

# IMPLANTAÇÃO DO MÉTODO PARA ANÁLISE CROMATÓGRAFICA DE LIMONIN EM INDÚSTRIA DE SUCOS CONCENTRADOS DE LARANJA E LIMÃO

## AUTORES

**Francisco dos Santos NETO**

Discente do Curso de Engenharia de Alimentos- UNILAGO

**Silvia Messias BUENO**

Docente do Curso de Engenharia de Alimentos- UNILAGO

## RESUMO

Considerando o crescimento socioeconômico proporcionado pela citricultura brasileira e o reconhecimento da alta qualidade do suco de laranja originário do Brasil, a fim de entrar neste mercado produtor e exportador, as indústrias buscam cada vez mais recursos e técnicas para melhorar e refinar seu processo, de maneira que consigam agradar e estar dentro dos padrões estabelecidos pelos consumidores e consigam entregar um bom produto final a estes. Dentre os recursos e técnicas que são utilizadas pelas empresas, têm-se a análise cromatográfica, que fornece subsídios para que se encontre, por meio desta, as características específicas e que podem ser solicitadas por um cliente, em uma amostra de suco. Dessa maneira, tendo em vista os vários tipos de análises cromatográficas existentes, o presente trabalho mantém seu enfoque na cromatografia líquida, e objetiva analisar a implantação do método de análise cromatográfica líquida de Limonin em uma indústria de sucos concentrados de laranja e limão, concluindo-se que essa implantação consiste em uma ferramenta de grande valia para que as empresas encontrem o produto final que atenda as especificações realizadas pelos clientes.

## PALAVRAS - CHAVE

Suco; Cromatografia; Limonin.

## 1. INTRODUÇÃO

Suculenta, doce, rica em vitamina C e um pouco azedinha, a laranja é amplamente consumida, seja in natura, em forma de suco ou como ingrediente de pratos diversos, sendo uma das frutas mais populares no mundo. Em estudos de pesquisa recentes, as propriedades de cura de laranjas foram associadas com uma grande variedade de compostos de fitonutrientes. Estes fitonutrientes incluem flavanonas citrinas (tipos de flavonoides que incluem as moléculas de hesperitina e naringenina), antocianinas, ácidos hidroxicinâmicos, e uma variedade de polifenóis. Quando estes fitonutrientes são estudados em combinação com laranjas-vitamina C, as propriedades antioxidantes significativas deste fruto são compreensíveis (OPAS, 2017).

O limão é boa fonte de fibras e vitamina C, além de conter outras vitaminas (tiamina, riboflavina) e minerais (fósforo, silício, cálcio e ferro). Grande parte dos seus benefícios estão vinculados a uma substância presente na casca, chamada d-limoneno (rica em flavonoides). Esses flavonoides possuem ação antioxidante que previne a ação dos radicais livres, podendo também agir como redutores, interruptores de radicais livres, inibidores ou supressores de oxigênio singlete e como inativadores de metais pró-oxidantes. (BELEZA E SAÚDE, 2017; JORGE & LUIZA, 2010).

A agroindústria do setor cítrico tem importância reconhecida na economia brasileira, principalmente devido à sua grande participação na produção e exportação mundial de suco de laranja concentrado e congelado (FCOJ – Frozen Concentrated Orange Juice). Outros produtos, desse mesmo setor, também representam uma fatia considerável do mercado agroindustrial como os pellets de polpa cítrica, as frutas in natura, o suco natural pronto para beber e os óleos essenciais (COSTA et al, 2004).

Segundo Neves, Trombin e Milan (2010), o suco de laranja originário do Brasil tornou-se reconhecido por possuir uma qualidade elevada e o principal produto exportado é o FCOJ (*Frozen Contrated Orange Juice*), com 66° Brix, mas que, aos poucos, vêm dando lugar as crescentes exportações de NFC (*Not From Concentrate*), que se torna preferido dos consumidores por possuir um paladar mais agradável e imagem mais saudável, se assemelhando ao suco natural e espremido na hora, e a sua exportação passa a corresponder a uma média de 13% do total exportado pelo Brasil. No entanto, com 11,5° Brix, o NFC requer, ao longo do processo de produção, um investimento três vezes superior ao que é necessário para o FCOJ.

O desenvolvimento do sabor amargo após o processamento dos sumos de citrus advém principalmente de um triterpenóide tetracíclico denominado de limonin e de um flavonóide naringina. O limonin é amargo e encontra-se em maiores concentrações em porções não comestíveis dos citrinos (por exemplo, casca e sementes), possuindo uma capacidade de solubilidade em água limitada (SILVA, 2010).

Os precursores do Limonin ocorrem, naturalmente, no albedo e na polpa da laranja, com isso, após o processamento, algumas enzimas iniciam a transformação desses precursores em Limonin e, conseqüentemente, aparece o sabor amargo no suco. Tendo em vista que se sabe que os baixos níveis de Limonin estão associados a boa qualidade da fruta/produto, antes de essa passar pelo processo de produção, realiza-se a análise de Limonin da mesma, a fim de que essa amargues seja evitada no produto final (HASEGAWA; MIYAKE, 1996).

A cromatografia consiste no meio físico-químico de separação dos componentes de uma mistura. São realizadas por meio da distribuição desses componentes em duas fases imiscíveis, móvel e estacionária, essa separação ocorre, pois as substâncias que estão presentes na mistura possuem propriedades diferentes de

composição e, assim, a interação dessas propriedades e composições com as duas fases imiscíveis, também pode ser diferentes, uma vez que a velocidade com que uma migra pode vir a ser maior e a de outra. É o estado físico da fase móvel que caracteriza o tipo de análise cromatográfica a ser realizada, líquida, gasosa ou de massa (FOGAÇA, 2015; PESSOA, 1993).

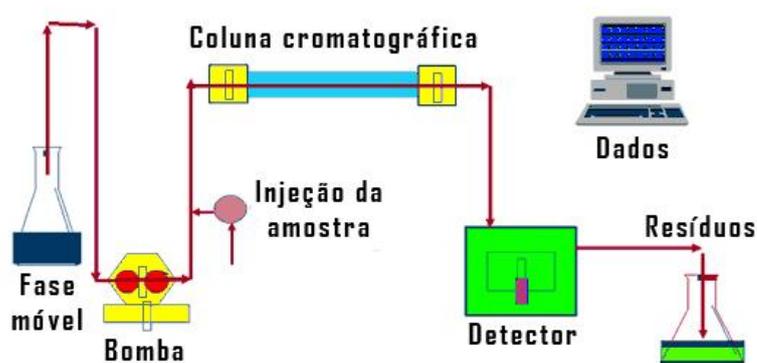
Salatino (2016) afirma que, em relação a HPLC (*High Performance Liquid Chromatograph*, ou CLAE, Cromatografia Líquida de Alta Frequência), a mesma deve ser utilizada para separar misturas de compostos semelhantes, sendo processada em temperaturas que estejam pouco acima da ambiente, separando substâncias termicamente instáveis, e para a mesma são utilizadas, normalmente, colunas metálicas e pressões de fase móvel, os líquidos, elevadas, e que são obtidas através do auxílio de uma bomba de alta pressão, e, para a autora, a característica da amostra de HPLC é ser solúvel na fase móvel, tendo, em seu mecanismo de separação, a competição entre as moléculas da fase móvel pelos sítios ativos da fase estacionária, sendo considerada uma cromatografia de partição e com eluição por gradiente, de modo que haja o aumento da polaridade da fase móvel por meio da retenção da amostra na fase estacionária.

A sua fase móvel consiste em um solvente que dissolva a amostra sem qualquer interação química entre ambas, tendo alto grau de pureza e ser de fácil purificação, para que se possa fazer análises de alta sensibilidade, pois as impurezas podem interferir na detecção do analito por ultravioleta (UV). Já para a fase estacionária devem ser utilizados sólidos ou semirrígidos, cujas partículas, que são porosas esféricas ou irregulares, devem apresentar diferentes diâmetros e suportar uma pressão de até 350 bar sobre a coluna cromatográfica, feita de um material inerte e que resista a todas as pressões nas quais ela será utilizada, em que a capacidade é determinada por seu comprimento, diâmetro e pelo material de recheio (PERES, 2002).

Ao se tratar de HPLC, os componentes do aparelho devem ser: uma bomba, a coluna cromatográfica, o detector e o registrador e, sobre esses componentes, Malviya et al. (2010), discorre que a bomba movimenta a fase móvel e a amostra através da coluna; na coluna cromatográfica está contida a fase estacionária, que pode ser formada pelas partículas sólidas, porosas e esféricas, com um diâmetro de cerca de 35 µm; já o detector mostra o tempo em que as moléculas ficam retidas, e esse tempo de retenção é variável de acordo com as interações da amostra e com as fases estacionárias e móveis; e, por fim, o registrador aponta os resultados obtidos.

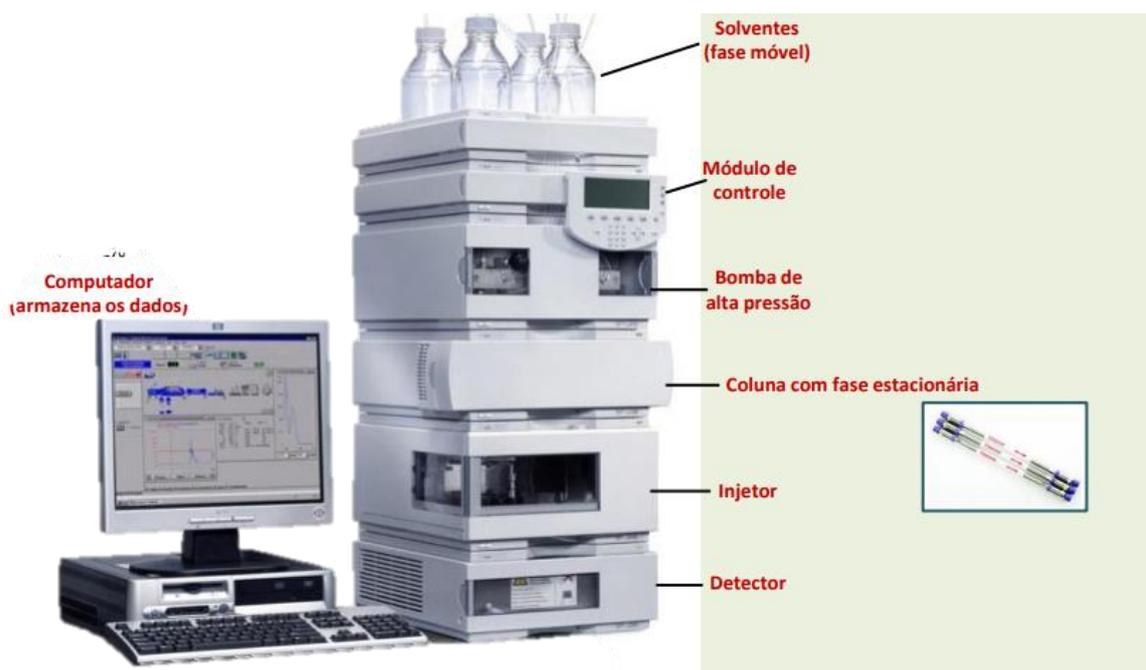
O esquema de análise do cromatógrafo é representado pela Figura 1 e o cromatógrafo líquido utilizado na empresa em questão, pela Figura 2.

Figura 1 - Desenho esquemático das etapas de um cromatógrafo



Fonte: NICÉSIO, 2012

Figura 2 - Cromatógrafo Líquido da Agilent



Fonte: SALATINO, 2016.

A matéria-prima processada, no caso a laranja, apresenta grande influência na indústria de processamento de suco. Como se trata de uma matéria-prima agrícola, dependente de inúmeros fatores naturais, torna-se impossível estabelecer uma homogeneização da fruta que entra no processo. É papel da indústria de suco, portanto, estar constantemente alterando seu processo de produção para conseguir um melhor aproveitamento desta matéria-prima, viabilizando a produção de um mix de diferentes tipos de suco, que atende um mercado cada vez mais exigente (COSTA et al, 2004).

Assim, a fim de entrar neste mercado produtor e exportador, as indústrias buscam, cada vez mais, recursos e técnicas para melhorar e refinar seu processo, de maneira que consigam agradar e estar dentro dos padrões estabelecidos pelos consumidores e consigam entregar um bom produto final a estes e, dentre os recursos e técnicas que são utilizadas pelas empresas, têm-se a análise cromatográfica, que fornece subsídios para que se encontre, por meio desta, as características específicas e que podem ser solicitadas por um cliente, em uma amostra de suco.

O presente trabalho mantém seu enfoque na Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, e objetiva, a utilização da cromatografia pois, esta pode ser considerada um método de análise bastante versátil e de grande aplicabilidade nas empresas para a análise de Limonin em uma indústria de sucos concentrados de laranja e limão.

## **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1. Análise do Limonin**

Para a análise de Limonin seja feita de maneira correta, implantou-se um procedimento para a análise dessas, cujo princípio visa determinar o Limonin dos sucos cítricos a partir dos resultados que podem ser obtidos através do método analítico por Cromatografia líquida. Assim, conforme será visto abaixo, há uma listagem de materiais e equipamentos que devem ser utilizados, bem como soluções e reagentes e o procedimento para o preparo do padrão da amostra, da extração do Limonin, da configuração HPLC/UV e um modelo de cromatograma.

#### **2.1.1. Materiais e Equipamentos**

- Tubos para centrífuga;
- Centrífuga;
- Cartuchos SPE-C18;
- Manifold
- Béquer;
- Pipeta volumétrica;
- Cromatógrafo líquido;
- Balão volumétrico;

#### **2.1.2. Soluções e Reagentes**

- Acetonitrila (HPLC);
- Água (HPLC);
- Limonin (HPLC);
- Etanol (HPLC);

#### **2.1.3 Procedimento**

Como procedimento, deve-se, primeiro, realizar o preparo do padrão, o preparo da amostra, a extração do Limonin e, por fim, as configurações do HPLC/UV.

##### **2.1.3.1 Preparo do Padrão**

O padrão consiste em analisar a amostra, uma solução conhecida, em que se sabe a concentração em ppm do Limonin e que depois é utilizado para comparar com os resultados obtidos das amostras analisadas. Para o seu preparo deve-se seguir a seguinte ordem:

- Pesa-se 0.005 g de Limonin (HPLC), diluir em 0.5 ml de Acetonitrila e transferir para um balão volumétrico de 50 ml;
- Completa-se o volume com etanol (HPLC), (Solução de 100 ppm);
- Transfere-se 1 ml da Solução de 100 ppm para um balão de 10 ml;
- Completa-se o volume com a mesma proporção da fase móvel (35% de acetonitrila / 65% de água de grau HPLC), este é o padrão de 10 ppm.;
- Filtra-se em filtro para seringa (0.20 µm).
- Transfere-se para o vial.

### 2.1.3.2. Preparo da Amostra

A amostra consiste no suco que será analisado. Para o seu preparo deve-se seguir a seguinte ordem:

- Reconstitui-se a amostra de suco concentrado de laranja para 11,50 +/- 0,02 ° e para suco de limão concentrado, 8,0 +/- 0,02 ° Brix.
- Transfere-se a amostra para o tubo de centrífuga.
- Centrifuga-se as amostras durante 20 minutos a 14.500 RPM.
- Retira-se o sobrenadante do tubo da centrífuga para extração em fase sólida (Cartucho SPE-C18).

### 2.1.3.3. Extração do Limonin

O Limonin é extraído da amostra preparada anteriormente. Para que se realize a sua extração, utiliza-se o cartucho SPE, que é acondicionado para a extração do Limonin; assim, primeiro, deve ser realizada a fase sem coleta, em que as soluções são descartadas no Manifold, para isso, deve-se seguir os seguintes passos:

- 5 ml acetonitrila a 100%, (não deixar secar o cartucho);
- 5 ml de água HPLC, (não deixar secar o cartucho);
- 5 ml da amostra, (pode-se utilizar o vácuo, caso necessário);
- 5 ml de água HPLC;

Já para a fase com coleta, no final da qual a amostra será coletada e injetada na máquina para análise, deve-se:

- 5 ml de acetonitrila para coletar fração de Limonin na amostra com pipeta volumétrica, recolher a amostra em balão volumétrico de 5 mL;
- Filtrar em filtro para seringa (0.20 µm);
- Analisar cada amostra no sistema HPLC

#### 2.1.3.4. Configurações HPLC/UV

A última etapa são as configurações do HPLC/UV, que consiste no modo como a máquina será programada para a obtenção dos resultados. Nesta etapa deve-se:

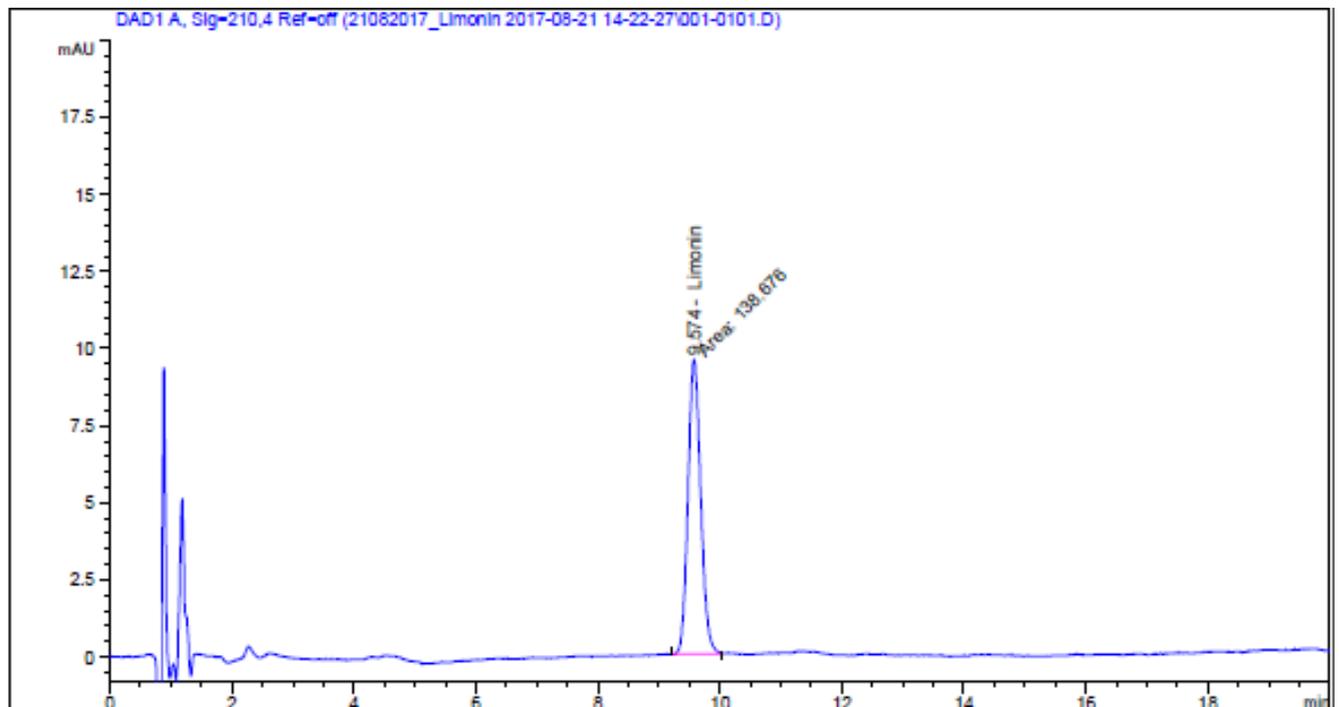
- Coluna: Waters XTERRA RP18 (5 µm, 4,6 x 250 mm), ou semelhante;
- Aquecimento da coluna: 40 ° C;
- Detector: UV detector ajustado a 210 nm;
- Fase móvel: 35% de acetonitrila / 65% de água de grau HPLC;
- Fluxo: 1,0 ml / min;
- Injeção: 10 µl
- Tempo de execução: 20 minutos

Os resultados finais são expressos em ppm (mg/L).

#### 2.1.3.5 Cromatograma

Após a configuração do HPLC/UV, obtêm-se o cromatograma, que consiste nos resultados obtidos da análise por meio de um gráfico e que está representado por meio da Figura 3 um cromatograma de amostra padrão, em que através do pico descobre-se o tempo de retenção em que aparecerá o Limonin no cromatograma da amostra.

Figura 3 - Cromatograma de padrão de Limonin



Fonte: AUTOR, 2017

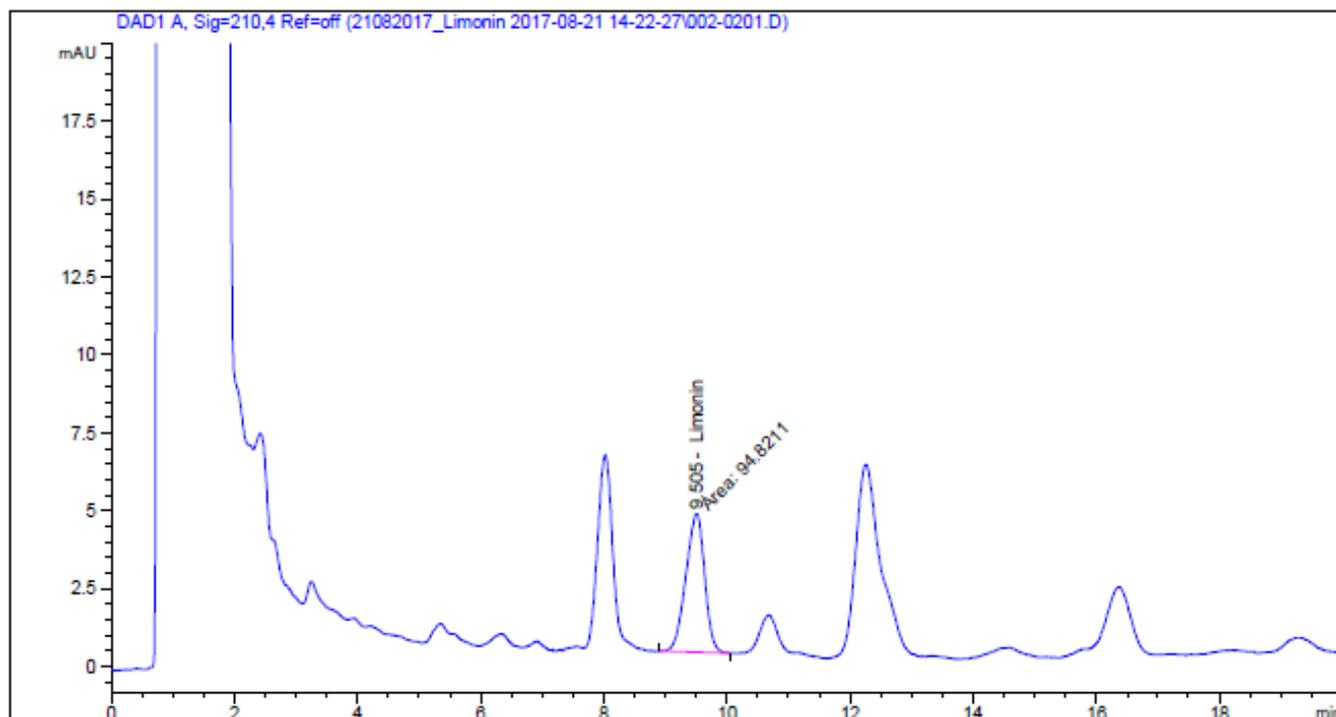
### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O cromatógrafo considera as duas amostras, a padrão, que consiste no resultado já conhecido, e a de suco, que consiste no resultado que será identificado, comparando-as, de maneira que o pico existente na amostra padrão indique o tempo de retenção do Limonin, e que, posteriormente, serve como referência para identificação da presença do componente na amostra de suco da empresa.

A Figura 4 apresenta o cromatograma que indica a presença de Limonin na amostra de suco produzido pela empresa. Entende-se, assim, que a partir da análise e da obtenção desses resultados, a empresa consegue quantificar o Limonin presente em seu produto final, podendo, dessa maneira, direcionar aos clientes o produto que esteja de acordo com as especificações que sejam exigidas pelos mesmos no ato da compra.

Diante dos dados abordados ao longo do trabalho e dos resultados obtidos, entende-se que, considerando o mercado produtor e exportador as empresas devem recorrer, cada vez mais, a recursos e técnicas que melhorem e refinem seu processo oferecendo produtos de melhor qualidade. Assim, compreende-se que análise cromatográfica fornece os subsídios necessários para que sejam encontradas as características específicas solicitadas pelos clientes no produto final.

Figura 4 - Cromatograma de amostra de Limonin



#### 4. CONCLUSÃO

Pode-se concluir que a implantação do método de análise cromatográfica de Limonin, consiste em uma ferramenta de grande valia para que as empresas encontrem o produto final que atenda as especificações realizadas pelos clientes.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BELEZA e SAUDE. **10 Benefícios do Limão para a Saúde**. 2017. Disponível em: <https://belezaesaude.com/beneficios-limao/>. Acesso em: 16 de Out. 2017.

COSTA, R. C. B.; TORRES, I.; CAMAROTTO, J. A.; COSTA, M. A. B.; MENEGON, N. L. **A simulação de sistemas como ferramenta de análise da influência da variabilidade da matéria-prima na produtividade da agroindústria do setor cítrico**. XI SIMPEP. Bauru, 2004.

FOGAÇA, J. R. V. **Análise Cromatográfica ou Cromatografia**. 2015. Disponível em: <http://mundoeducacao.bol.uol.com.br/quimica/analise-cromatografica-ou-cromatografia.htm>. Acesso em: 11 set. 2017.

HASEGAWA, S.; MIYAKE, M. Biochemistry and biological functions of citrus limonoids. **Food Reviews International**, v.12, p.413-435, 1996.

JORGE, N. LUZIA, D. M.M. Potencial Antioxidante de Extratos de Sementes de Limão (*Citrus Limon*). **Ciencia e Tecnologia de Alimentos**. v.30. p. 489-493.2010.

MALVIYA, R.; BANSAL, V.; PAL, O. P.; SHARMA, P. K. High performance liquid chromatography: a short review. **Journal of Global Pharma Technology**, v. 2, p. 2226, 2010. Disponível em: [https://www.researchgate.net/profile/Rishabha\\_Malviya2/publication/235987484\\_High\\_performance\\_liquid\\_chromatography\\_A\\_short\\_review/links/02e7e5153e680408ac000000/High-performance-liquid-chromatography-A-short-review.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Rishabha_Malviya2/publication/235987484_High_performance_liquid_chromatography_A_short_review/links/02e7e5153e680408ac000000/High-performance-liquid-chromatography-A-short-review.pdf). Acesso em: 18 set. 2017.

NEVES, M. F.; TROMBIN, V. G.; MILAN, P. **O retrato da citricultura brasileira**. 2010. Centro de Pesquisa e Projetos em Marketing e Estratégia. FEA /USP Ribeirão Preto. Disponível em: [http://www.citrusbr.com.br/download/biblioteca/Apresentacao\\_Marcos\\_Fava\\_evento\\_valor.pdf](http://www.citrusbr.com.br/download/biblioteca/Apresentacao_Marcos_Fava_evento_valor.pdf) Acesso em: 18 set. 2017.

NICESIO, R. G. **Conheça os métodos cromatográficos**. 2012. Disponível em: <http://www.biomedicinabrasil.com/2012/10/metodos-cromatograficos.html>. Acesso em: 18 set. 2017.

PERES, T. B. Noções básicas de Cromatografia. **Biológico**, São Paulo, v.64, n.2, p.227-229, jul./dez., 2002. Disponível em [http://www.biologico.sp.gov.br/docs/bio/v64\\_2/peres.pdf](http://www.biologico.sp.gov.br/docs/bio/v64_2/peres.pdf). Acesso em: 11 set; 2017.

OPAS, **A Laranja e seus benefícios a Saúde**. 2017. Disponível em: <https://www.opas.org.br/a-laranja-e-seus-beneficios-a-saude/>. Acesso em 16 de Out. 2017.

PESSOA, J. C. **Cromatografia – Técnicas Experimentais**. Química. 1993.

SALATINO, M. L. **Técnicas Básicas de Cromatografia**. 2016. Disponível em: <[https://edisciplinas.usp.br/pluginfile.php/1842690/mod\\_resource/content/1/Aula%20%20-%20T%C3%A9cnicas%20de%20cromatografia.pdf](https://edisciplinas.usp.br/pluginfile.php/1842690/mod_resource/content/1/Aula%20%20-%20T%C3%A9cnicas%20de%20cromatografia.pdf)>. Acesso em: 24 set. 2017.

SILVA, S. I. C. V. **Limonina em Citrinos: Análise, Bioconversão e Bioactividade**. Dissertação de Mestrado em Controlo da Qualidade e Toxicologia dos Alimentos. Faculdade de Farmácia. Universidade de Lisboa. 2010.