

CAROTENOIDS IN DIFFERENT VARIETIES OF CITRUS: COMPOSITION AND BIOACCESSIBILITY

Dra. Adriana Z. Mercadante

Faculdade de Engenharia de Alimentos-UNICAMP

Color of most citrus varieties is due to carotenoids, while anthocyanins are responsible for the red color of blood oranges. The low number of citrus varieties cultivated in Brazil favors the occurrence of phytosanitary disorders, and to overcome this problem, new hybrid varieties have been developed by the Agronomic Institute of Campinas (IAC). In this sense, the carotenoid composition of new hybrid varieties between tangor cv. 'Murcott' (TM) and orange cv. 'Pera' (LP) at different ripening stages will be shown, along with the composition of juices from cv. 'Cara Cara' and 'Bahia'. Carotenoids are naturally found in both free form and esterified with fatty acids in nature, especially in fruits. However, up to now, the great majority of studies only evaluated their composition after saponification since esterification increases possible natural variation of structures since one carotenoid can be acylated with different fatty acids. This fact is easily explained by the difficulty to analyze carotenoid esters because the carotenoid chromophore remains unchanged with esterification and due to their concomitant extraction with triacylglycerols, which impair mass spectrometry detection. Native carotenoid composition of carotenoids in oranges cv. 'Valencia', LP and TM was determined, and most compounds were reported for the first time in these samples. In orange varieties (LP and LV), 9 free carotenoids, 38 monoesters and 60 diesters were identified, and the major compounds were violaxanthin, luteoxanthin and antheraxanthin derivatives. In TM, 8 free carotenoids, 34 monoesters and 33 diesters were identified, and β -cryptoxanthin and violaxanthin esters were the major compounds. In those citrus samples, carotenoids were esterified mainly with lauric, myristic, palmitic, palmitoleic and oleic acids. Composition alone is not enough anymore and bioaccessibility and bioavailability studies are necessary. Carotenoid bioaccessibility is an early but crucial step for the bioavailability of these compounds. After ingestion, carotenoids must be released from the food matrix, solubilized in the lipid emulsion droplets and transferred into mixed micelles to be taken up by cells in the small intestine and packaged in chylomicrons to reach target tissues. *In vitro*

studies may simulate the sequence of events that occur in human gastrointestinal tract during digestion, and when applied to carotenoids, consistent results were achieved in comparison to *in vivo* trials carried out with humans and animals. For this purpose, we adapted and validated for carotenoids the consensus method proposed by an action of the European Cooperation in Science and Technology (COST) called INFOGEST. The composition and bioaccessibility of carotenoids (carotenes, free and esterified xanthophylls) were determined for the first time in mandarin cultivars harvested in Brazil. Differences in the carotenoid content and the major compound were observed among cultivars. Bioaccessibility was strongly influenced by mandarin cultivar and carotenoid polarity. Bioaccessibility of (all-*E*)- β -cryptoxanthin was higher than that of its esters and that of (all-*E*)- β -carotene in all the cultivars. The low bioaccessibility values are in the range of values reported in literature and therefore determination of the limiting step for carotenoid absorption should be further investigated.

FRUTAS CÍTRICAS E MODULAÇÃO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA

Dr. Marcelo Macedo Rogero

Faculdade de Saúde Pública-USP

A resposta inflamatória não é apenas induzida por microrganismos, uma vez que esta pode ser desencadeada por obesidade ou diabetes, entre outras condições clínicas, as quais promovem aumento da concentração plasmática de biomarcadores inflamatórios, como citocinas pró-inflamatórias (incluindo TNF-alfa e IL-6) e proteínas de fase aguda (proteína C reativa e proteína sérica amiloide A, dentre outras). No tocante à obesidade, destaca-se a existência de correlação positiva entre a massa de tecido adiposo e a expressão do gene que codifica o TNF-alfa em adipócitos. Nesse contexto, constata-se que o TNF-alfa causa resistência à insulina por inibir a fosforilação do resíduo de tirosina presente na proteína denominada substrato do receptor de insulina 1 (IRS-1). Outros mecanismos de inibição da fosforilação do IRS-1 por mediadores inflamatórios incluem a ativação crônica das proteínas denominadas Jun N-terminal quinase (JNK), proteína quinase C (PKC) e quinase do inibidor do kappa B (IKK)- β . Além da síntese do TNF-alfa, o tecido adiposo produz outras adipocinas, como a resistina, a adiponectina, a leptina e a proteína quimiotática para monócitos 1 (MCP-1), as quais exercem efeitos em diversas vias metabólicas, bem como na resposta inflamatória.

As frutas são ricas em compostos fenólicos como os flavonoides, que em estudos epidemiológicos, clínicos e *in vitro*, foram relacionados às atividades antioxidante e anti-inflamatória, indicando papel benéfico desses compostos na redução do risco de doenças crônicas não transmissíveis. Os flavonoides estão presentes em grande proporção em frutas cítricas. Dentre as várias espécies conhecidas, a laranja é a fruta mais produzida e consumida no Brasil, contendo concentrações significantes dos flavonoides hesperitina e naringerina, que tanto *in vitro* com *in vivo*, apresentaram atividade antioxidante e anti-inflamatória. Descobertas recentes revelaram que os compostos fenólicos podem interagir com cascatas de sinalização celular que regulam a atividade de fatores de transcrição e, conseqüentemente, afetar a expressão de genes que regulam, por exemplo, a resposta inflamatória.

Laranja e Nutrição Infantil

Prof. Dr. Rubens Feferbaum

Departamento de Pediatria e Instituto da Criança do HC da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

Frutas são alimentos de grande importância na composição da dieta. São ricas em micronutrientes e apresentam baixa densidade energética. Possuem além das fibras, compostos bioativos com propriedades funcionais, como polifenóis, flavonóides, antocianinas, entre outros. Consumir sucos de frutas tornou-se uma maneira prática e agradável de refrescar e beneficiar de forma saudável o organismo. Além de disponibilizar água que ajuda na hidratação e balanço hídrico, contém os nutrientes provenientes da fruta necessários à saúde. A Estratégia Global sobre Alimentação Saudável, Atividade Física e Saúde, elaborada pela OMS, recomenda o aumento do consumo de frutas, legumes e verduras dentre as recomendações para prevenção de doenças crônicas não transmissíveis. A Organização Mundial da Saúde define como adequado o consumo mínimo de 400 gramas por dia de frutas, verduras e legumes, o equivalente a cinco porções diárias. A Pirâmide Alimentar, reeditada em 2013 e o Programa “5 ao dia” indicam o suco de frutas como opção para atingir 1 das porções recomendadas diariamente do grupo de frutas, verduras e legumes. A Sociedade Brasileira de Pediatria recomenda o consumo diário e variado de frutas, verduras e legumes (> 5 porções/ dia) e considera no grupo de frutas o consumo alternativo de sucos naturais para atingir o recomendado. Ressalta ainda que quando consumidos, 180ml de suco é o equivalente a uma porção de fruta. A American Academy of Pediatrics (AAP) reconhece que a vitamina C e os flavonóides em sucos podem ter efeitos benéficos para a saúde em longo prazo, porém em volumes diários de 120 a 240 mL/dia conforme a faixa etária e pasteurizado quando não fresco. O programa de suplementação alimentar WIC (Women, Infant Children) patrocinado pelo departamento de agricultura norte americano (USDA) recomenda sucos de frutas como importante alimento na complementação nutricional dos segmentos populacionais atendidos. A laranja e o suco dela proveniente devido ao alto teor de vitamina C aumenta a absorção de ferro e fornecem vitaminas, minerais, micronutrientes e compostos bio ativos como os flavonóides e hesperidina. Suco

de laranja é um importante veículo na fortificação e enriquecimento de nutrientes frequentemente em falta na alimentação de crianças e adolescentes. A tecnologia atual permite aditivção do suco com minerais como o cálcio, vitaminas D, ácido fólico, vitamina E e mesmo ácidos graxos de cadeia longa da série ômega-3 como o DHA (docosahexaenóico) importantes no desenvolvimento cognitivo das crianças. Uma preocupação relacionada ao consumo de suco de frutas refere-se ao excesso de calorias e conseqüente obesidade. O Dietary Guidelines Advisory Committee 2010 revisou estudos longitudinais que relacionavam o suco 100% com adiposidade em crianças e concluiu que as evidências são inconsistentes e limitadas de que o consumo do suco 100% pela maioria das crianças esteja associado com o aumento da adiposidade quando consumidos em quantidades apropriadas para a idade e de acordo com diversas metanálises relacionadas à ingestão de sucos em quantidades recomendadas. Desta forma suco de laranja apresenta propriedades nutricionais e bioativas; quando consumido em volumes apropriados e sem adição de açúcares é importante aliado na composição de uma dieta saudável para crianças e adolescentes.

PHARMACOLOGICAL OPPORTUNITIES WITH CITRUS POLYMETHOXYFLAVONES

Dr. Thais Borges Cesar

Faculdade de Ciências Farmacêuticas-UNESP Araraquara

A diet rich in fruits and vegetables is associated with an improvement in the biochemical and molecular profile that confers protection against chronic diseases such as cardiovascular, diabetes, metabolic syndrome, cancer and neuro degenerative diseases. In citrus fruits, there is a class of potentially active compounds, called polymethoxyflavones (PMFs), which are associated with the lower risk of chronic diseases. The most prevalent PMFs in citrus fruits are tangeretin (4',5,6,7,8-pentamethoxyflavone) (TAN) and nobiletin (3',4',5,6,7,8-hexamethoxyflavone) (NOB). They are located inside the citrus fruits mainly in the flavedo or peel, seeds and, in small amounts, inside the juice vesicles, particularly in *Citrus reticulata* (tangerine), *Citrus sinensis* (sweet orange), *Citrus paradisi* (grapefruit) and *Citrus aurantium L.* (orange bitter).

Citrus PMFs are flavones with two or more methoxyl groups (OCH₃) on their basic benzo-γ-pyrone skeleton with a carbonyl group. Maximum number of the methoxyl groups can be up to seven, and their A, B and C rings are sometimes substituted with hydroxyl group (OH). Tetramethoxyflavone is the most common type, while only 2 types of heptamethoxyflavones have been reported. Among PMFs compounds, NOB and TAN are the most widely studied PMFs, since they are abundant in citrus plants along with pronounced pharmacological activities.

TAN was first was crystallized from tangerine oil in 1934, and since then many experimental studies have associated TAN with an improvement in cardiometabolic risk factors. In obese mice TAN was able to reduce body weight, glucose intolerance, and inflammatory markers. TAN also helped regulate key enzymes of the carbohydrate metabolism, reducing glycosylated hemoglobin in diabetic rats. NOB has gained attention for its anticancer activity in colon tumor and by its hypolipidemic activity in vitro, and by decreasing brain ischemia damage in rats, by its anti-inflammatory activity.

Although PMFs show great potential as therapeutically agents for cancer or metabolic disease prevention, they are not used by the medical practitioners in the Western Hemisphere. Several major barriers against PMF use are the low oral bioavailability of these compounds, and hence the very low concentrations

of these compounds in systemic circulation. Recently, new formulas for oral administration have been created to enhance bioavailability and delivery of the compounds. A few studies have now shown better efficacy of PMF uptake through the use of lipid suspensions, emulsions and nanoparticles. Beyond this, additional human clinical trials are needed to unequivocally establish the effectiveness of these compounds in various disease settings, although many small animal trials have well established their effectiveness. Furthermore, it is also necessary to better understand the roles of PMF metabolites in the biochemical and molecular events, particularly in pathways associated with cancer cell proliferation, lipid biosynthesis, inflammation, and neuroprotective effects. New pharmacological opportunities to combat degenerative diseases in humans may arise if it is discovered that the metabolites of the PMFs also play substantial roles in fighting these diseases.

EVIDENCES AND RESEARCH STRATEGIES OF CITRUS POLYPHENOLS ON HEALTH BENEFITS

Dr. Francisco A. Tomás-Barberán

Quality, Safety and Bioactivity of Plant Foods, CEBAS-CSIC, P.O. Box 164, Espinardo, 30100, Murcia, Spain. E-mail: fatomas@cebas.csic.es

Citrus fruits are the main dietary source of flavanones, and they have been associated with the health benefits observed after the intake of citrus fruits, juices, and extracts. The demonstration of the health effects, however, has been a difficult task, as there are dissimilar results in the effects observed in the available clinical trials. This is due to the large inter-individual variability observed in the health effects biomarkers, as this has been recently evidenced in the European COST action POSITIVE (<https://www6.inra.fr/cost-positive>). Pharmacokinetic studies with citrus flavanones show that they are only absorbed after the intervention of the gut microbiota, and also show a large inter-individual variation, as could be expected for a large disparity in the colon microbiome composition and function. This means that if flavanones are the bioactive compounds in citrus fruits, and their ADME is subjected to large inter subject variability, it is therefore possible to find individuals that respond to the citrus flavanone treatment, while others are non-responders. Therefore, stratification of volunteers in clinical trials with citrus products for their systemic exposure to flavanones and their gut microbiota metabolites would be an essential task to identify those groups that respond better to the intervention. A system for the stratification of individuals regarding the exposure to citrus flavanones is suggested.

Technological and biotechnological treatments in order to improve flavanone bioavailability and overall response to flavanone intake are proposed. These include advanced technological processes, encapsulations and particle reduction strategies, as well as the use of probiotic bacteria to improve flavanone bioavailability.

These individual, technological and biotechnological factors are very relevant to be considered in a world facing personalized nutrition.

ORANGE JUICE CONSUMPTION – WORLDWIDE PERSPECTIVE

Dra. Larissa Popp Abrahão

Diretora de Relações Internacionais – Associação Nacional dos Exportadores de Sucos Cítricos - CitrusBR

Brazil is the biggest producer and exporter of Orange juice in the world. From every 5 glasses of Orange juice consumed in the world, 3 contain Brazilian Orange juice. The biggest part of the Brazilian production is exported, and Europe is the main destination, being responsible for around 70% of imports.

In the last decade, Orange juice consumption has been decreasing. In the 40 main markets, who respond for almost the totality of consumption, there was a 19% decrease in tons of frozen concentrate Orange juice equivalent 66 Brix. Although there was some growth in emerging markets such as China, the decrease of consumption in consolidated markets represented a higher impact. In Germany, UK, France and the US, the 4 main consumption markets, the overall decrease was of 34%. CitrusBR, the Brazilian association of citrus exporters, investigated the reasons for this decrease by doing a deep research in 10 markets. Following the conclusions of the study, a multistakeholder initiative was developed in partnership with European bottlers and associations to balance the conversation around fruit juices in Europe, using Science-based information. Inside this initiative, a survey conducted by the Ipsos institute was commissioned in 14 European countries to understand the perceptions of healthcare professionals about Orange juice. 2099 professionals were interviewed, and the results show a very low level of knowledge about Orange juice and the need to disseminate information about health benefits and production of the product.

ENRIQUECIMENTO GENÉTICO E GENÔMICO DE FITONUTRIENTES EM CITROS

Dr. Leandro Peña.

Fundo de Defesa da Citricultura (FUNDECITRUS), Araraquara, SP, Brasil.

Brasil é o maior produtor mundial de laranjas e utiliza mais de 70% da fruta colhida na produção de sucos. O suco de laranja é considerado muito saudável e nutritivo, pois é rico em vitamina C, ácido fólico, potássio, magnésio e cálcio e têm níveis consideráveis de ferro e zinco. Além disso, contêm fitoquímicos, tais como carotenoides, outros terpenóides e flavonoides, os quais têm sido amplamente considerado como compostos benéficos à saúde.

Há mutantes de laranja doce que acumulam licopeno na polpa da fruta. Temos um acervo de mutantes naturais brasileiros de laranjeira que produzem esse tipo de composto e coloração vermelha. No Fundecitrus, estamos realizando a i) caracterização fenotípica e bioquímica/molecular da carotenogênese na fruta destes mutantes brasileiros de laranjeira que acumulam licopeno e β -caroteno na polpa. Há também mutantes de laranja doce que acumulam antocianinas no fruto, os tornando púrpura, e por isso chamados de laranjas sanguíneas. Sob clima tropical, essas laranjas só ficam roxas quando estocadas em frio durante várias semanas depois da colheita. Neste contexto, nosso objetivo é ii) estudar diferentes temperaturas e tratamentos durante a estocagem pós-colheita para melhorar a acumulação de antocianos no suco das laranjas sanguíneas e para conhecer suas bases moleculares.

Além disso, iii) temos gerado plantas transgênicas das variedades Pera e Valência (as mais importante para a citricultura paulista) com construções gênicas para incrementar os teores de licopeno/ β -caroteno ou de antocianos, independentemente das condições ambientais. Estamos fazendo a caracterização fenotípica e bioquímica/molecular da biossíntese de carotenoides e antocianos, respectivamente, dos eventos transgênicos e já foi solicitado à CTNBio o pedido para fazer uma liberação controlada no campo com esses eventos. Também pretendemos realizar a iv) caracterização bioquímica, molecular e funcional dos frutos de uma variedade GM de laranja rica em β -caroteno, a qual já temos cultivada em campo no Brasil e na Espanha.

Por último, estamos também começando a planejar experimentos para v) incrementar os teores de carotenoides bioativos, como licopeno e β -caroteno, ou os de antocianos nas variedades Pera e Valência usando edição genômica com CRISPR/Cas9 associada a ativadores transcricionais.

Embora os alimentos transgênicos não estejam sendo aceitos atualmente por muitos consumidores potenciais (principalmente na Europa), a percepção pública pode mudar drasticamente se são demonstrados efeitos positivos dos GM promovendo a saúde. Nossa

intenção não é competir com o suco de laranja convencional (o qual já é muito bom) mas oferecer ao consumidor distintos sucos de laranja saudáveis que incrementem o apelo pelo suco com distintas cores, sabores, aromas e propriedades benéficas.