na Figura III.1 que apresenta o fluxograma usado pela indústria.

As amostras foram analisadas quanto ao conteúdo de sólidos solúveis (°Brix) e foram diluídas antes das demais análises para se obter um mesmo valor de °Brix ao longo do processamento equivalente ao de suco integral (10,5 °Brix) de forma a permitir a comparação sem a influência da concentração.

2.2. Métodos de análise

Potencial hidrogeniônico. O valor do pH nas amostras de suco de laranja com °Brix padronizado para 10,5 foi determinado em potenciômetro da marca Digimed modelo DM-20, após calibração do instrumento com soluções padrão pH 4,0 e 7,0 (BRASIL, 2005).

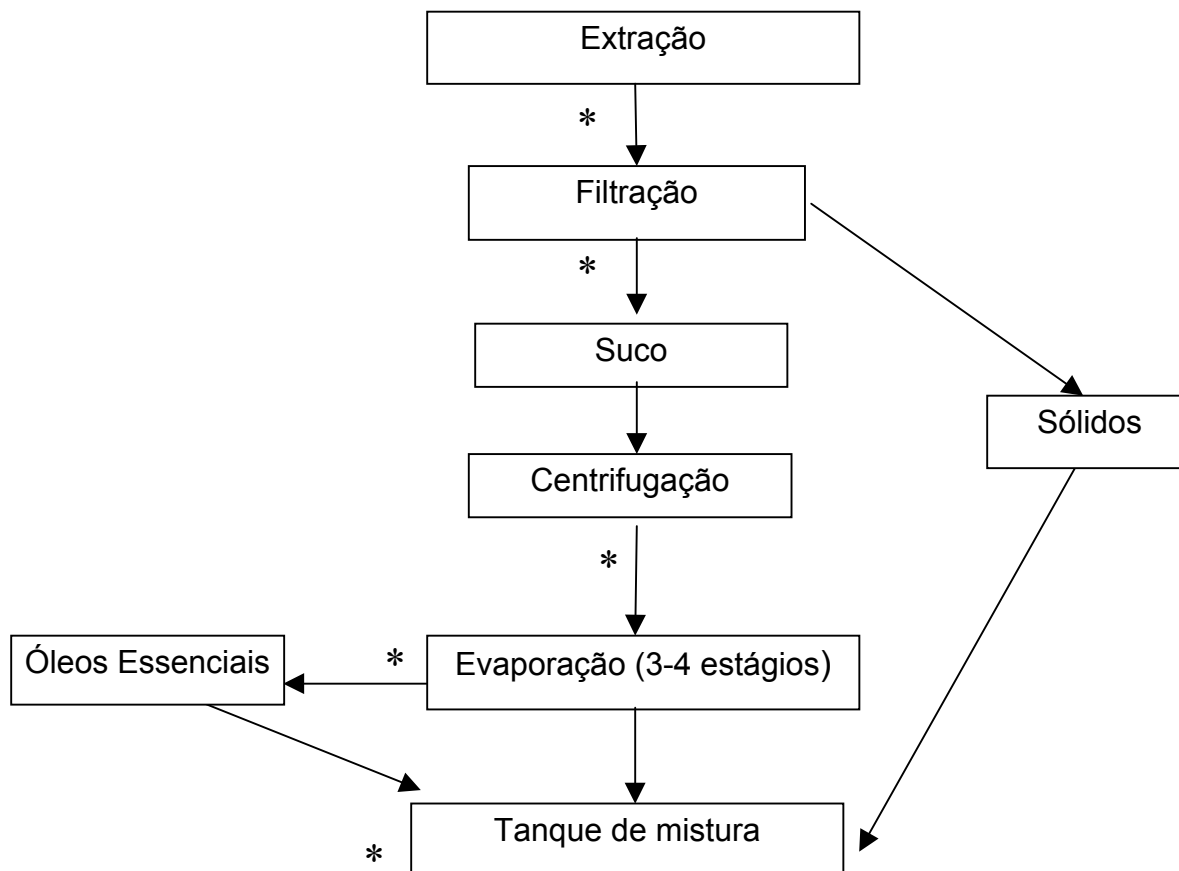


Figura III.1. Fluxograma da produção de suco concentrado de laranja indicando os pontos nos quais foram feitas coletas de amostras.

Acidez total titulável. A acidez total nas amostras de suco de laranja com °Brix padronizado para 10,5 foi determinada por titulação com solução de NaOH 0,1 M utilizando fenolftaleína como indicador, segundo a metodologia do Ministério da Agricultura (BRASIL, 2005).

Densidade relativa. A densidade nas amostras de suco de laranja com °Brix padronizado para 10,5 foi determinada em picnômetro de vidro, sendo calculada pela razão entre a diferença do peso do picnômetro com amostra e picnômetro vazio e a diferença entre picnômetro com água destilada e picnômetro vazio, a 20 °C (BRASIL, 2005).

Açúcares redutores, não redutores e totais. Os açúcares redutores e não-redutores nas amostras de suco de laranja com °Brix padronizado para 10,5 foram calculados a

partir da titulação, com solução de glicose 0,5%, da amostra contendo as soluções de Fehling A e B, segundo metodologia do Ministério da Agricultura (BRASIL, 2005). Os açúcares totais foram calculados pela soma dos açúcares redutores com os não redutores.

Prolina. Para obtenção da curva padrão, foram preparadas soluções de prolina nas concentrações de 5, 10, 25, 40 e 50 mg/L. Foi pipetado 1 mL destas soluções em tubos de ensaio, adicionados 1 mL de ácido fórmico e 2 mL de solução de ninidrina. Após adição de cada reagente, os tubos foram homogeneizados e levados ao banho-maria em ebulição por 15 minutos. Os tubos foram resfriados por 5 a 10 minutos em água a 20 °C e adicionados de 10 mL de acetato de n-butila em cada tubo. Estes foram tampados e agitados vigorosamente, até que a coloração passasse para a fase orgânica. A solução foi filtrada em papel de filtro contendo uma ponta de espátula de sulfato de sódio anidro. A leitura do filtrado (fase orgânica) foi feita utilizando cubeta de 10 mm em comprimento de onda de 509 nm contra o branco.

O branco foi preparado da seguinte maneira: 1,0 mL da solução da amostra diluída, mas usando o etilenoglicol monometil éter no lugar da solução de ninidrina. Todas as outras condições foram mantidas.

Com os valores das absorvâncias obtidas e as concentrações de prolina (mg/L), foi traçada a curva padrão, sendo a absorvância plotada na ordenada e as concentrações de prolina na abscissa (BRASIL, 2005).

As amostras de suco com °Brix padronizado para 10,5 foram diluídas pipetando-se 10 mL da amostra em um balão de 200 mL e completando-se o volume com água destilada. Em seguida, 1,0 mL da amostra diluída foi pipetada para um tubo de ensaio e procedeu-se da mesma forma que os padrões. As análises foram realizadas em duplicata.

Aminas bioativas. As aminas agmatina, cadaverina, histamina, putrescina, serotonina, espermina, espermidina, tiramina, feniletilamina e triptamina foram determinadas por CLAE par-iônico, derivação pós-coluna com o-ftalaldeído e detecção fluorimétrica (VALE & GLÓRIA, 1997).

Foram determinadas também as aminas octopamina e sinefrina conforme metodologia descrita no capítulo I.

2.3. Análise estatística

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Foi utilizado o programa SPSS 12.0.1 versão windows (Chicago, Illinois, USA). A existência de uma correlação significativa entre os teores de amins, prolina e as características físico-químicas foram determinadas através da correlação de Pearson ao nível de 5% de probabilidade (SAMPAIO, 1998).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Características físico-químicas do suco de laranja

Como era de se esperar, houve uma alteração significativa nos sólidos solúveis do suco de laranja durante a produção do suco concentrado (Figura III.2). Logo após a extração, o suco apresentou 10,4 °Brix, o que está de acordo com dados descritos na literatura (RUSCHEL et al., 2001; CORRÊA NETO & FARIA, 2003). Após a centrifugação houve uma redução no teor de sólidos solúveis, provavelmente devido às células (partículas) que ficaram retidas, pois foi observado que durante o processo de coleta das amostras, após a etapa de extração, o suco apresentou um grande número de partículas (células), mas parte destas ficaram retidas na etapa de filtração ou foram rompidas durante a centrifugação. O maior aumento no teor de sólidos ocorreu durante a evaporação. Na medida em que se iniciou o processo de evaporação, o teor de sólidos aumentou gradativamente até atingir 68,4 °Brix (concentração esta em níveis mais elevados que os desejados para o produto final). Após a re-incorporação do aroma, o teor de sólidos solúveis foi corrigido (através de adição de água) para cerca de 65 °Brix que é o teor utilizado para comercialização do suco concentrado, inclusive para exportação (VARNAN & SUTHERLAND, 1997). Nesta concentração, a tendência de clarificação ou formação de géis durante o armazenamento é menor, assim como a estabilidade do flavor é melhor do que o suco produzido com outras concentrações do teor de sólidos (VELDHUIS, 1961).

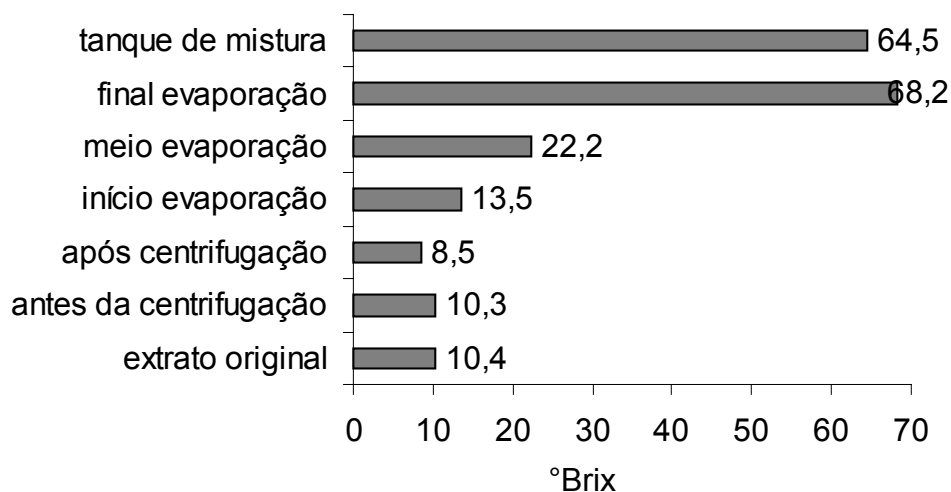


Figura III.2. Sólidos solúveis (expressos em °Brix) de amostras coletadas durante diferentes etapas do processamento de suco de laranja concentrado.

Os resultados obtidos para o suco de laranja com relação aos parâmetros físico-químicos estão apresentados nas Tabelas III.1 e III.2.

Tabela III.1. Valores de pH, acidez, ratio e densidade de suco de laranja em diferentes etapas de seu processo de fabricação

Etapa do processamento	Valores			
	pH	Acidez (g/100 mL)	Ratio °Brix/acidez	Densidade (g/L)
Extrato original	3,69 ^b (0,116)	0,905 (0,016)	11,60 (0,204)	1,0454 ^c (0,002)
Após filtração	3,65 ^b (0,168)	0,918 (0,051)	11,46 (0,642)	1,0467 ^c (0,001)
Após centrifugação	4,40 ^a (0,458)	0,882 (0,016)	11,91 (0,219)	1,0378 ^d (0,003)
Início evaporação	2,69 ^c (0,110)	0,873 (0,019)	12,03 (0,259)	1,0592 ^b (0,002)
Meio evaporação	1,64 ^d (0,082)	0,878 (0,007)	11,96 (0,095)	1,0970 ^a (0,004)
Final evaporação	3,55 ^b (0,086)	0,904 (0,032)	11,63 (0,415)	1,0473 ^c (0,002)
Após re-incorporação do aroma	3,58 ^b (0,056)	0,897 (0,017)	11,70 (0,217)	1,0466 ^c (0,001)

Amostras padronizadas para 10,5°Brix. Valores médios (\pm desvio padrão) com letras diferentes em uma mesma coluna são significativamente diferentes pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Foram encontradas diferenças significativas ao nível de 5% de probabilidade durante as etapas de obtenção do suco de laranja concentrado com relação ao pH,

densidade e teores de açúcares. As alterações no pH podem ter ocorrido pela volatilização de ácidos orgânicos de baixo peso molecular durante a evaporação. Entretanto os valores encontrados no suco concentrado estão de acordo com os obtidos por VELDHUIS (1961) em variedades americanas de laranja utilizadas para suco.

Tabela III.2. Teores de açúcares redutores, não redutores e totais de suco de laranja em diferentes etapas de seu processo de fabricação

Etapa do processamento	Teores de açúcares (g/L)		
	redutores	não redutores	totais
Extrato original	41,74 ^a (4,45)	36,87 ^a (5,17)	78,61 ^a (8,97)
Após filtração	45,74 ^a (5,71)	30,76 ^b (2,05)	76,50 ^a (7,60)
Após centrifugação	42,49 ^a (1,93)	22,94 ^b (4,87)	65,42 ^b (4,18)
Início evaporação	37,17 ^b (1,42)	39,12 ^a (2,48)	76,29 ^a (2,65)
Meio evaporação	37,04 ^b (2,74)	42,83 ^a (5,40)	79,87 ^a (7,98)
Final evaporação	46,65 ^a (3,84)	23,79 ^b (4,19)	70,44 ^{a,b} (1,47)
Após re-incorporação do aroma	44,05 ^a (4,22)	26,14 ^b (5,65)	70,19 ^{a,b} (3,58)

Amostras padronizadas para 10,5°Brix. Valores médios (\pm desvio padrão) com letras diferentes em uma mesma coluna são significativamente diferentes pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Com relação à densidade, esta diferença pode também ser devido às partículas de suco que ficaram retidas no processo de filtração ou foram rompidas durante a centrifugação. Apesar da alteração na densidade durante o processo, esta não foi significativa quando se comparou a densidade no início e no final do processo (quando o suco concentrado foi novamente diluído). Os valores encontrados estão próximos aos obtidos por RUSCHEL et al. (2001) em sucos de laranja não pasteurizados.

Houve diferença significativa nos teores de açúcares durante o processamento. Esta diferença pode ser possivelmente atribuída à reações de escurecimento (Maillard). A oxidação do ácido ascórbico fornece compostos carbonílicos que subsequente reagem com aminogrupos formando pigmentos escuros (GRAUMLICH et al., 1986). Os teores de açúcares, tanto os redutores, não-redutores e totais, encontram-se próximos aos encontrados por VELDHUIS (1961) em diferentes variedades de laranja cultivadas nos Estados Unidos para a produção de suco.

3.2. Aminas bioativas

Dentre as doze aminas pesquisadas, foram encontradas apenas três aminas nas amostras de suco de laranja: putrescina, espermidina e sinefrina (tabela III.3). Estas estavam presentes nas amostras em todas as etapas do processo de produção do suco concentrado investigadas.

Observa-se que apesar da variação nos teores destas aminas, diferença significativa só foi encontrada para a espermidina. Houve uma diminuição significativa no teor desta amina logo após a concentração, entretanto, a concentração inicial foi retomada após a incorporação do aroma. Estes resultados sugerem a incorporação da espermidina ao se adicionar o aroma.

Apesar dos teores de putrescina variarem de 72,4 mg/L a 117,4 mg/L, esta diferença não foi significativa ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey. Interessante observar que após a re-incorporação do aroma, houve um aumento no teor de putrescina, sugerindo que o aroma adicionado seria uma fonte significativa desta amina.

Tabela III.3. Teores médios de aminas bioativas em amostras de suco de laranja coletados em sete diferentes pontos da linha de produção de uma indústria processadora

Etapa	Teor de aminas (mg/L)			
	Putrescina	Sinefrina	Espermidina	Total
Extrato original	97,6 (7,45)	24,7 (9,14)	3,6 ^a (0,18)	125,9 ^a (14,41)
Após filtração	100,4 (22,36)	29,6 (3,13)	5,0 ^a (0,83)	135,0 ^a (24,02)
Após centrifugação	86,9 (20,40)	26,3 (2,77)	4,0 ^a (1,40)	117,2 ^b (23,13)
Início evaporação	91,5 (28,12)	33,5 (1,97)	4,7 ^a (1,93)	129,7 ^a (28,04)
Meio evaporação	72,4 (10,69)	30,2 (2,31)	3,6 ^a (0,24)	106,1 ^a (13,08)
Final evaporação	80,7 (14,74)	31,7 (0,10)	3,7 ^b (1,00)	116,1 ^{a,b} (15,76)
Após re-incorporação do aroma	117,4 (36,75)	30,1 (0,90)	5,5 ^a (2,42)	153,0 ^{a,b} (38,41)

Valores médios (\pm desvio padrão) em uma mesma coluna com letras diferentes são diferentes pelo teste de Tukey $p \leq 0,05$.

Apesar dos teores de sinefrina variarem de 24,7 mg/L a 33,5 mg/L, a diferença não foi significativa, conforme pode ser observado na Figura III.3.

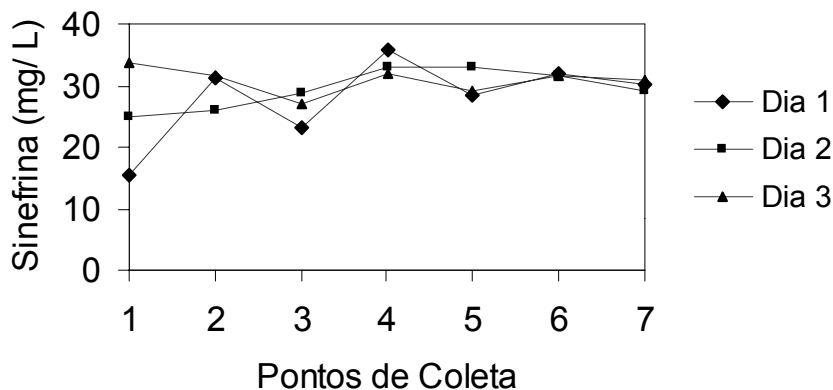


Figura III.3. Variação nos teores de sinefrina durante o processamento de laranja para obtenção de suco concentrado. 1= extrato original, 2= após filtração, 3 = após centrifugação, 4 = início evaporação, 5 = meio evaporação, 6 = final evaporação, 7 = após correção sólidos.

3.3. Teores de prolina

A prolina foi detectada em todas as amostras de suco de laranja analisadas, sendo que seus teores médios variaram de 1241,06 mg/L a 1793,90 mg/L, com coeficientes de variação de 7,49 a 22,56. Entretanto, não foi encontrada diferença significativa ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey (Figura III.4).

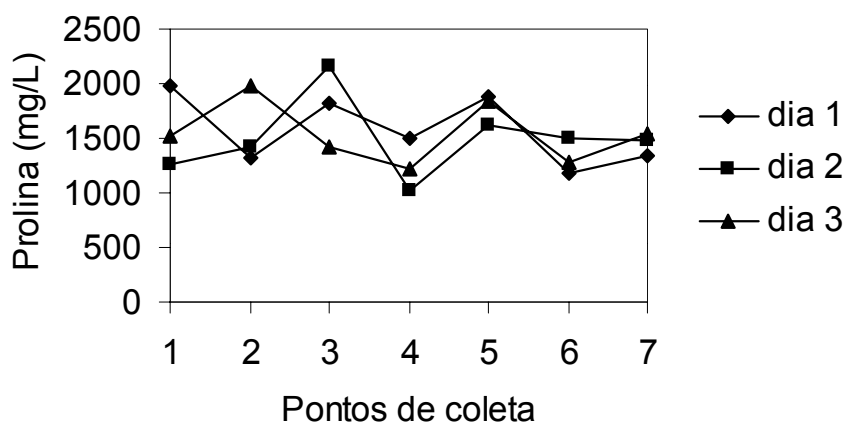


Figura III.4. Variação nos teores de prolina durante o processamento de laranja para obtenção de suco concentrado. 1= extrato original, 2= após filtração, 3 = após centrifugação, 4 = início evaporação, 5 = meio evaporação, 6 = final evaporação, 7 = após correção sólidos.

O estudo da correlação de Pearson entre os teores de aminos bioativas, prolina e as características físico-químicos indicou as correlações significativas descritas na Tabela

III.4, dentre elas correlação negativa entre pH e densidade e entre acidez e ratio e positiva entre putrescina e aminas totais.

Tabela III.4. Correlação significativa em nível de 99% de probabilidade entre os teores de aminas bioativas e os parâmetros físico-químicos em suco de laranja

Parâmetros correlacionados	Coefficiente de Correlação
pH x densidade	-0,96225
Acidez x ratio	-0,99912
Putrescina x aminas totais	0,9754

Durante a evaporação o produto chega a temperaturas em torno de 90°C. Os resultados sugerem que tanto a sinefrina quanto a prolina foram resistentes ao tratamento térmico empregado.

4. CONCLUSÃO

Os teores de sólidos solúveis das amostras de suco de laranja variaram significativamente durante o processamento, aumentando de 10,4 a 68,4 °Brix na etapa final da concentração, diminuindo para 65 °Brix após a incorporação de aroma. Houve diferença significativa com relação ao pH e densidade durante o processamento. Dentre as três aminas encontradas no suco durante o processamento (putrescina, espermidina e sinefrina), apenas a espermidina foi susceptível aos processos usados, no entanto, esta atingiu valores similares aos iniciais após incorporação do aroma. Desta forma pode-se concluir que o processamento não influenciou nos parâmetros analisados, inclusive nos teores de sinefrina e de prolina e que uma correlação positiva foi encontrada entre os teores de putrescina e os teores totais.

CAPÍTULO IV. INFLUÊNCIA DA ÉPOCA DE COLHEITA NOS TEORES DE AMINAS BIOATIVAS E DE PROLINA E NAS CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DE SUCO DE LARANJA CONCENTRADO

RESUMO

Amostras de suco concentrado de laranja foram coletadas na linha de produção de uma indústria processadora durante as safras de 2003/04, 2004/05 e 2005/06 e analisadas quanto aos teores de 12 aminos bioativas, de prolina e quanto ao pH, acidez, densidade e açúcares totais. As aminos foram quantificadas por metodologia de CLAE par-iônico por fluorescência, sendo que para sinefrina e octopamina foi utilizado detector UV-VIS. A prolina foi determinada por método espectrofotométrico, após reação com ninidrina e os parâmetros físico-químicos por métodos clássicos de análise. Foram encontradas oito aminos, putrescina (PUT), histamina, serotonina, agmatina, espermidina (EPD), espermina (EPM), sinefrina (SIN) e octopamina no suco de laranja, sendo que três destas, PUT, SIN e EPD estavam presentes em todas as amostras analisadas. A SIN e PUT não foram afetadas de forma significativa em nível de 5% de probabilidade pelo teste de Kruskal-Wallis quando foram comparadas as três safras de produção de laranja. Entretanto foi observada diferença significativa em nível de 5% de probabilidade pelo teste de Kruskal-Wallis com relação aos teores de prolina. Dentre os parâmetros físico-químicos foi encontrada diferença significativa em nível de 5% de probabilidade para acidez e densidade pelo teste de Tukey. Baseado nos parâmetros avaliados foi construída uma equação para se determinar os teores de sinefrina em função da variável mais correlacionada, no caso, a relação Brix/Acidez.

Palavras-chaves: aminos bioativas, cromatografia líquida, prolina, suco de laranja.

1. OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo avaliar a influência da época de colheita nos teores de aminas bioativas e de prolina em suco de laranja concentrado. Os objetivos específicos foram: (i) coletar amostras de suco de laranja concentrado na linha de produção de uma indústria localizada no estado de São Paulo durante a época de colheita de laranja em três safras consecutivas; (ii) analisar as amostras quanto aos teores de 12 aminas bioativas (agmatina, cadaverina, histamina, putrescina, serotonina, espermina, espermidina, tiramina, feniletilamina e triptamina, octopamina e sinefrina), prolina e quanto às características físico-químicas (pH, acidez, densidade e açúcares totais); (iii) verificar a existência de diferença significativa entre as três safras com relação a estes parâmetros; e (iv) construir uma equação baseada nos parâmetros mais correlacionados e que não são afetados pela época de colheita.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material

Amostras de suco concentrado de laranja foram coletadas na linha de produção de uma indústria do estado de São Paulo, durante a época de colheita de laranja, nos períodos de agosto de 2003 a março de 2004, junho de 2004 a janeiro de 2005 e agosto de 2005 a dezembro de 2005, totalizando 61 amostras. As amostras de suco concentrado (65 °Brix) foram diluídas antes das análises de aminas bioativas, prolina, pH, acidez total, densidade e açúcares redutores, não redutores e totais para obter o valor de grau Brix equivalente ao de suco integral (10,5 °Brix).

2.4. Métodos de análise

Aminas bioativas. As aminas agmatina, cadaverina, histamina, putrescina, serotonina, espermina, espermidina, tiramina, feniletilamina e triptamina foram determinadas por CLAE par-iônico por derivação pós-coluna com OPA e detecção fluorimétrica a 340 nm de excitação e 445 nm de emissão (VALE & GLÓRIA, 1997).

Foram determinadas também as aminas octopamina e sinefrina por CLAE par-iônico e detecção no UV-VIS a 275 nm conforme metodologia descrita no capítulo I.

Prolina. Para obtenção da curva padrão, foram preparadas soluções de prolina nas concentrações de 5, 10, 25, 40 e 50 mg/L. Foi pipetado 1 mL destas soluções em tubos de ensaio, adicionados de 1 mL de ácido fórmico e 2 mL de solução de ninidrina. Após adição de cada reagente, os tubos foram homogeneizados e levados ao banho-maria em ebulição por 15 minutos. Os tubos foram resfriados por 5 a 10 minutos em água à 20 °C e adicionados de 10 mL de acetato de n-butila em cada tubo. Estes foram tampados e agitados vigorosamente, até que a coloração passasse para a fase orgânica. A solução foi filtrada em papel de filtro contendo uma ponta de espátula de sulfato de sódio anidro. A leitura do filtrado (fase orgânica) foi feita utilizando cubeta de 10 mm em comprimento de onda de 509 nm contra o branco.

Pipetou-se 1,0 mL da solução da amostra diluída, mas usando o etilenoglicol monometil éter ao invés de solução de ninidrina para o preparo do branco. Todas as outras condições foram mantidas. Com os valores das absorvâncias obtidas e as concentrações de prolina (mg/L), foi traçada a curva padrão, sendo a absorvância plotada na ordenada e as concentrações de prolina na abscissa (BRASIL, 2005).

As amostras de suco de laranja com 10,5 °Brix foram diluídas pipetando-se 10 mL da amostra em um balão de 200 mL e completando-se o volume com água destilada. Em seguida, 1,0 mL das amostras diluídas foram pipetadas para tubos de ensaio e procedeu-se da mesma forma que os padrões. As análises foram realizadas em duplicata.

Potencial hidrogeniônico. O valor do pH foi determinado em potenciômetro da marca Digimed modelo DM-20, após calibração do instrumento com soluções padrão pH 4,0 e 7,0 (BRASIL, 2005).

Acidez total. A acidez total foi determinada por titulação com solução de NaOH 0,1 M utilizando fenolftaleína como indicador, segundo a metodologia do Ministério da Agricultura (BRASIL, 2005).

Densidade. A densidade foi determinada em picnômetro de vidro, sendo calculada pela razão entre a diferença do peso do picnômetro com amostra e picnômetro vazio e a diferença entre picnômetro com água destilada e picnômetro vazio, a 20 °C (BRASIL, 2005).

Açúcares totais. Os açúcares redutores e não-redutores foram calculados a partir da titulação, com solução de glicose 0,5%, da amostra contendo as soluções de Fehling A e B segundo metodologia do Ministério da Agricultura (BRASIL, 2005).

Análise estatística. Foi realizada a análise estatística descritiva para todos os parâmetros avaliados. O teste de Kruskal-Wallis (não paramétrico) ao nível de 5% de probabilidade foi utilizado para as variáveis que não apresentaram distribuição normal. Testes de comparações múltiplas foram necessários para as variáveis que apresentaram diferença pelo teste de Kruskal-Wallis. Foi utilizado o programa SPSS 9.0. A existência de uma correlação significativa entre os teores de aminas, prolina e as características físico-químicas foram determinadas através da correlação de postos de Spearman ao nível de 5% de probabilidade (LEHMAN, 1975; DRAPPER, 1998; SAMPAIO, 1998; SPRENT, 2001).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Aminas bioativas

Foram encontradas oito aminas nas amostras de suco de laranja, dentre elas putrescina, histamina, serotonina, agmatina, espermina, espermidina, sinefrina e octopamina (Tabela IV.1).

Três destas aminas, putrescina, espermidina e sinefrina estavam presentes em todas as amostras analisadas. A putrescina variou de 42,39 a 124,59 mg/L, a sinefrina variou de 25,18 a 37,49 mg/L e a espermidina de 0,89 a 5,87 mg/L. Os coeficientes de variação da octopamina foram bastante elevados na primeira safra. Isto pode ser devido ao fato de os valores encontrados estarem próximos ao limite de detecção do método, assim como também explica o fato desta amina não ter sido detectada nas outras safras avaliadas. Com relação à sinefrina, maiores teores foram observados no início e no final de cada safra.

Interessante observar que esta amina obteve menores coeficientes de variação durante as análises realizadas durante o mesmo mês e que manteve o mesmo perfil durante as três safras avaliadas (Figura IV.1).

Tabela IV.1. Teores de aminas bioativas em amostras de suco de laranja coletadas durante o período de agosto de 2003 a dezembro de 2005 em uma indústria processadora

Época de colheita	n	Teores médios de aminas (mg/ L) (% CV)								Total
		Epd	Epm	Put	Agm	Sin	Oct	Him	Srt	
Ago/ 03	3	3,42 (8,4)	0,45 (6,9)	61,89 (9,3)	0,00 (0,0)	35,8 (0,4)	0,12 (108,4)	0,17 (5,5)	0,43 (3,2)	102,28 (5,5)
Set/ 03	3	3,50 (7,5)	0,55 (8,7)	74,03 (25,3)	0,01 (185,2)	27,61 (13,0)	0,11 (103,9)	0,11 (18,9)	0,29 (86,7)	106,22 (15,1)
Out/ 03	3	2,48 (20,0)	0,63 (15,9)	71,54 (22,6)	0,00 (0,0)	25,5 (7,8)	0,06 (86,6)	0,00 (0,0)	1,62 (3,5)	101,84 (17,9)
Nov/ 03	3	0,89 (173,2)	0,00 (0,0)	42,39 (49,1)	0,00 (0,0)	27,37 (3,6)	0,11 (87,8)	0,00 (0,0)	0,18 (37,3)	70,95 (32,7)
Jan/ 04	5	2,79 (27,6)	0,38 (29,3)	64,74 (26,2)	0,07 (217,8)	27,05 (10,1)	0,09 (138,5)	0,10 (18,6)	0,00 (0,0)	95,22 (21,2)
Mar/ 04	3	2,73 (15,6)	0,44 (8,2)	66,58 (12,0)	0,11 (173,2)	40,81 (6,8)	0,26 (10,6)	0,00 (0,0)	1,86 (51,8)	112,79 (10,1)
Safra 1		2,65 (40,3)	0,41 (50,2)	63,65 (26,6)	0,04 (287,1)	30,33 (19,6)	0,12 (105,8)	0,07 (100,3)	0,66 (122,4)	97,92 (20,3)
Jun/ 04	2	2,12 (21,0)	nd	52,85 (26,9)	0,08 (141,4)	37,49 (1,2)	nd	nd	nd	92,55 (15,2)
Jul/ 04	1	2,26	nd	55,51	nd	36,55	nd	nd	nd	94,32
Ago/ 04	3	2,13 (4,5)	nd	63,81 (6,6)	Nd	34,69 (8,1)	nd	nd	nd	100,63 (4,9)
Set/ 04	3	2,69 (42,9)	nd	46,20 (28,4)	Nd	29,95 (8,7)	nd	nd	nd	78,84 (17,6)
Out/ 04	3	5,77 (40,0)	nd	124,59 (29,5)	Nd	30,26 (0,6)	nd	nd	nd	160,62 (24,0)
Nov/ 04	3	3,76 (14,3)	nd	70,43 (11,2)	Nd	30,57 (11,1)	nd	nd	nd	104,76 (10,5)
Dez/ 04	3	3,32 (68,5)	nd	58,49 (54,0)	Nd	27,89 (3,5)	nd	nd	nd	89,70 (38,8)
Jan/ 05	3	4,52 (38,5)	nd	81,01 (32,3)	Nd	31,29 (4,5)	nd	nd	nd	116,83 (22,9)
Safra 2		3,48 (51,7)	0,00 (0,0)	71,18 (43,8)	0,01 (484,2)	31,69 (11,9)	0,00 (0,0)	0,00 (0,0)	0,00 (0,0)	106,36 (30,6)
Jul/ 05	3	2,87 (12,8)	0,28 (12,7)	69,95 (13,1)	0,05 (24,6)	32,93 (10,4)	nd	nd	nd	106,09 (6,8)
Ago/ 05	3	3,37 (8,0)	0,39 (7,0)	69,81 (3,3)	0,11 (92,9)	32,12 (5,7)	nd	nd	nd	105,81 (4,0)
Set/ 05	3	3,84 (6,6)	0,28 (3,8)	80,33 (6,6)	0,09 (27,1)	25,18 (12,0)	nd	nd	nd	109,72 (2,9)
Out/ 05	4	3,85 (10,9)	0,34 (18,9)	73,94 (3,8)	0,09 (48,8)	30,73 (7,6)	nd	nd	nd	108,95 (2,3)
Nov/ 05	3	4,72 (15,7)	0,39 (18,0)	72,69 (13,2)	0,09 (63,5)	30,38 (6,6)	nd	nd	nd	108,27 (7,7)
Dez/ 05	3	3,93 (13,3)	0,35 (9,5)	64,44 (5,5)	0,23 (45,1)	34,84 (6,9)	nd	nd	nd	103,79 (6,2)
Safra 3		3,77 (19,5)	0,34 (18,4)	72,39 (12,3)	0,11 (72,8)	30,72 (14,2)	0,00 (0,0)	0,00 (0,0)	0,00 (0,0)	107,33 (7,2)
Total safras		3,30 (41,4)	0,24 (88,9)	69,11 (31,1)	0,05 (175,1)	30,93 (15,4)	0,04 (232,9)	0,02 (225,4)	0,22 (256,1)	103,91 (22,0)

Put = putrescina; Him = histamina; Srt = serotonina; Agm = agmatina; Epd = espermidina; Spm = espermina; Sin = sinefrina; Oct = octopamina; Amt = aminas totais. * média (coeficiente de variação).

* nd = não detectado.

Os teores totais das aminas variaram de 70,95 $\mu\text{g/mL}$ (safra 1) a 160,62 $\mu\text{g/mL}$ (safra 2) conforme pode ser observado na Figura IV.2.

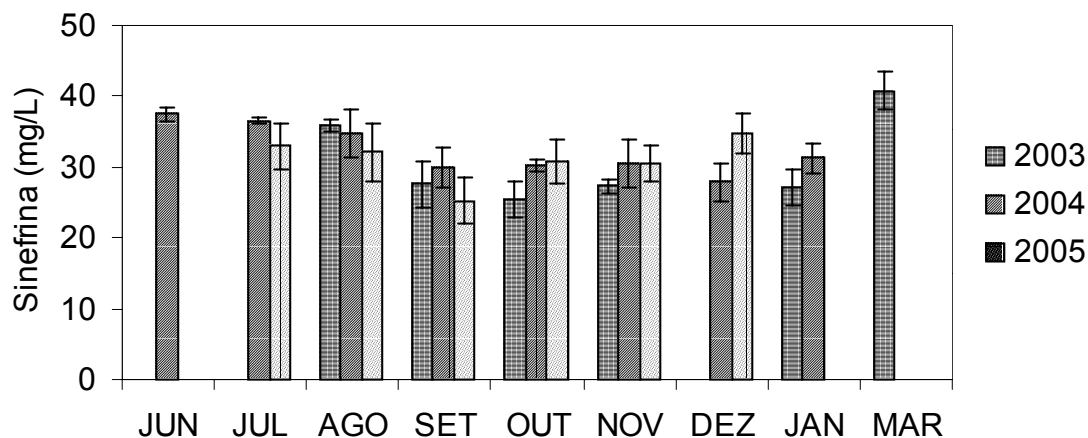


Figura IV.1. Teores de sinefrina em amostras de suco de laranja coletados durante o período de agosto de 2003 a dezembro de 2005 em uma indústria processadora.

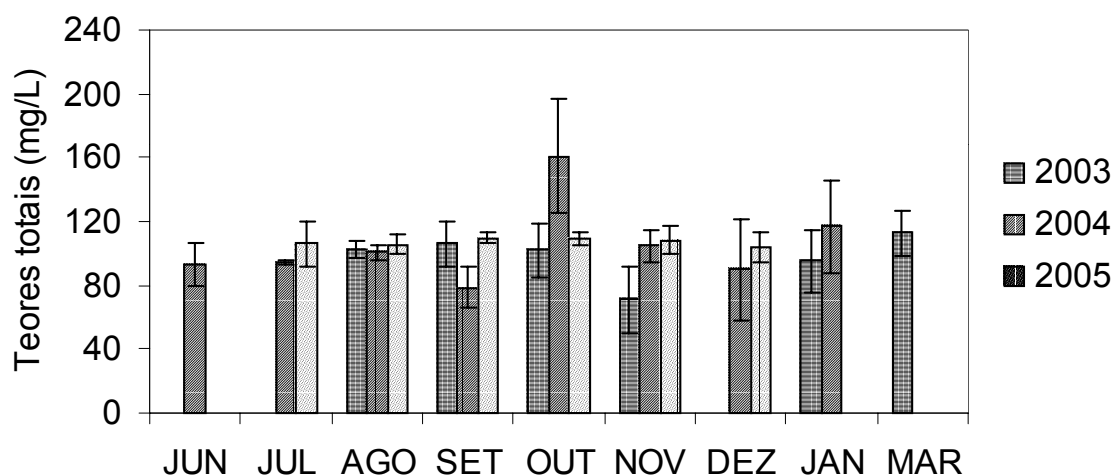


Figura IV.2. Teores totais de aminas bioativas em amostras de suco de laranja coletados durante o período de agosto de 2003 a dezembro de 2005 em uma indústria processadora.

O teste de Kruskal-Wallis ao nível de 5% de significância foi realizado com o objetivo de verificar a existência de diferença significativa entre as três safras de laranja com relação à sinefrina, não tendo sido encontrada diferença significativa entre estas. Entretanto, o mesmo teste foi utilizado para se comparar os níveis de sinefrina dentre os

meses de cada safra, tendo sido encontrada diferença significativa com relação à safra 1. Neste caso, um teste de comparações múltiplas foi realizado (Tabela IV.2)

Tabela IV.2. Comparações múltiplas entre os teores de sinefrina em amostras de suco de laranja coletados durante o período de agosto de 2003 a dezembro de 2005 em uma unidade processadora

Comparações	Abs(Mi-Mj)*	DMS
Agosto x setembro	7,3	6,47
Agosto x outubro	11,0	6,47
Agosto x novembro	7,0	6,47
Agosto x janeiro	8,6	5,78
Agosto x março	3,0	6,47
Setembro x outubro	3,7	6,47
Setembro x novembro	0,3	6,47
Setembro x janeiro	1,3	5,78
Setembro x março	10,3	6,47
Outubro x novembro	4,0	6,47
Outubro x janeiro	2,4	5,78
Outubro x março	14,0	6,47
Novembro x janeiro	1,6	5,78
Novembro x março	10,0	6,47
Janeiro x março	11,6	5,78

*Significância ao nível de 5% de probabilidade.

A putrescina variou de 42,39 µg/mL (safra 1) a 124,79 µg/mL (safra 2) conforme pode ser observado na Figura IV.3. O teste de Kruskal-Wallis ao nível de 5% de significância foi realizado com o objetivo de verificar a existência de diferença significativa entre as três safras de laranja com relação à putrescina, não tendo sido encontrada diferença significativa uma vez que o valor p encontrado é maior do que o nível de significância adotado de 5% (Tabela IV.3). Da mesma forma, o mesmo teste foi utilizado para se comparar os níveis de putrescina dentre os meses de cada safra, também não tendo sido encontrada diferença significativa.

Tabela IV.3. Teste de Kruskal-Wallis para verificação de diferença nos teores de putrescina em amostras de suco de laranja obtidos em três diferentes safras de produção de laranja

Kruskal-Wallis	Graus de liberdade	p-valor
2,70	2	0,259

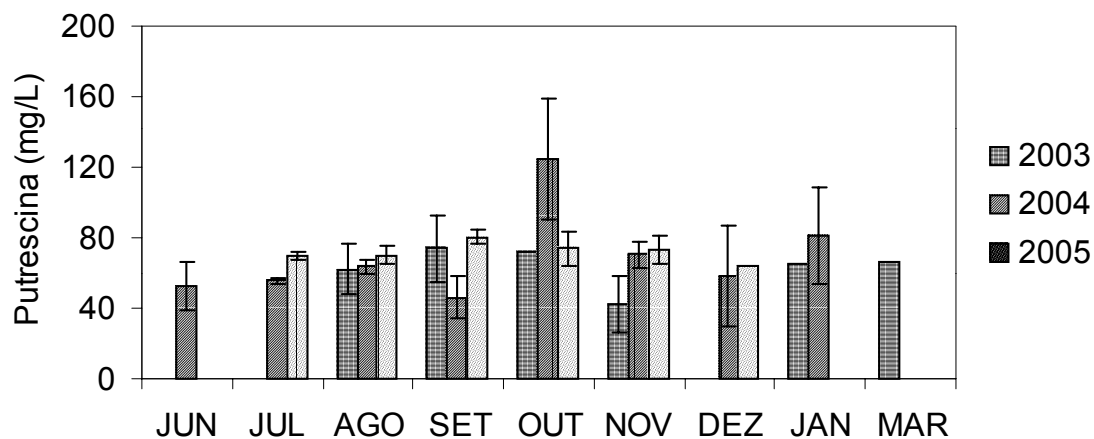


Figura IV.3. Teores de putrescina em amostras de suco de laranja coletados durante o período de agosto de 2003 a dezembro de 2005 em uma indústria processadora.

Com relação aos teores das poliaminas espermina e espermidina, foram encontrados maiores teores de espermidina em todas as amostras, o que era esperado, pois esta poliamina é característica de espécies vegetais.

O teste de Kruskal-Wallis ao nível de 5% de significância foi realizado com o objetivo de verificar a existência de diferença significativa entre as três safras de laranja com relação à espermidina e espermina, tendo sido encontrada, em ambas, diferença significativa entre as safras. Um teste de comparações múltiplas foi realizado para determinar entre quais safras a diferença foi significativa, tendo sido encontrada diferença para espermidina entre as safras 1 e 3 e entre as safras 1 e 2 bem como 2 e 3 (Tabela IV.4).

Tabela IV.4. Comparações múltiplas entre os teores de espermidina e espermina em amostras de suco de laranja coletados durante o período de agosto de 2003 a dezembro de 2005 em uma unidade processadora

Amina	Comparações	Abs(Mi-Mj)*	DMS
Espermidina	Safra 1 x safra 2	8,0	11,13
	Safra 1 x safra 3 *	17,2	10,99
	Safra 2 x safra 3	9,2	10,99
Espermina	Safra 1 x safra2 *	32,2	10,66
	Safra 1 x safra 3	9,2	10,53
	Safra 2 x safra 3 *	23,0	10,53

* Comparações significativas ao nível de 5% de probabilidade.

Desta forma, dentre as aminas bioativas pesquisadas, somente para a putrescina e a sinefrina não foi encontrada diferença significativa entre as safras, em nível de 5% de probabilidade pelo teste de Kruskal-Wallis. Portanto, estas aminas poderiam servir como um parâmetro de qualidade para suco e produtos de laranja.

3.2. Teores de prolina

A prolina foi detectada em todas as amostras de suco de laranja analisadas, sendo que seus teores variaram de 611,04 mg/L a 1731,89 mg/L, com coeficientes de variação de 0,7 a 17,5%.

As concentrações deste aminoácido durante as três safras encontram-se na Figura IV.4. Os maiores teores foram, em geral, alcançados no meio da safra, ou seja, durante os meses de agosto a outubro, destacando-se o mês de outubro por apresentar as maiores médias e medianas encontradas. Por outro lado, os menores teores foram observados no início e final da safra (janeiro-março), quando as frutas são denominadas “temporonas”. Através da análise descritiva deste aminoácido por safra, percebe-se que os teores encontrados na segunda safra (2004) foram relativamente menores, porém mais heterogêneos (Figura IV.4).

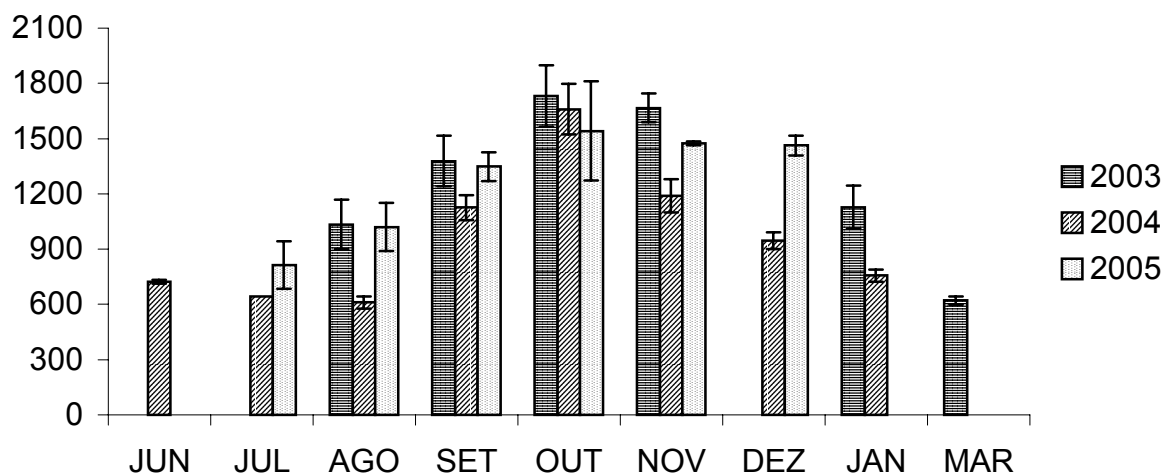


Figura IV.4. Teores médios de prolina em suco concentrado de laranja obtidos no período de agosto de 2003 a dezembro de 2005.

Os teores encontrados são semelhantes àqueles descritos na literatura. GJESSING & ARMSTRONG (1963) detectaram a prolina em níveis de 780 mg/L a 930 mg/L na variedade Flórida; VANDERCOOK & PRICE (1972) encontraram níveis de 940 mg/L (variedade Flórida) a 1690 mg/L (variedade Califórnia). Contudo, TING & ATTAWAY (1971) e OLIVEIRA et al. (2002) relatam que a composição dos aminoácidos livres é influenciada pelo cultivar, condições climáticas, fatores culturais, época de colheita e maturação do fruto.

O teste de Kruskal-wallis foi utilizado para a comparação entre os teores de prolina nas três safras. Encontrou-se que os teores medianos de prolina diferiram entre si ao nível de 5% de probabilidade, o que foi confirmado através do teste de comparações múltiplas (Tabela IV.5).

Tabela IV.5. Comparações múltiplas entre os teores de prolina em amostras de suco de laranja coletados durante o período de agosto de 2003 a dezembro de 2005 em uma unidade processadora

Comparações	Abs(Mi-Mj)*	DMS
Safra 1 x safra 2	11,2	11,0
Safra 1 x safra 3	35,8	11,1
Safra 2 x safra 3	35,8	11,0

* Comparações significativas ao nível de 5% de probabilidade.

O teste de Kruskal-wallis foi também utilizado na comparação dos teores encontrados em cada safra de produção de laranja, tendo sido detectada diferença significativa ao nível de 5% de probabilidade nos valores medianos em todas as safras. Desta forma, conclui-se que tendo os teores de prolina variado de forma significativa em nível de 5% de probabilidade pelo teste de Kruskal-Wallis, este aminoácido não seria um bom índice de autenticidade de suco e produtos de laranja.

3.3. Características físico-químicas do suco de laranja

Os resultados obtidos para o suco de laranja com relação aos parâmetros físico-químicos estão apresentados na Tabela IV.6. Os valores obtidos para acidez e pH variaram significativamente entre as amostras ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Tabela IV.6. Características físico-químicas de amostras de suco de laranja coletados durante o período de agosto de 2003 a dezembro de 2005 em uma indústria processadora

Época de colheita	n	pH	Acidez total (g/100 mL)	Relação Brix/Acidez	Densidade (g/mL)	Açúcares redutores (g/100 g)	Açúcares não redutores (g/100 g)	Açúcares totais (g/100 g)
Ago/ 03	3	3,33 (0,4)	1,328 (2,9)	8,36 (1,4)	1,0458 (0,1)	43,42 (7,8)	30,32 (14,2)	73,74 (6,5)
Set/ 03	3	3,68 (3,8)	0,982 (16,1)	11,32 (13,4)	1,0472 (0,1)	48,08 (11,5)	21,33 (37,7)	69,42 (13,1)
Out/ 03	3	3,74 (0,5)	0,838 (2,6)	12,91 (2,3)	1,0462 (0,1)	51,92 (2,0)	22,33 (7,7)	74,25 (0,9)
Nov/ 03	3	3,81 (0,8)	0,779 (1,7)	13,83 (1,8)	1,0454 (0,1)	49,67 (1,3)	28,16 (3,2)	77,83 (0,6)
Jan/ 04	5	3,90 (1,9)	0,708 (13,0)	15,38 (12,2)	1,0422 (0,4)	34,55 (25,6)	34,32 (39,4)	68,87 (24,8)
Mar/ 04	3	3,57 (1,4)	1,205 (6,5)	9,20 (6,3)	1,0436 (0,2)	42,58 (7,4)	18,29 (44,1)	60,88 (8,1)
Jun/ 04	2	3,83 (0,9)	0,805 (2,3)	13,45 (2,3)	1,0482 (0,1)	44,75 (4,0)	39,60 (4,3)	84,35 (0,1)
Jul/ 04	1	3,76	0,824	13,13	1,0492	40,75	33,36	74,11
Ago/ 04	3	3,62 (5,2)	0,929 (23,5)	12,24 (22,7)	1,0466 (0,1)	39,92 (12,9)	34,76 (14,4)	74,68 (1,0)
Set/ 04	3	3,55 (0,5)	1,111 (2,5)	10,02 (2,5)	1,0469 (0,1)	40,08 (7,4)	35,44 (34,9)	75,52 (13,7)
Out/ 04	3	3,58 (1,6)	0,932 (2,2)	11,70 (2,0)	1,0466 (0,1)	45,75 (10,5)	23,23 (29,3)	68,98 (2,9)
Nov/ 04	3	3,65 (0,3)	0,827 (1,3)	13,10 (1,9)	1,0465 (0,1)	45,75 (6,3)	32,72 (5,5)	78,47 (1,4)
Dez/ 04	3	3,70 (0,2)	0,768 (1,0)	14,20 (1,0)	1,0470 (0,1)	44,08 (4,3)	31,44 (8,7)	75,52 (1,2)
Jan/ 05	3	3,88 (1,1)	0,740 (6,0)	14,77 (5,6)	1,0465 (0,1)	49,00 (3,6)	31,84 (1,6)	80,84 (2,3)
Jul/ 05	3	3,11 (2,0)	1,334 (6,3)	8,31 (7,3)	1,0467 (0,1)	47,17 (4,5)	29,44 (10,6)	76,61 (3,5)
Ago/ 05	3	3,11 (0,7)	1,260 (2,2)	8,82 (1,9)	1,0465 (0,1)	47,58 (3,2)	37,36 (5,5)	84,94 (3,6)
Set/ 05	3	3,54 (2,6)	0,857 (7,6)	12,77 (8,1)	1,0453 (0,1)	34,06 (1,8)	52,26 (2,8)	86,32 (1,6)
Out/ 05	4	3,55 (2,0)	0,892 (5,8)	12,32 (6,6)	1,0457 (0,1)	50,13 (4,5)	35,28 (12,1)	85,41 (5,0)
Nov/ 05	3	3,53 (1,4)	0,865 (3,6)	12,68 (3,3)	1,0456 (0,1)	41,58 (7,4)	36,08 (11,2)	77,66 (3,0)
Dez/ 05	3	3,51 (0,4)	0,896 (4,8)	12,31 (4,2)	1,0450 (0,1)	45,00 (7,3)	33,12 (10,7)	78,12 (0,5)

* média (coeficiente de variação). n = número de amostras.

O pH variou de 3,33 a 3,90 e a acidez total de 0,708 a 1,328 g/100 mL. A densidade variou de 1,042 a 1,047 g/mL e os açúcares totais de 5,70 g/100 g a 7,90 g/100 g, entretanto não foi observada diferença significativa entre as amostras. Desta forma, pode-se concluir que o pH e a acidez não seriam bons índices de qualidade de sucos e produtos de laranja.

O coeficiente de correlação de postos de Spearman foi utilizado com o objetivo de verificar a existência de correlação entre as características físico-químicas, teores de aminas e de prolina. As correlações mais significativas encontradas ao nível de 5% de probabilidade foram entre os teores de sinefrina e prolina (-0,58); e relação Brix/Acidez e sinefrina (-0,46).

3.4. Equação para determinar a autenticidade de suco de laranja baseada nos teores de sinefrina

Com o objetivo de encontrar um modelo que descrevesse a sinefrina em função dos parâmetros mais correlacionados, foram ajustados vários modelos, seguindo o seguinte procedimento:

A. Iniciou-se um modelo ajustando a sinefrina com o parâmetro mais correlacionado (no caso a relação Brix/Acidez). Verificou-se que este parâmetro foi significativo para explicar a sinefrina. Desta forma, encontrou-se um primeiro modelo, dado pela equação:

$$\text{SINEFRINA} = 42,2 - 0,932 \text{ Relação Brix/Acidez} \quad (1)$$

B. Um segundo parâmetro correlacionado foi adicionado ao modelo da equação (1) e foi verificado se a variação do R^2_{ajust} era significativa. Caso afirmativo, este parâmetro também seria adicionado à equação (1).

Este procedimento foi seguido para todos os parâmetros, porém não foi encontrado nenhum outro que se ajustasse ao modelo além da relação Brix/Acidez. Desta forma, foi necessária a verificação da equação (1).

Na Tabela IV.7, está apresentada a análise de variância para o modelo ajustado. Como pode ser observado, encontrou-se um p-valor da estatística de teste F (p-valor = 0,00) indicando que o modelo é significativo, ou seja, existe uma relação linear entre a sinefrina e a relação Brix/Acidez. Na Tabela IV.8, encontra-se o modelo selecionado, a partir do procedimento utilizado. Observa-se que a relação Brix/Acidez é estatisticamente diferente de zero, ou seja, pode-se afirmar que existe uma relação linear entre as variáveis sinefrina e relação Brix/Acidez.

Tabela IV.7. Análise de variância para o modelo relacionando sinefrina e relação Brix/Acidez ajustado

Fonte	GL	SQ	QM	F	P
Regressão	1	271,04	271,04	16,84	0,000
Resíduos	59	949,57	16,09		
Total	60	1220,61			

Tabela IV.8. Modelo ajustado relacionando sinefrina e relação Brix/Acidez e testes dos parâmetros

Preditor	Coef	EP Coef.	IC(95%)	T	P-valor	
Constante	42,214	2,798	(41,76;42,668)	15,09	0,000	
Relação Brix/Acidez		-0,932	0,227	(-1,387;-0,478)	-4,10	0,000
S = 4,012 R ² = 22,2% R ² (ajust) = 20,9% R ² (pred) = 17,40%						
Lack of fit					>0,10	

Verificação das suposições do modelo

Com o objetivo de verificar se as inferências feitas a partir do modelo são válidas, as seguintes suposições foram verificadas:

- I. normalidade, ou seja, os resíduos possuem distribuição normal (Tabela IV.9);
- II. variância constante dos resíduos;
- III. independência dos resíduos, ou seja, se um resíduo não carrega informação de um outro resíduo.

Conforme pode ser observado na Tabela IV.9, a suposição de normalidade dos resíduos foi confirmada, uma vez que o valor de p encontrado foi maior do que 0,10.

Tabela IV.9. Teste de Ryan-Joiner para verificação da suposição de normalidade dos resíduos

Ryan-Joiner	p-valor
0,984	>0,10

Nas Figuras IV.5 e IV.6 estão apresentados os gráficos de valores ajustados versus resíduos padronizados e o de ordem das observações versus resíduos padronizados, respectivamente. Conforme pode ser observado na Figura IV.5, não existe nenhum tipo de tendência nos resíduos, como por exemplo, uma forma de funil, que

poderia levar a acreditar que os resíduos não tivessem variância constante. Os pontos estão espalhados de uma forma aleatória em torno do valor, sem apresentar nenhum tipo de tendência.

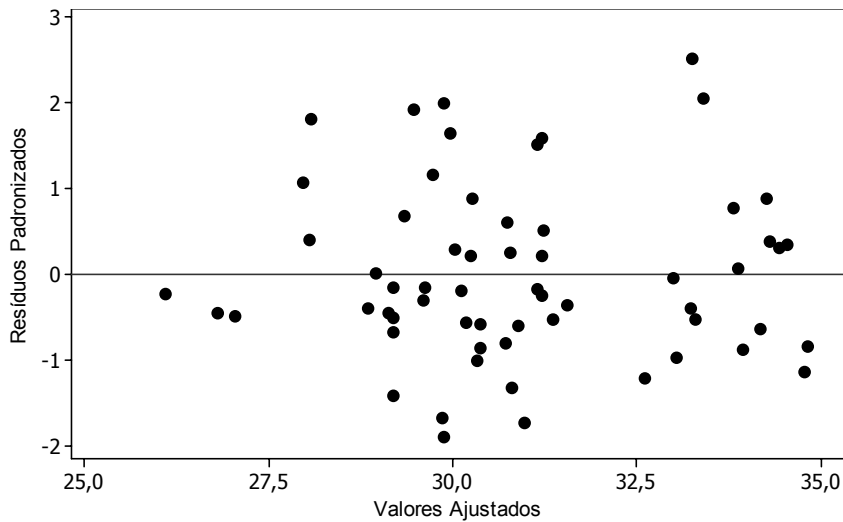


Figura IV.5. Valores ajustados versus resíduos padronizados para o modelo relacionando sinefrina e relação Brix/Acidez.

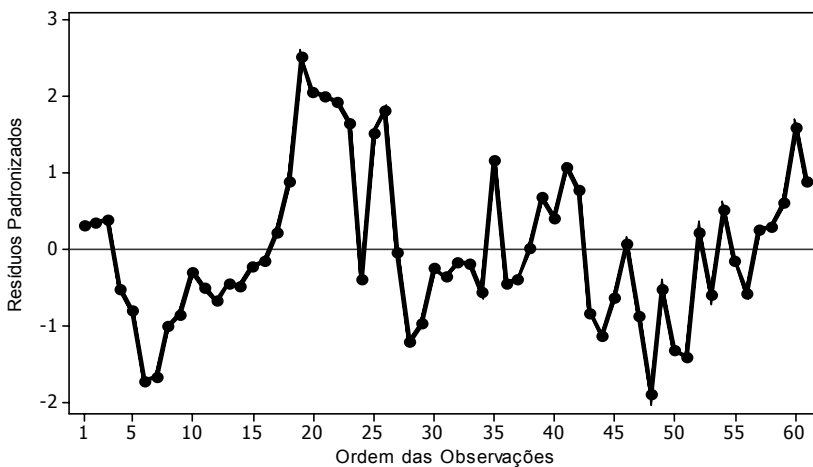


Figura IV.6. Gráfico de ordem de observações versus resíduos padronizados para o modelo relacionando sinefrina e relação Brix/Acidez.

Pode-se observar na Figura IV.6 que, de uma forma geral, os resíduos estão distribuídos aleatoriamente em torno da média zero, alternando entre valores positivos e negativos, não apresentando nenhum tipo de tendência que possa justificar a hipótese de que estes não sejam independentes.

Desta forma, como todas as suposições do modelo foram verificadas, pode-se concluir que as inferências feitas para o modelo descrito pela equação (1) estão corretas.

CONCLUSÃO

Das 12 aminas pesquisadas, apenas três (putrescina, espermidina e sinefrina) estavam presentes em todas as amostras analisadas. Não foi encontrada diferença significativa ao nível de 5% de probabilidade com relação aos teores de SIN e PUT entre as três safras de produção de laranja pelo teste de Kruskal-Wallis. Entretanto, os teores de espermidina variaram significativamente.

Com relação à prolina, foram encontrados teores que variaram entre 611,04 mg/L a 1731,89 mg/L durante as três safras, tendo sido encontrada diferença significativa entre as safras pelo teste de Kruskal-Wallis. Desta forma, a prolina não seria um bom índice de autenticidade para produtos de laranja.

Baseado nos parâmetros avaliados, uma equação foi construída de forma a se determinar os teores de sinefrina em função da(s) variável(is) mais correlacionada(s). Encontrou-se que somente a relação Brix/Acidez se ajustou ao modelo proposto, sendo as suposições verificadas e confirmadas.

CAPÍTULO V. MODELO PARA VERIFICAR A PROPORÇÃO DE SUCO ADICIONADO EM REFRIGERANTE DE LARANJA

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo verificar a influência da adição de diferentes percentuais de suco nos teores das aminas octopamina, sinefrina e tiramina em refrigerantes de laranja. Seis diferentes lotes de suco concentrado de laranja, de base para refrigerante e de água utilizados na produção dos refrigerantes foram coletados em uma indústria processadora. Refrigerante de laranja foi preparado utilizando-se suco de laranja em percentuais de 0,0; 2,5; 5,0; 7,5; 10,0; 12,5 e 15,0%. As amostras de refrigerante foram analisadas quanto aos teores de aminas por CLAE par-iônico com sistema de detecção no UV-VIS. A sinefrina foi detectada em 100% das amostras de suco de laranja utilizado, a tiramina não foi detectada e a octopamina foi detectada em amostras de um lote. Foi observada correlação linear significativa entre os teores de sinefrina e os percentuais de suco adicionado. Foi proposto um modelo para estimar os teores de suco em refrigerante de laranja. Este foi testado com sete marcas comerciais de refrigerante de laranja. Baseado nos teores estimados, apenas três indústrias estariam adicionando quantidades adequadas de suco no refrigerante de laranja.

Palavras-chave: aminas bioativas, cromatografia líquida, suco de laranja, refrigerante de laranja.

1. OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo verificar o potencial de utilização de amins como índice do percentual de suco adicionado em refrigerante de laranja. Os objetivos específicos foram: (i) determinar a influência do percentual de adição de suco de laranja nos teores das amins octopamina, sinefrina e tiramina em refrigerante; (ii) determinar a correlação entre os teores de amins e a proporção de suco adicionado em refrigerantes de laranja; (iii) propor uma equação baseada nos teores da amina mais correlacionada com a proporção de suco em refrigerante de laranja; (iv) determinar a proporção de suco adicionado em marcas comerciais de refrigerante de laranja utilizando a equação proposta.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Amostras

As amostras de suco concentrado de laranja, base para o refrigerante de laranja (xarope de açúcar, corante, ácido cítrico, e outros aditivos) e água foram fornecidas por uma indústria de refrigerantes localizada em Belo Horizonte, MG. As amostras foram recolhidas da linha de produção, sendo que este procedimento foi repetido utilizando-se seis diferentes lotes de produção. As amostras foram coletadas em dias alternados no período de 01 a 17 de outubro de 2002.

Para o preparo dos refrigerantes, o suco concentrado (em torno de 65° Brix) foi diluído até obter-se uma concentração de 10,5 °Brix, e a base para refrigerante foi diluída para 12,0 °Brix. Para a diluição foi utilizada a água fornecida pela própria indústria. Em seguida, foram pipetados em balões volumétricos de 100 mL quantidades de 2,5; 5,0; 7,5; 10,0; 12,5 e 15,0 mL de suco e o volume foi completado com a base diluída.

Amostras de refrigerantes de laranja (sete marcas) foram adquiridas no mercado consumidor de Belo Horizonte (MG) no período de agosto a setembro de 2002.

2.2. Determinação das amins

As amostras foram centrifugadas a 11.180 g a 4 °C e filtradas em filtro qualitativo. Os filtrados foram purificados em Sep-pak C18 utilizando acetonitrila e água como eluente e filtrados em membranas HAWP de 0,45 µm de tamanho do poro (Milipore Corp.,

Bedford, MA, EUA). Para a determinação quantitativa da octopamina, sinefrina e tiramina foi utilizada a metodologia por CLAE-par iônico, com sistema de detecção no UV-VIS, a 275 nm, conforme descrito no capítulo I.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Teores de aminas no suco de laranja concentrado

Os resultados obtidos para o suco concentrado de laranja de diferentes lotes de produção encontram-se na Figura V.1. A octopamina foi encontrada em teores que variaram de 1,09 a 2,73 mg/L e sinefrina de 24,98 a 33,44 mg/L, sendo 1,91 mg/L e 27,34 mg/L os valores médios encontrados, respectivamente. A tiramina não foi detectada em nenhuma das amostras analisadas.

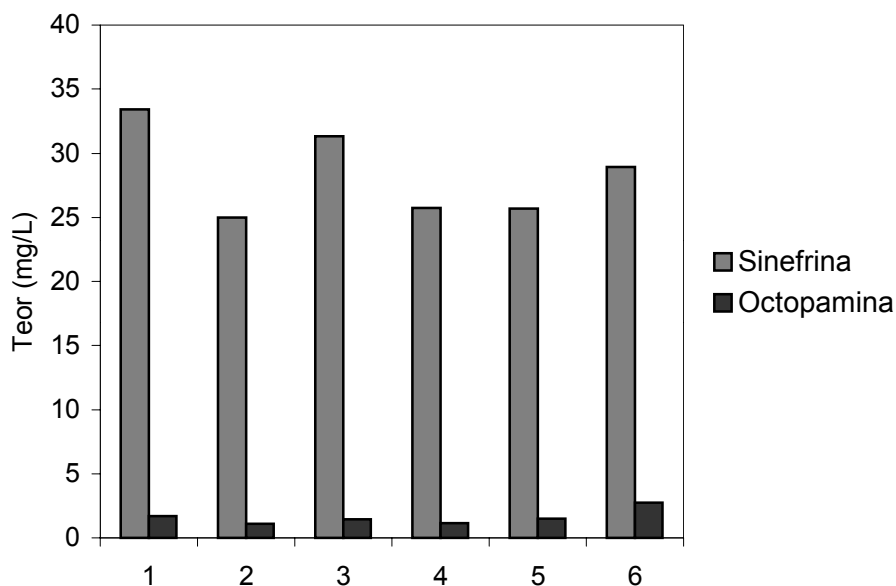


Figura V.1. Teores das aminas octopamina e sinefrina em diferentes amostras de suco de laranja (10,5 °Brix) utilizado no preparo de refrigerantes.

Dentre os trabalhos encontrados na literatura, COFFIN (1969) encontrou teores de sinefrina variando de 12,5 a 23,4 mg/L no suco de laranja. WHEATON & STEWART (1965) analisando quatro variedades de laranja, encontraram teores de 15 a 27 mg/L de suco.

3.2. Correlação entre o percentual de suco adicionado e o teor de aminas

A correlação entre os teores de suco adicionado e os teores das aminas octopamina e sinefrina encontrados nos refrigerantes de laranja estão apresentados na Figura V.2.

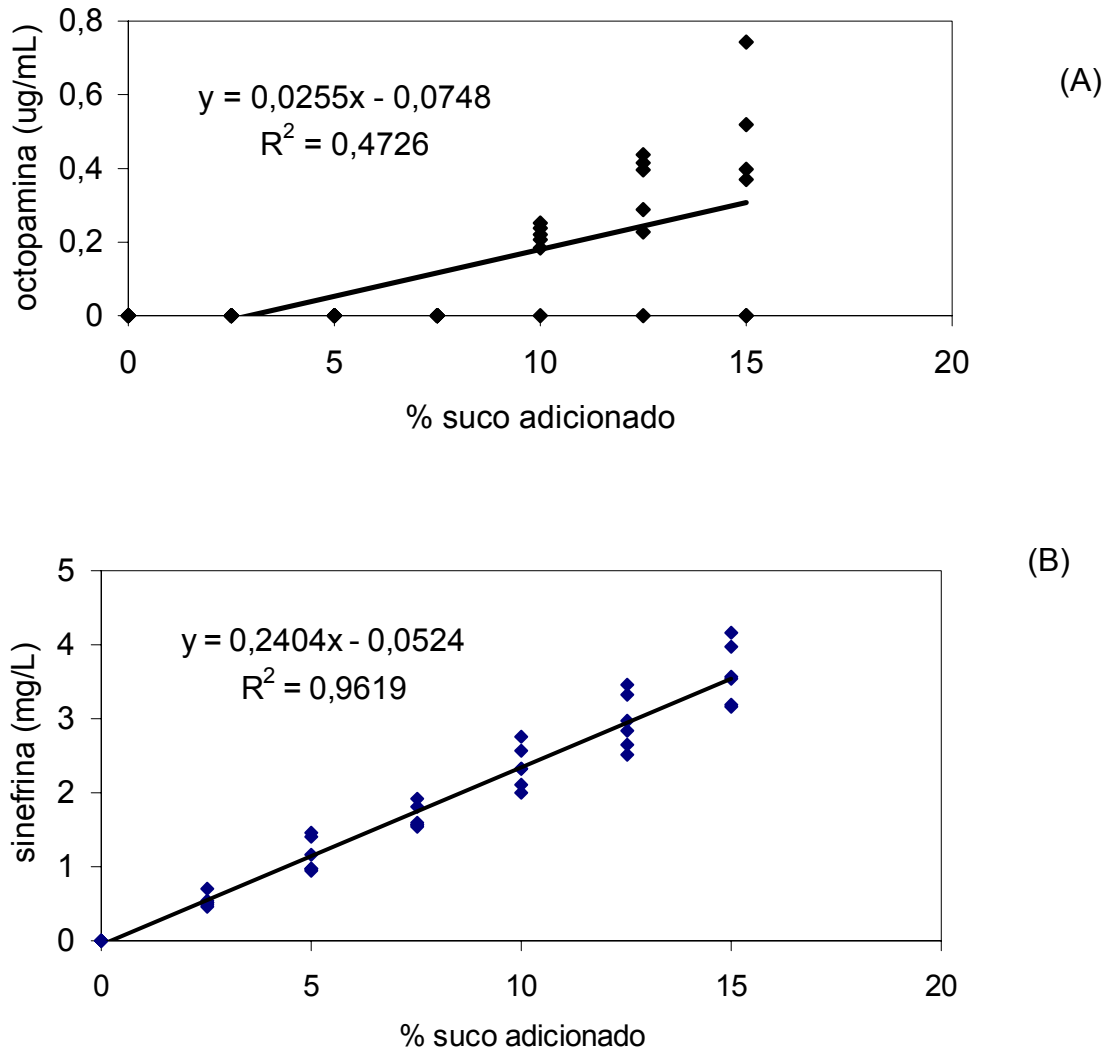


Figura V.2. Influência do nível de adição de suco em refrigerante nos teores de octopamina (A) e sinefrina (B) em refrigerante de laranja.

O coeficiente de determinação encontrado para sinefrina foi melhor do que o encontrado para a octopamina. Houve uma grande variação nos teores encontrados para octopamina, provavelmente por esta ser encontrada em quantidades muito pequenas no suco de laranja.

Baseado nestes resultados, a equação (2) foi proposta com o objetivo de determinar a proporção de suco adicionado em refrigerante de laranja baseado nos teores de sinefrina encontrados.

$$\% \text{ de suco adicionado} = \frac{\text{teor de sinefrina (mg/L)} + 0,0524}{0,2404} \quad (2)$$

3.3. Percentual de suco adicionado em refrigerantes de laranja

Os resultados obtidos com relação aos teores de sinefrina para refrigerante de marcas comerciais diferentes encontram-se na Tabela V.1. A octopamina foi detectada em apenas uma marca de refrigerante (marca 1), sendo 0,18 mg/L o teor médio encontrado. A tiramina não foi detectada em nenhuma das amostras. O elevado coeficiente de variação encontrado nas marcas 3 e 4 deve-se ao fato de que não foi detectada a sinefrina em alguns lotes da mesma marca.

Tabela V.1. Teores de sinefrina encontrados e percentual de suco adicionado calculado em refrigerantes de laranja

Marca	Teores de sinefrina (mg/L)*	% de suco adicionado
1	2,31 (6,5)	9,9
2	2,11 (8,7)	9,1
3	0,17 (144,6)	1,3
4	0,38 (139,6)	2,1
5	nd (0)	0,0
6	2,05 (12,7)	8,9
7	0,84 (16,9)	4,2

Média (coeficiente de variação).

Calculando-se o percentual de suco adicionado por meio da equação proposta, os percentuais de suco adicionados variaram de 0 a 9,9%. Desta forma, a maioria das indústrias parece não estar fazendo a adição correta de suco na fabricação do refrigerante, a qual deveria ser de 10%. Levando-se em consideração os coeficientes de variação encontrados neste experimento e aqueles encontrados nos teores de sinefrina em suco de laranja concentrado obtidos de laranjas originárias de diferentes épocas de colheita (CV = 15,4), pode-se concluir que somente as marcas 1, 2 e 6 obedeceram à legislação vigente que determina a adição de no mínimo 10% de suco de laranja a 10,5 °Brix.

4. CONCLUSÃO

Foi detectada a amina sinefrina em 100% das amostras de suco de laranja utilizado na fabricação de refrigerante em teores médios de 27,34 mg/L e um coeficiente de variação de 12,7%. A tiramina não foi detectada e a octopamina foi detectada em amostras de um lote.

A adição de 0 a 15% de suco em refrigerante de laranja correlacionou linearmente com os teores de sinefrina encontrados no refrigerante. Não houve correlação linear significativa entre o percentual de suco adicionado e teores de octopamina.

Foi proposto um modelo para determinar, a partir do teor de sinefrina encontrado no refrigerante, o percentual de suco adicionado.

Sete marcas de refrigerantes disponíveis no mercado foram analisadas quanto aos teores de sinefrina. Baseado no modelo proposto, apenas três indústrias estariam adicionando quantidades adequadas de suco no refrigerante de laranja.

CONCLUSÕES INTEGRADAS

Uma metodologia para a determinação de sinefrina em produtos de laranja foi desenvolvida e validada. A amostra foi centrifugada e purificada por sep pak C18. A sinefrina foi determinada por CLAE-par iônico, coluna μ Bondapak C18, e detecção a 275 nm. O método apresentou exatidão, precisão e limites de detecção e quantificação adequados para produtos de laranja.

O perfil e teores de aminas bioativas e as características físico-químicas de marcas comerciais em sucos e refrigerantes de laranja foram investigados. O suco caracterizou-se pela presença de sinefrina, espermidina e putrescina em todas as amostras, sendo também detectadas mais seis aminas de forma aleatória (espermina, agmatina, tiramina, octopamina, histamina e serotonina). No refrigerante de laranja, entretanto, foram detectadas apenas putrescina, sinefrina, espermidina,espermina e histamina. Com relação às características físico-químicas, tanto as amostras de suco quanto de refrigerante de laranja apresentaram resultados de acordo com a legislação.

O processamento de suco de laranja concentrado foi acompanhado, tendo sido monitorados os teores de aminas, prolina e as características físico-químicas. O processamento aumentou a concentração de sólidos solúveis, entretanto, não afetou de forma significativa os teores de sinefrina, prolina e as características físico-químicas (pH, acidez, relação Brix/Acidez e densidade).

Foram estudados os teores de aminas, prolina e as características físico-químicas em amostras de suco de laranja concentrado em três safras consecutivas (2003 a 2005). A safra afetou os teores de poliaminas, prolina e características físico-químicas. Variação significativa em função da época de colheita foi observada para a espermidina, prolina, pH e acidez. Em função de ser afetada pela época de colheita, a prolina não seria um bom índice de autenticidade para produtos de laranja. Observou-se que a variação nos teores de sinefrina ocorreu em função da relação brix/acidez, ou seja, grau de maturação da amostra. Uma equação correlacionando os teores de sinefrina e a relação brix/acidez foi proposta.

Refrigerante de laranja foi preparado com diferentes percentuais de suco adicionado. Houve correlação significativa entre os teores de sinefrina e os teores de suco adicionado. Uma equação foi proposta para estimar o percentual de suco adicionado em refrigerantes de laranja. A equação foi testada em refrigerantes disponíveis no mercado consumidor. Baseado nos resultados obtidos, apenas 43% das

amostras analisadas conteriam 10% de suco em refrigerante de laranja como determina a legislação brasileira.

Os resultados obtidos indicam ser a sinefrina o melhor índice para a determinação da autenticidade de sucos e para a determinação do percentual de suco adicionado em produtos de laranja.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABECITRUS (Associação Brasileira dos Exportadores de Cítricos). Industrialização da Laranja. Disponível em <<http://www.abecitrus.com.br/indus.html>>. Acesso em: 26 out. 2001.
- ABIR (Associação Brasileira das Indústrias de Refrigerantes). Disponível em <<http://www.abir.org.br>>. Acesso em: 20 mar. 2006.
- ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas). NBR ISSO/IEC 17025. Requisitos gerais para competência de laboratórios de ensaio e calibração. 20 p. 2001.
- ADÃO, R.C.; GLÓRIA, M.B.A. Bioactive amines and carbohydrate changes during ripening of 'Prata' banana (*Musa acuminata* x *M. Balbisiana*). **Food Chem.**, v. 90, p. 705-711, 2005.
- BARDÓCZ, S.; GRANT, G.; BROWN, D.S.; RALPH, A.; PUSZTAI, A. Polyamines in food – implications for growth and health. **J. Nutr. Biochem.**, v. 4, p. 66-70, 1993.
- BARDÓCZ, S. Polyamines in food and their consequences for food quality and human health. **Trends Food Sci. Technol.**, v. 6, p. 341-346, 1995.
- BELITZ, H.-D.; GROSH, W. *Química de los alimentos*, 2. ed., Zaragoza: Acribia. 1997. p. 861-922.
- BOTELHO, F.V.; ENÉAS, L.R.; CESAR, G.C.; BIZOTTO, C.S.; TAVARES, E.; OLIVEIRA, F.A.; GLÓRIA, M.B.A.; SILVESTRE, M.P.C.; ARANTES, R.M.E.; ALVAREZ-LEITE, J.I. Effects of eggplant (*Solanum melongena*) on the atherogenesis and oxidative stress in LDL receptor knock out mice (LDLR). **Food Chem. Toxicol.**, v. 42, p. 1259-1267, 2004.
- BRASIL. Ministério da Agricultura. Portaria nº 76 de 26 de novembro de 1986. Dispõe sobre os métodos analíticos de bebidas e vinagre. **Diário Oficial da União**, Brasília, 28 nov. 1986. Seção 1, pt. 2.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Lei nº 8918 de 14/07/1994. Padronização, classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas. **Diário Oficial da União**, Brasília, 1997.
- BRASIL. Ministério da Agricultura. Dispõe sobre os métodos analíticos de bebidas e vinagre. **Diário Oficial da União**, Brasília, 2005.

- BRAVERMAN, J.B.S. *Citrus products* : chemical composition and chemical technology. New York: Interscience Publishers, 1949. 424 p.
- BRINK, B.; DAMINK, C.; JOOSTEN, H.M.L.J.; VELD, J.H.J.H. Occurrence and formation of biologically active amines in food. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 11, p.73-84, 1990.
- CACCIOPPOLI, J.; CUSTÓDIO, F.B.; VIEIRA, S.M.; COELHO, J.V.; GLÓRIA, M.B.A. Aminas bioativas e características físico-químicas de salame tipo italiano. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootecnia**, v. 58, n. 4, p. 648-657, 2006.
- CANCALON, P.F. Analytical monitoring of citrus juice by using capillary eletrophoresis. **J. AOAC Int.**, v.82, n.1, p. 95-106, 1999.
- CHIN, K.D.H.; KOEHLER, P.E. Identification and estimation of histamine, tryptamine, phenethylamine and tyramine in soy sauce by thin-layer chromatography of dansyl derivatives. **J. Food Sci.**, v.48, p. 1829-1828, 1983.
- CHITARRA, M.I.F.; CHITARRA, A.B. *Pós-colheita de frutas e hortaliças: fisiologia e manuseio*. 2 ed. Lavras: Editora UFLA, 2005. 785 p.
- CODEX Alimentarius. Resíduos de medicamentos veterinarios en los alimentos. 2 ed. v. 3, 1993.
- COFFIN, D.E. Correlation of the levels of several constituents of commercial orange juices. **J. AOAC**, v. 51, n. 6, p. 1199-1203, 1968.
- COFFIN, D.E. Gas chromatographic determination of phenolic amines. **J. AOAC**, v. 52, n.5, p.1044-1047, 1969.
- COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. *Introdução a métodos cromatográficos*. 7 ed. Campinas: Editora da UNICAMP, 1997. 279 p.
- CORRÊA NETO, R.S.; FARIA, J.A.F. Fatores que influem na qualidade do suco de laranja. **Ciênc. Tecnol. Alim.**, Campinas, v. 19, n.1, p. 153-160, 1999.
- CORRÊA NETO, R.S.; FARIA, J.A.F. Alterações químicas e enzimáticas em suco de laranja pasteurizado. **Higiene alimentar**, v. 17, n. 114/115, p. 60-66, 2003.
- COUTTS, R.T.; GLEN, B.B.; PASUTTO, F.M. Foodstuffs as source of psychoactive amines and their precursors: content, significance and identification. **Adv. Drug Res.**, v. 15, p. 169-233, 1986.
- CUSTÓDIO, F.B.; TAVARES, E.; GLÓRIA, M.B.A. Extraction of bioactive amines from grated parmesan cheese using acid, alkaline and organic solvents, **J. Food Comp. Anal.**, 2007 (*in press*).
- DRAPPER, N. R., SMITH H. *Applied Regression Analysis*, 3rd ed. New York: Wiley & Sons., 1998.

- ELIASSEN, K.A.; REISTAD, R.; RISOEN, U.; RONNING, H.F. Dietary polyamines. **Food Chem.**, v. 78, p. 273-280, 2002.
- EURACHEM. *The fitness for purpose of analytical methods*. A laboratory guide to method validation and related topics. 61 p., 1998.
- EUROPEAN COMMISSION (EC), Directive 96/23/EC Concerning performance of Analytical Methods and the Interpretation of Results, Official J. Eur. Comm. 2002, L 221/8.
- FAO (Food and Agricultural Organization). Disponível em <<http://www.abir.org.br>>. Acesso em: 10 abr. 2006.
- FLORES, H.E.; PROTACIO, C.M.; SIGNS, M.W. Primary and secondary metabolism of polyamines in plants. **Phytochem.**, n. 23, p. 239-393, 1989.
- FRANCO, G. *Tabela de composição química dos alimentos*. 9. ed. São Paulo: Atheneu, 1992. 307 p.
- GJESSING, L.; ARMSTRONG, M.D. Occurrence of (-)-sympatol in oranges. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, v.114, p.226-229, 1963.
- GLÓRIA, M.B.A. Bioactive Amines. In: HUI, H.; NOLLET, L.L. *Handbook of Food Science, Technology and Engineering*. Marcel Dekker: New York, 2005.
- GLÓRIA, M.B.A.; TAVARES-NETO, J.; LABANCA, R.A.; CARVALHO, M.S. Influence of Cultivar and Germination on Bioactive Amines in Soybeans (*Glycine max* L. Merrill) **J. Agric. Food Chem.**, v. 53, n. 19, p. 7480-7485, 2005 .
- 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. **J. Agric. Food Chem.**, v. 34, n.3, p.402-405, 1986.
- HALÁSZ, A.; BARÁTH, Á.; SIMON-SARKADI, L.; HOLZAPFEL, W. Biogenic amines and their production by microorganisms in food. **Trends Food Sci. Technol.**, v.5, p. 42-49, 1994.
- HERBST, E.J.; SNELL, E.E. Putrescine and related compounds as growth factors for *Hemophilus parainfluenzae* 7901. **J. Biol. Chem.**, v.18, p.47-54, 1949.
- HURST, W.J. A review of HPLC methods for the determination of selected biogenic amines in food. **J. Liquid Chromatogr.**, v. 13, n. 1, p. 1-23, 1990.
- IAL. Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz, 1985. v. 1, 533 p.
- ICH. International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. *Validation of Analytical Procedures*. Geneve, 1996.

- ISMAIL, M.A.; WOLFORD, R.W. Changes in organic nitrogen including free amino acids during processing of Florida orange concentrate. **Proc. Fla. State Hort. Soc.**, v. 80, p. 261-267, 1967.
- IZQUIERDO-PULIDO, M.L.; VIDAL-CAROU, M.C.; MARINE-FONT, A. Determination of biogenic amine in beers and their raw materials by ion-pair liquid chromatography with postcolumn derivation. **J. AOAC Int.**, v. 76, n. 5, p. 1027-1032, 1993.
- JENKE, D.R. Chromatographic method validation: a review of current practices and procedures. I General concepts and guidelines. **J. Liq. Chrom. & Rel. Technol.**, v.19, p. 719-736, 1996.
- KUNEMAN, D.W.; BRADDOCK, J.K.; MCCHESENEY, L.L. HPLC profile of amino acids in fruit juices as their (1-fluoro-2,4-dinitrophenyl)-5-L-alanine amide derivatives. **J. Agric. Food Chem.**, v. 36, n.1, p. 6-9, 1988.
- KUSU, F.; MATSUMOTO, M.; TAKAMURA, K. Direct separation and determination of synephrine enantiomers by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. **Chem. Pharm. Bulletin**, v. 43, n. 7, p. 1158-1161, 1995.
- KUSU, F.; MATSUMOTO, M.; ARAI, K.; TAKAMURA, K. Determination of synephrine enantiomers in food and conjugated synephrine in urine by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. **Anal. Biochem.**, v.235, n.2, p. 191-194, 1996.
- LANÇAS, F.M. *Extração em fase sólida (SPE)*. São Carlos: Editora Rima, 2004a. 96 p.
- LANÇAS, F.M. *Validação de métodos cromatográficos de análise*. São Carlos: Editora Rima, 2004b. 62 p.
- LAVIZZARI, T.; VECIANA-NOGUÉS, M.T.; BOVER-CID, S.; MARINÉ-FONT, A.; VIDAL-CAROU, M.C. Improved method for the determination of biogenic amines and polyamines in vegetable products by ion-pair high-performance liquid chromatography. **J. Chromatogr. A**, v. 1129, n. 1, p. 67-72, 2006.
- LAX, P.M.; KING, G.S.; PETTIT, B.R.; SANDLER, M. 3-O-methylated catecholamines in human urine: improved gas chromatographic assay. **Clin. Chim. Act**, n. 96, p. 269-272, 1979.
- LEHMAN, E.L. *Nonparametrics: statistical methods based on ranks*. San Francisco: Holden Day, 1975.
- LEITE, F. *Validação em análise química*. 3 ed. Campinas: Editora Átomo, 1998. 224 p.
- LEWIS, W.M. Chemical evaluation of orange juice in compounded soft drinks. **J. Sci. Food Agric.**, v. 17, p.316-320, 1966.

- LIMA, A.S. Metodologia para a determinação de histamina por cromatografia de par iônico. Belo Horizonte: Faculdade de Farmácia da UFMG. 1999. 76 p. (Dissertação, Mestrado em Ciência de Alimentos).
- MADRID, A.; CENZANO, I.; VICENTE, J.M. **Manual de indústrias dos alimentos**. São Paulo: Varela, 599 p.,1996. Cap. 10: Elaboração de sucos, geléias e bebidas refrigerantes, p. 315-369.
- MIETZ, J.L.; KARMAS, E. Chemical quality index of canned tuna as determined by HPLC. **J. Food Sci.**, v. 42, p. 155-158, 1977.
- MORET, S.; CONTE, L.S. High-performance liquid chromatographic evaluation of biogenic amines in food. An analysis of different methods of sample preparation in relation to food characteristics. **J. Chromatogr.**, v. 729, p. 363-369, 1996.
- MORGAN, R.H. Serine as an index of orange content of soft drinks. **J. Assoc. Public Anal.**, v. 4, p. 41-44, 1966.
- OHLWEILER, A.O. **Química analítica quantitativa**, 3. ed. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos Editora S. A., 1982. 273 p.
- OHTA, I.; OGAWA, K.; SAITO, H.; OHSAWA, K. Determination of synephrine in oriental pharmaceutical decoctions containing aurant fructus immaturus by ion-pair high-performance liquid chromatography. **Yakugaku Zasshi**, v. 114, n.9, p.691-696, 1994.
- OKAMOTO, A.; SUGI, E.; KOIZUMI, Y.; YANAGIDA, F.; UDAKA, S. Polyamine content of ordinary foodstuffs and various fermented foods. **Biosci. Biotech. Biochem.**, v. 61, n. 9, p. 1582-1584, 1997.
- OLIVEIRA, M.E.B.; OLIVEIRA, G.S.F.; MAIA, G.A.; MOREIRA, R.A.; MONTEIRO, A.C.O. Aminoácidos livres majoritários no suco de caju: variação ao longo da safra. **Rev. Bras. Frutic.**, v. 24, n. 1, p. 133-137, 2002.
- PENZAK, S.R.; JANN, M.W.; COLD, J.A.; HON, Y.Y.; DESAI, H.D.; GURLEY, B.J. Seville (sour) orange juice: synephrine content and cardiovascular effects in normotensive adults. **J. Clin. Pharmacol.**, v. 41, p. 1059-1063, 2001.
- PISANO, J.J.; OATES, J.A.; KARMEN, A.; SJOERDSMA, A.; UDENFRIEND, S. Identification of p-hidroxy (methylaminomethyl)benzyl alcohol (synephrine) in human urine. **J. Biol. Chem.**, v.236, n.3, p.898-901, 1961.
- POMERANZ, Y.; MELOAN, C.E. *Food analysis: theory and practice*. 3 ed. CHAPMAN & HALL, 1994.
- PORTAL DO FAZENDEIRO. Histórico da Laranja. In: Fruticultura. **Produção Agrícola**. Disponível em : <<http://www.abir.com.br>> Acesso em: 17 nov. 2004.

- ROCKLAND, L.B. Nitrogenous constituents. In: SINCLAIR, W.B. *The orange: its biochemistry and physiology*, __, 1961.
- ROGERS, G. R. Collaborative study of betaine in orange juice. **J. AOAC**, v. 53, n.3, p.568-571, 1970.
- RUSCHEL, C.K.; CARVALHO, H.H.; SOUZA, R.B.; TONDO, E.C. Qualidade microbiológica e físico-química de sucos de laranja comercializados nas vias públicas de Porto Alegre/RS. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, n. 21, v.1, p. 94-97, 2001.
- SAMPAIO, I.B.M. *Estatística aplicada à experimentação animal*. Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia. 1998. 221 p.
- SANTOS, W.C.; SOUZA, M.R.; CERQUEIRA, M.M.O.P.; GLÓRIA, M.B.A. Bioactive amines formation in milk by *Lactococcus* in the presence or not of rennet and NaCl at 20 and 32 °C. **Food Chem.**, v. 81, n. 4, p. 595-606, 2003.
- SEILER, N. Polyamines. **J. Chromatogr.**, v. 379, p. 157-176, 1986.
- SEN, N.P. Analysis and significance of tyramine in foods. **J. Food Sci.**, v. 34, n.1, p.22-26, 1969.
- SEYMOUR, G.B.; TAYLOR, J.E.; TUCKER, G.A. *Biochemistry of fruit ripening*. Londres: Chapman & Hall, 1993.
- SHALABY, A.R. Significance of biogenic amines to food safety and human health. **Food Res. Int.**, v. 29, n. 7, p. 675-690, 1996.
- SMITH, T. A. Amines in food. **Food Chem.**, v. 6, p. 169-200, 1980-1981.
- SOMOGY, L.P.; BARRET D.M.; HUI, Y.H. *Major processed products*. Lancaster: Technomic Publishing, 1996. 558 p.
- SOUZA, S.V.C.; SILVA, G.; DINIZ, M.H.G.M. Determinação de resíduos de nitrofurazona, furazolidona e nicarbazina em tecidos de origem animal. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 21, n. 1, p. 34-38, 2001.
- SOUZA, S.V.C.; BRITTO, R.B. Validação de métodos: aplicação em análises de resíduos em alimentos. In: Encontro para a Qualidade de Laboratórios. Anais...São Paulo: REMESP. P. 155-163, 2002.
- SOUZA, S.V.C.; JUNQUEIRA, R.G. A procedure to assess linearity by ordinary least squares method. **Anal. Chim. ACTA**, v. 552, n. 1-2, p. 25-35, 2005.
- SPRENT, P.; SMEETON, N.C. *Applied Nonparametric statistical methods*, 3rd ed. Chapman & Hall/CRC, 2001.

- STARLING, M.F.V. *Perfil e teores de aminas biogênicas em hortaliças*. Belo Horizonte: Faculdade de Farmácia da UFMG, 1998. 72 p. (Dissertação, Mestrado em Ciência de Alimentos).
- STEWART, I.; NEWHALL, W.F.; EDWARDS, G.J. The isolation and identification of l-synephrine in the leaves and fruit of citrus. **J. Biol. Chem.**, v. 239, n. 3, p. 930-932, 1964
- STEWART, I.; WHEATON, T.A. Phenolic amines in citrus juice. **Proc. Fla. State Hortic. Soc.**, v. 77, p. 318-320, 1964.
- TADEO, J.L.; ORTIZ, J.M.; MARTÍN, B.; ESTELLÉS, A. Changes in nitrogen content and amino acid composition of navel oranges during ripening. **J. Sci. Food Agric.**, v. 43, p. 201-209, 1988.
- TASSONI, A.; GERMANA, M.A.; BAGNI, N. Free and conjugated polyamine content in *Citrus sinensis* Osbeck, cultivar Brasileiro N.L. 92, a Navel orange, at different maturation stages. **Food Chem.**, v. 87, n. 1, p. 537-541, 2004.
- TAVARES-NETO, J.; VIEIRA, S.M.; GLÓRIA, M.B.A. Purificação de amostras de suco de laranja por partição líquido-líquido e extração em fase sólida para análise de aminas. In: Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos, V, 2003. Campinas: SP (cd room) (2003).
- TING, S.V. Nitrogen content of florida orange juice and orange juice concentrate. **Proc. Fla. State Hortic.**, Soc., v.80, p.257-261,1967.
- TING, S.V.; ATTAWAY, J.A. Citrus fruit. In: HULME, A.C. *The biochemistry of fruits and their products*, New York: Academic Press, 1971. p. 107-169.
- TING, S.V.; DESZYCK, E.J. Total amino acid content of chilled orange juice and frozen orange concentrate. **Proc. Fla. State Hortic. Soc.**, v. 73, p.252-257, 1960.
- TING, S.V.; ROUSEFF, R.L. *Citrus fruit and their products*. New York: Marcel Dekker, 1986. 293 p.
- TOCCHINI, R.P.; NISIDA, A.L.A.C. **Industrialização de refrigerantes**: Manual. Campinas: ITAL, 1995. 50p.
- TOCCHINI, R.P.; NISIDA, A.L.A.C.; MARTIN, Z.J. **Industrialização de polpas, sucos e néctares de frutas**: Manual. Campinas: ITAL, 1995. 85 p.
- TODA FRUTA. Variedades de Laranja para Indústria. In: Disponível em: <<http://www.todafruta.com.br>> Acesso em: 29 set. 2004.

- TOLEDO, M.R.; CASTILLO, R. **Grandes empresas e uso corporativo do território: o caso do circuito espacial produtivo da laranja**, Disponível em: Acesso em: 20 set. 2004.
- UDENFRIEND, S.; LOVENBERG, W.; SJOERDSMA, A. Physiologically active amines in common fruits and vegetables. **Arch. Biochem. Biophys.**, v.85, p.487-490, 1959.
- VALE, S.; GLÓRIA, M.B.A. Determination of biogenic amines in cheese. **J. AOAC Int.**, v. 80, n. 5, p. 1006-1012, 1997.
- VANDERCOOK, C. Nitrogenous compounds. In: NAGY, S.; SHAW, P.E.; VELDHUIS, M.K. *Citrus science and technology*. Westport, 1977.
- VANDERCOOK, C.E.; PRICE, R.L. The application of amino acid composition to the characterization of citrus juice. *J. Food Sci.*, v. 37 p. 384-386, 1972.
- VANDERCOOK, C.E.; PRICE, R.L. Rapid determination of γ -aminobutyric acid and arginine in orange juice: Application to detecting adulteration. **J. AOAC**, v. 57, n. 1, p. 124-129, 1974.
- VANDERCOOK, C.E.; PRICE, R.L.; HARRINGTON, C.A. Multiple automated analysis for orange juice content: Determination of total sugars, reducing sugars, total acidity, total amino acids and phenolics. **J. AOAC**, v. 58, n. 3, p. 482-487, 1975.
- VARNAM, A.H.; SUTHERLAND, J.P. *Bebidas: tecnología, química y microbiología*, Zaragoza: Acribia, 1997. 487 p.
- VELDHUIS, M.K. Orange and tangerine juices. In: TRESSLER, D.K. *Fruit and vegetable juice: processing, technology*. Westport: AVI Publishing, 1961.
- VIEIRA, S.M.; TAVARES-NETO, J.; GLÓRIA, M.B.A. Ion-pair HPLC for the determination of synephrine, octopamine and tyramine in orange juice and soft drink. **J. Chromatogr. A**, 2007 (*in press*).
- WALTERS, D.R. Polyamines and plant disease. **Phytochem.**, v. 64, n. 1, p. 97-107, 2003.
- WHEATON, T.A.; STEWART, I. Quantitative analysis of phenolic amines using ion-exchange chromatography. **Anal. Biochem.**, v. 12, p. 585-592, 1965.
- WHEATON, T.A.; STEWART, I. Biosynthesis of synephrine in citrus. **Phytochem.**, v. 8, p. 85-92, 1969.
- WHEATON, T.A.; STEWART, I. The distribution of tyramine, N-methyltyramine, hordenine, octopamine and synephrine in high plants. **Lloydia**, v. 33, p. 244-254, 1970.
- WIDMER, W.W.; CANCALON, P.F.; NAGY, S. Methods for determining the adulteration of citrus juices. **Trends Food Sci. Technol.**, v. 3 p. 278-286, 1992.

- XIANG, D.X.; ZHAO, X.Y.; CHEN, X.Z.; TAN, Z.R.; XIE, W.B. Quantitative analysis of synephrine in zhishi injection by RP-HPLC. **Yakugaku Zasshi**, v.110, n.1, p.82-84, 1990.
- ZEE, J.; SIMARD, R.E.; HEUREUX, L.L. Evaluation of analytical methods for determination of biogenic amines in fresh and processed meat. **J. Food Protec.**, v. 46, n. 12, p. 1044-1049, 1983.