



**ANA AUGUSTA ODORISSI XAVIER**

**CAROTENOIDES EM LEITE E PRODUTOS LÁCTEOS  
ADICIONADOS DE CORANTE LUTEÍNA: MÉTODOS  
ANALÍTICOS, ESTABILIDADE E BIOACESSIBILIDADE *IN  
VITRO***

**CAMPINAS**

**2012**





**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

**ANA AUGUSTA ODORISSI XAVIER**

**CAROTENOIDES EM LEITE E PRODUTOS LÁCTEOS ADICIONADOS DE  
CORANTE LUTEÍNA: MÉTODOS ANALÍTICOS, ESTABILIDADE E  
BIOACESSIBILIDADE *IN VITRO***

**Orientadora: Profa. Dra. Adriana Zerlotti Mercadante**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas para a obtenção do título de Doutora em Ciência de Alimentos.

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE  
DEFENDIDA PELA ALUNA ANA AUGUSTA ODORISSI XAVIER E  
ORIENTADA PELA PROFA. DRA. ADRIANA ZERLOTTI MERCADANTE

Assinatura do Orientador

---

**CAMPINAS**

**2012**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR  
CLAUDIA AP. ROMANO DE SOUZA – CRB8/5816 - BIBLIOTECA DA FACULDADE DE  
ENGENHARIA DE ALIMENTOS – UNICAMP

X19c Xavier, Ana Augusta Odorissi, 1983-  
Carotenóides em leite e produtos lácteos adicionados  
de corante luteína: métodos analíticos, estabilidade e  
bioacessibilidade in vitro / Ana Augusta Odorissi Xavier. --  
Campinas, SP: [s.n.], 2012.

Orientador: Adriana Zerlotti Mercadante.  
Tese (doutorado) - Universidade Estadual de  
Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Validação. 2. Iogurte. 3. Queijo. 4.  
Espectrofotometria. 5. Armazenamento. I. Mercadante,  
Adriana Zerlotti. II. Universidade Estadual de Campinas.  
Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Carotenoids in milk and dairy products added lutein colorant:  
analytical methods, stability and in vitro bioaccessibility

Palavras-chave em inglês:

Validation

Yogurt

Cheese

Spectrophotometry

Storage

Titulação: Doutora em Ciência de Alimentos

Banca examinadora:

Adriana Zerlotti Mercadante [Orientador]

Flavia Maria Netto

Lilian Regina Barros Mariutti

Silvana da Motta

Veridiana Vera de Rosso

Data da defesa: 31-10-2012

Programa de Pós Graduação: Ciência de Alimentos

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Adriana Zerlotti Mercadante (Orientador)  
FEA/UNICAMP (Titular)

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Flavia Maria Netto  
FEA/UNICAMP (Titular)

---

Dr<sup>a</sup> Lilian Regina Barros Mariutti  
FEA/UNICAMP (Titular)

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Silvana da Motta  
FaFar/UFMG (Titular)

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Veridiana Vera de Rosso  
Biociências/UNIFESP (Titular)

---

Prof. Dr. Marcelo Alexandre Prado  
FEA/UNICAMP (Suplente)

---

Dr<sup>a</sup> Regina Prado Zanes Furlani  
CCQA/ITAL (Suplente)

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Walkíria Hanada Viotto  
FEA/UNICAMP (Suplente)



*Aos meus pais Renato e Clarice,  
pelo exemplo de força e de fé.*





## AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo presente da vida renovado a cada manhã. Por me dar saúde e coragem para buscar meus sonhos.

A Universidade Estadual de Campinas (FEA-UNICAMP) e ao Instituto de la Grasa (IG-CSIC) pela infra-estrutura que possibilitou o desenvolvimento deste trabalho.

Ao CNPq pela bolsa de Doutorado, à CAPES pela bolsa de Doutorado-Sanduiche e à FAPESP pelo apoio financeiro ao projeto.

À Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Adriana Zerlotti Mercadante pelo tempo e atenção dedicados a mim e ao trabalho, pelo exemplo profissional e pelos desafios propostos, que permitiram meu crescimento pessoal e como pesquisadora.

Ao Dr. Antonio Pérez Gálvez pela orientação durante o período de Doutorado-Sanduiche, pela dedicação incansável, pelo convívio e amizade.

À Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Walkíria Hanada Viotto pela oportunidade do trabalho em conjunto e pelas contribuições ao trabalho.

Ao Dr. Juan Garrido Fernández pelos ensinamentos e acompanhamento no laboratório durante minha estadia em Sevilha.

À Dr.<sup>a</sup> Lilian Mariutti pela confiança, amizade e apoio nos momentos de dúvida. Pela participação intensa durante todo o desenvolvimento deste trabalho.

À banca examinadora pelas contribuições e correções realizadas.

À minha grande e maravilhosa família, em especial:

Aos meus amados pais Renato e Clarice, por todo amor e carinho dedicados. Por irem além das suas possibilidades para que eu pudesse ter acesso à melhor educação, por me apoiarem incondicionalmente, por me ampararem nas quedas, por acreditarem em mim. Por serem os melhores pais e amigos que alguém pode ter.

À minha irmã Renata, pelo amor, amizade e apoio. Por se orgulhar de mim e vibrar com as minhas conquistas.

À minha sobrinha Marina, por me amar e compreender minha ausência. Por toda a doçura dos seus gestos e palavras.

Aos meus padrinhos Vitor Fernando e Beatriz, por desempenharem de verdade o papel de “segundos-pais”. Minha gratidão pelos conselhos, pelo afeto e pelo apoio.

Aos tios Jader e Eliana, às primas Rafaela, Bruna e Fernanda e ao Arthur, pela oportunidade única que me dão de ter um segundo lar. Por todos os momentos que passamos juntos, pelo prazer e alegria de tê-los sempre presentes em minha vida.

Aos meus queridos amigos de ontem, de hoje e de sempre. Cada um, a sua maneira, contribuiu para esta conquista:

À Edi Franciele Ries, pela amizade e cumplicidade desde os tempos da faculdade, pelo incentivo, pelo exemplo de caráter, pelo carinho, por sempre se fazer presente, ainda que fisicamente distante. Com certeza a vida vale a pena por amizades como a nossa.

À Vivian Bochi e ao Clauson Kraemer (e agora também à Cecília Bochi Kraemer), pela amizade infinita e pela parceria de anos. Obrigada pelo ombro amigo, pelas demonstrações de afeto, por serem parte da família que eu pude escolher.

À Isabela Martins, pelo prazer da amizade, pela parceria, pelo carinho incondicional, por ser tão compreensiva e especial. Obrigada por ser minha *soul sister*, pro que der e vier.

Ao Renan Chisté, pela amizade sincera, pelo exemplo de pesquisador, pela generosidade dos atos, pela palavra certa nas horas mais incertas.

À Marcella Marques, pelo carinho, pela mão sempre estendida, pelo apoio constante.

À Pollyane Ports pela alegria da convivência diária, pela parceria e simpatia.

À Lígia Domingos, Diogo Maus e Mirian Kubo, pela amizade, compreensão e trabalho em equipe.

À Daniele Rodrigues pela disponibilidade e por toda a ajuda com a documentação da bolsa PDSE.

Aos colegas e amigos que fazem (ou fizeram) parte do Laboratório de Química de Alimentos da FEA/UNICAMP: Adélia Machado, Ádria Bentes, Aline Medina, Bruno Chacon, Elaine Berger, Elisângela Madalozzo, Fabíola Lima, Fernanda Mandelli, Gislaine Faria, Hugo de Souza, Jéssica Grigoletto, Karla Nery, Lizziane Vissotto, Lucas Campos, Naira Poerner, Nathália Azevedo, Poliana Gurak, Regiane Palhares, Renata Sancho, Rosemar Sant'Anna, Sarah Gurgel, Viviane Miranda, Walkíria Ribeiro. Agradeço principalmente ao Eliseu Rodrigues, pelo exemplo de dedicação e pela ajuda em diversas etapas deste trabalho.

Aos colegas e amigos do Departamento de Biotecnología de Alimentos do Instituto de la Grasa (CSIC-Espanha), em especial: Irene Carvajal, Elena Mellado, Raul Delgado, Honorio Vergara, Antonio Maldonado, Rebeca Fernández, Ramón Aparicio, Sergio Alcañiz pela recepção e acolhida no laboratório, por me fazerem sentir em casa, pela integração Brasil-Espanha, pela amizade que com certeza ficará.



“Torna-te aquilo que és.”

*Friedrich Nietzsche*



## ÍNDICE GERAL

<b>RESUMO GERAL .....</b>	<b>xxi</b>
<b>SUMMARY .....</b>	<b>xxiii</b>
<b>INTRODUÇÃO GERAL .....</b>	<b>1</b>
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>7</b>

### CAPÍTULO I

#### REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. Carotenoides.....	11
1.1. Luteína.....	12
1.2. Carotenoides como corantes em alimentos.....	14
2. Análise quantitativa de carotenoides.....	15
2.1. Validação de métodos .....	19
3. Leite e produtos lácteos .....	24
4. Bioacessibilidade de carotenoides.....	27
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	32

### CAPÍTULO II

**Desenvolvimento e validação de método espectrofotométrico para determinação de corante à base de luteína adicionado em iogurte desnatado**

ABSTRACT .....	43
1. INTRODUÇÃO .....	43
2. PARTE EXPERIMENTAL.....	43
2.1. Materiais e Equipamentos .....	43
2.2. Métodos.....	44
Análise por CLAE de carotenoides do corante à base de luteína.....	44
Produção dos iogurtes.....	44
Extração dos carotenoides .....	44
Quantificação dos carotenoides totais .....	44
Validação do método de extração .....	45
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	45
3.1. Perfil de carotenoides do corante à base de luteína por CLAE-DAD.....	45
3.2. Desenvolvimento do método analítico .....	45
Acetato de Etila .....	45
Acetona .....	45
Tetraidrofurano .....	46
3.3. Validação do método .....	46
4. CONCLUSÃO .....	47
REFERÊNCIAS.....	47

### **CAPÍTULO III**

#### **Estabilidade oxidativa de iogurte adicionado de corante luteína**

SUMÁRIO INTERPRETATIVO.....	51
RESUMO.....	52
1. INTRODUÇÃO .....	53
2. MATERIAIS E MÉTODOS .....	57



2.1. Material .....	57
2.2. Preparo dos iogurtes.....	57
2.3. Caracterização dos iogurtes .....	58
2.4. Monitoramento durante a estocagem refrigerada .....	59
Teor de luteína. ....	59
Determinação de riboflavina. ....	60
Avaliação da degradação de RBF. ....	61
2.5. Análise sensorial.....	62
2.6. Planejamento experimental e avaliação estatística dos resultados .....	63
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	64
3.1. Caracterização dos iogurtes .....	64
3.2. Influência da luz na estabilidade do corante luteína adicionado ao iogurte.	
65	
3.2. Influência da luz na estabilidade da riboflavina.....	66
3.3. Formação de produtos de degradação da riboflavina.....	69
3.4. Aceitação sensorial e intenção de compra .....	70
4. CONCLUSÃO .....	72
AGRADECIMENTOS .....	73
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	73

## **CAPÍTULO IV**

### **Desenvolvimento, validação e aplicação de um novo método para avaliação da estabilidade de luteína adicionada em queijo Prato**

RESUMO.....	81
1. INTRODUÇÃO.....	82
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	84

2.1. Material, reagentes e equipamentos.....	84
2.2. Análise por HPLC de carotenoides do corante à base de luteína.....	85
2.3. Fabricação do queijo prato .....	86
2.4. Extração dos carotenoides .....	87
2.5. Quantificação dos carotenoides totais .....	87
2.6. Validação do método .....	88
2.7. Estabilidade do corante luteína durante o armazenamento do queijo Prato	89
2.8. Análise Estatística .....	90
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	90
3.1. Perfil de carotenoides do corante à base de luteína.....	90
3.2. Desenvolvimento do método de extração.....	93
3.3. Validação do método .....	95
3.4. Estabilidade da luteína adicionada em queijo Prato .....	98
AGRADECIMENTOS .....	102
REFERÊNCIAS.....	102

## CAPÍTULO V

### **Bioacessibilidade de luteína adicionada em leite e iogurte com diferentes teores de gordura através de modelo de digestão *in vitro***

RESUMO.....	107
1. INTRODUÇÃO .....	108
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	110
2.1. Amostras.....	110
2.2. Reagentes .....	111
2.3. Preparação dos iogurtes.....	111

2.4. Bioacessibilidade <i>in vitro</i> dos carotenoides .....	112
2.5. Determinação do teor de carotenoides da fração micelar.....	113
2.6. Análise de carotenoides por HPLC.....	114
2.7. Análise estatística dos resultados.....	115
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	116
3.1. Bioacessibilidade <i>in vitro</i> .....	116
3.2. Efeito da digestão no perfil de carotenoides. ....	121
AGRADECIMENTOS .....	124
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	125
<b>CONCLUSÃO GERAL.....</b>	<b>131</b>



## RESUMO GERAL

Apesar dos carotenoides estarem amplamente distribuídos nos alimentos de origem vegetal, a sua adição a produtos alimentícios de elevado consumo se torna cada vez mais frequente, visto as inúmeras evidências sobre os benefícios destes pigmentos para a saúde humana. Assim, esse trabalho teve por objetivo o desenvolvimento e a validação de métodos para extração e quantificação de carotenoides em iogurte desnatado e em queijo Prato, ambos adicionados de corante contendo luteína, a fim de verificar a estabilidade deste carotenoide durante o armazenamento refrigerado destes produtos na ausência e na presença de luz (1000 lux). Para o queijo Prato, também foi verificado o efeito do tipo de embalagem na estabilidade da luteína, empregando embalagens plásticas transparentes e pigmentadas de cor vermelha. Além disso, a bioacessibilidade *in vitro* da luteína adicionada ao leite e ao iogurte desnatado, semidesnatado e integral foi avaliada para estimar a fração de luteína adicionada que pode ser absorvida pelo organismo humano, após o consumo destes produtos. O método desenvolvido e validado para determinação da luteína em iogurte incluiu a extração dos carotenoides com tetraidrofurano em vortex, seguida de centrifugação, partição dos extratos para éter etílico/éter de petróleo (2:1) e quantificação espectrofotométrica dos carotenoides em etanol. O método apresentou linearidade na faixa estudada (1,41–13,42 µg/g, coeficiente de determinação 0,9938), limites de detecção e quantificação de 0,42 µg/g e 1,28 µg/g, respectivamente, baixo desvio padrão relativo (3,4 %) e recuperação variando entre 95 e 103 %. Este método foi empregado para avaliar a estabilidade de luteína adicionada em iogurte desnatado, onde foi verificado que, na concentração adicionada (aproximadamente 10 µg luteína/g iogurte), o carotenoide manteve-se estável durante os 35 dias de armazenamento refrigerado, independentemente das condições de iluminação. O método validado para iogurte não foi eficiente para a extração de carotenoides de queijo Prato, e por isso, um novo método foi desenvolvido e validado. A extração dos carotenoides do queijo Prato foi realizada em almofariz, utilizando acetato de etila

como solvente extrator e *hyflosupercel* como adjuvante de extração. O novo método desenvolvido para queijo Prato demonstrou linearidade na faixa de 0,05 a 1,15 mg/g, com coeficiente de determinação de 0,9984. Os limites de detecção e quantificação foram de 0,02 e 0,06 mg/g, respectivamente, o desvio padrão relativo de 2,85 % e os valores de recuperação variaram entre 93 e 98 %. Na aplicação deste método para monitorar a estabilidade de luteína durante o armazenamento do queijo Prato, constatou-se que não houve alteração dos níveis deste carotenoide durante 56 dias de armazenamento refrigerado. Os queijos armazenados na presença ou ausência de luz, embalados em embalagem transparente ou pigmentada, mantiveram seus níveis de luteína praticamente constantes e não apresentaram diferenças entre si. A análise da bioacessibilidade *in vitro* da luteína adicionada em leite e iogurte demonstrou que as amostras de leite semidesnatado e integral, assim como o iogurte integral, apresentaram índices de bioacessibilidade entre 19 e 21 %, semelhantes aos já relatados na literatura para alimentos naturais e formulados. Além disso, durante a digestão *in vitro* foi constatada a hidrólise de cerca de 85 % dos ésteres de luteína presentes na formulação do corante luteína, provavelmente devido à ação da lipase pancreática. Os resultados deste estudo mostram que os métodos desenvolvidos produziram resultados confiáveis na análise de luteína adicionada em iogurte desnatado e queijo Prato, e que os níveis de luteína se mantiveram constantes durante o armazenamento dos produtos, nas condições estudadas. Além disso, do ponto de vista de bioacessibilidade, entre o leite e iogurte adicionados de luteína, apenas aqueles com maiores teores de gordura (leite semidesnatado e integral e iogurte integral) mostraram-se bons veículos para adição de luteína.

## SUMMARY

Although carotenoids are widely found in foods from vegetable origin, their addition to food products of high consumption becomes increasingly common due to the abundant evidence about the benefits of these pigments to the human health. Thus, the aim of this work was to develop and validate methods for the extraction and quantification of carotenoids from skimmed yogurt and “Prato” cheese added lutein colorant in order to verify the stability of this carotenoid during refrigerated storage in the dark and in illuminated environment (1000 lux). The effect of packaging on the stability of lutein was also determined in the Prato cheese by using transparent and red pigmented plastic packaging. In addition, the *in vitro* bioaccessibility of lutein added to skimmed, semi-skimmed and whole milk and yogurt was evaluated to estimate the fraction of the added lutein that can be absorbed by the human body after the intake of these products. The method developed and validated for the determination of lutein in yogurt comprised the extraction of carotenoids with tetrahydrofuran by vortexing, followed by centrifugation, partition of the extract to diethyl ether/petroleum ether (2:1) and spectrophotometric quantification of the carotenoids in ethanol. The method was linear in the tested range (1.41 to 13.42  $\mu\text{g/g}$ , coefficient of determination 0.9938), the limits of detection and quantification were 0.42  $\mu\text{g/g}$  and 1.28  $\mu\text{g/g}$ , respectively, the relative standard deviation (3.4 %) was low and the recovery ranged from 95 to 103 %. This method was employed to evaluate the stability of the yogurt with lutein colorant addition, and at the used concentration (*ca.* 10 mg lutein/g yogurt), the carotenoid was stable during the 35 days of refrigerated storage, regardless the illumination conditions. The method validated for yogurt was not efficient to extract the carotenoids from Prato cheese, and therefore a new method was developed and validated. The carotenoid extraction from Prato cheese was carried out in a mortar with ethyl acetate and *hyflsupercel*, as an extraction enhancer. The new method developed for Prato cheese was linear in the range from 0.05 to 1.15 mg/g, with a coefficient of determination of 0.9984. The limits of detection and quantification were 0.02 and 0.06 mg/g, respectively, the relative

standard deviation was 2.85 % and recovery values ranged between 93 and 98 %. By applying this method to determine the stability of lutein during the storage of Prato cheese, no modifications were observed in the levels of carotenoids during the 56 days of storage. The lutein contents remained constant and no differences were observed regardless the illumination conditions or package type. The analysis of the *in vitro* bioaccessibility of lutein from milk and yogurt with addition of lutein colorant showed that semi-skimmed (21 %) and whole milk (19 %), and whole yogurt (21 %) had bioaccessibility values similar to those reported in the literature for natural and formulated foods. Furthermore, about 85% of the esters present in the lutein colorant were hydrolyzed during the *in vitro* digestion, probably due to the action of the pancreatic lipase. The results showed that the developed methods produce reliable results for the analysis of lutein added to skimmed yogurt and Prato cheese, and that lutein levels remained constant in these products during the storage, under the studied conditions. Moreover, regarding bioaccessibility, only the milk and yogurt with lutein colorant samples with high fat content (whole and skimmed milk and whole yogurt) showed to be good vehicles for the addition of lutein.



## INTRODUÇÃO GERAL

Os carotenoides constituem um grupo de pigmentos lipossolúveis, de coloração que varia do amarelo ao vermelho. Sua estrutura química é composta por um extenso sistema de ligações duplas conjugadas, que lhes confere propriedades de absorver luz na região do visível, bem como é responsável pela sua baixa estabilidade (Britton, 1995). Na dieta humana, as principais fontes de carotenoides são as frutas e vegetais. Os produtos de origem animal, como leite e derivados, contêm baixos teores de carotenoides, já que os animais não são capazes de sintetizar estes pigmentos, obtendo-os através da alimentação (Rodriguez-Amaya et al., 2008). No entanto, este grupo de alimentos tem sido o principal veículo de adição de substâncias funcionais, por estarem relacionados a hábitos alimentares saudáveis e serem bastante populares entre o mercado consumidor.

O emprego de carotenoides como corantes em alimentos é realizado há séculos, e atualmente, a indústria de alimentos dispõe de carotenoides naturais e carotenoides idênticos aos naturais. As principais fontes de carotenoides naturais são o urucum (bixina e norbixina), o tomate (licopeno) e as flores do gênero *Tagetes* (ésteres de luteína) (Delgado-Vargas & Paredes-López, 2003). Atualmente, o interesse por essa classe de compostos tem aumentado, e o foco desta vez não são suas propriedades corantes, mas sim seus possíveis efeitos benéficos e de promoção da saúde humana. Estudos epidemiológicos têm relatado que o consumo de alimentos ricos em carotenoides está associado com a redução no risco de distúrbios degenerativos como câncer e doenças cardiovasculares (Krinsky, 2002). Entre os carotenoides mais estudados por seus efeitos promotores à saúde destaca-se a luteína, que é uma xantofila que se acumula na mácula lútea da retina humana, juntamente com a zeaxantina, e tem seu consumo inversamente correlacionado à ocorrência da degeneração macular relacionada à idade (DMRI) (Landrum et al., 1997). Estudos comprovam que as xantofilas presentes na mácula podem atenuar entre 40 a 90 % a intensidade da luz incidente na retina humana, atuando como filtro de luz (Alves-Rodrigues &

Shao, 2004). Além disso, produtos de oxidação da luteína já foram detectados na retina, sendo considerados como evidência da atuação da luteína como desativadora de espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio (Khachik et al., 1997; Scheidegger et al., 1998; Bhosale et al., 2009).

Na literatura existem métodos para análise quantitativa de carotenoides naturalmente presentes ou adicionados a matrizes lácteas como leite, iogurte e queijo (Jones et al., 2005; Aryana et al., 2006; Hulshof et al., 2006; Nozière et al., 2006; Granado-Lorencio et al., 2010). Entretanto, a confiabilidade destes métodos não foi avaliada por um processo adequado de validação. A variabilidade da matriz alimentícia, seu perfil de carotenoides e a origem dos carotenoides quantificados, ou seja, se são provenientes da própria composição do alimento ou de alguma formulação adicionada, influenciam a eficiência da metodologia utilizada para extração e quantificação destes compostos. Assim, ainda que um método já tenha sido empregado previamente, testes e possíveis modificações devem ser realizados para adequar a metodologia à amostra e ao corante em estudo e para garantir que os resultados obtidos sejam confiáveis. Os parâmetros indicados para validar métodos analíticos são seletividade, linearidade e faixa de aplicação, precisão, exatidão, limite de detecção, limite de quantificação e robustez (ICH, 1996; Ribani et al., 2004). Contudo, não existe um procedimento definitivo para a validação de métodos, sendo que os parâmetros e critérios de aceitação adotados devem estar de acordo com as necessidades do laboratório e características do analito.

Apesar de existirem inúmeros estudos visando a descoberta de novas fontes de carotenoides e a caracterização de suas propriedades bioativas, os dados a respeito da bioacessibilidade destes pigmentos ainda são escassos (Biehler et al., 2011). A bioacessibilidade é um conceito chave para verificar a eficiência nutricional de um alimento, sendo definida como a fração do composto que é liberada do alimento no trato gastrointestinal e que se torna disponível para absorção pelas células do epitélio do intestino (Fernández-García et al., 2009). Sabe-se que a bioacessibilidade de um carotenoide está relacionada com sua estrutura química e com a matriz alimentícia que o contém. O teor e o tipo de

lipídios presentes na matriz estão entre os fatores mais relevantes para a bioacessibilidade, e acredita-se que exista uma quantidade mínima de lipídios que deva ser ingerida para garantir um bom índice de bioacessibilidade (van het Hof et al., 2000). A determinação da fração bioacessível dos carotenoides geralmente é realizada por métodos enzimáticos que simulam *in vitro* a passagem do alimento pelo trato gastrointestinal humano. Estes ensaios avaliam principalmente a liberação do carotenoide da matriz e sua incorporação em micelas, podendo ainda incluir uma etapa de absorção dos pigmentos pelo epitélio intestinal (Fernández-García et al., 2012). Os métodos *in vitro* são uma alternativa simples e mais barata para estimar a bioacessibilidade de compostos, e seus resultados têm sido bem correlacionados com os resultados obtidos através de ensaios com humanos (Garrett et al., 1999; Reboul et al., 2006).

## Referências

- Alves-Rodrigues, A.; Shao, A. The Science behind lutein. **Toxicology Letters**, 150, 57-83, 2004.
- Aryana, K. J.; Barnes, H. T.; Emmick, T. K.; McGrew, P.; Moser, B. Lutein is stable in strawberry yogurt and does not affect its characteristics. **Journal of Food Science**, 71, 6, 467-472, 2006.
- Bhosale, P.; Serban, B.; Bernstein, P.S.; Retinal carotenoids can attenuate formation of A2E in the retinal pigment epithelium. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 483, 175-181, 2009.
- Biehler, E.; Kaulmann, A.; Hoffmann, L.; Krause, E.; Bohn, T. Dietary and host-related factors influencing carotenoid bioaccessibility from spinach (*Spinacia oleracea*). **Food Chemistry**, 125, 1328-1334, 2011.
- Britton, G. UV/visible spectroscopy. In *Carotenoids. vol. 1B: Spectroscopy*, G. Britton; S. Liaansen-Jensen; H. Pfander Eds. Basel: Birkhuaser, 1995.

- Delgado-Vargas, F.; Paredes-López, O. Carotenoids, In *Natural colorants for food and nutraceuticals uses*. New York: CRC Press, 2003.
- Fernández-García, E.; Carvajal-Lérida, I.; Pérez-Gálvez, A. In vitro bioaccessibility assessment as a prediction tool of nutritional efficiency. **Nutrition Research**, 29, 751-760, 2009.
- Fernández-García, E.; Carvajal-Lérida, I.; Jarén-Galán, M.; Garrido-Fernández, J.; Pérez-Gálvez, A.; Hornero-Méndez, D. Carotenoids bioavailability from foods: From plants pigments to efficient biological activities. **Food Research International**, 46, 438-450, 2012.
- Garrett, D.A.; Failla, M.L.; Sarama, R.J. Development of an in vitro digestion method to assess carotenoid bioavailability from meals. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 47, 4301-4309, 1999.
- Granado-Lorencio, F.; Herrero-Barbudo, C.; Olmedilla-Alonso, B.; Blanco-Navarro, I.; Pérez-Sacristán, B. Lutein bioavailability from lutein ester-fortified fermented milk: *in vivo* and *in vivo* study. **Journal of Nutritional Biochemistry**, 21, 2, 133-139, 2010.
- Hulshof, P. J. M.; Van Roekel-Jansen, T.; Van de Bovenkamp, P.; West, C. E. Variation in retinol and carotenoid content of milk and milk products in The Netherlands. **Journal of Food Composition and Analysis**, 19, 67-75, 2006.
- ICH International Conference on Harmonization of Technical Requirements for registration of Pharmaceutical for Human use; **Q 2B- Validation of Analytical Procedure: methodology**, 1996.
- Jones, S. T.; Aryana, K. J.; Losso, J. N. Storage stability of lutein during ripening of cheddar cheese. **Journal of Dairy Science**, 88, 1661-1670, 2005.
- Khachik, F.; Bernstein, P.S.; Garland, D.L. Identification of lutein and zeaxanthin oxidation products in human and monkey retinas. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, 38, 1802-1811, 1997.

- Krinsky, N.I. Possible biologic mechanisms for a protective role of xanthophylls. **Journal of Nutrition**, 132, 540S–542S, 2002.
- Landrum, J.T.; Bone, R.A.; Joa, H.; Kilburn, M.D.; Moore, L.L.; Sprague, K.E. A one year study of the macular pigment: the effect of 140 days of a lutein supplement. **Experimental Eye Research**, 65, 57-62, 1997.
- Nozière, P.; Grolier, P.; Durand, D.; Ferlay, A.; Pradel, P.; Martin, B. Variations in carotenoids, fat-soluble micronutrients, and color in cow's plasma and milk following changes in forage and feeding level. **Journal of Dairy Science**, 89, 2634-2648, 2006.
- Reboul, E.; Richelle, M.; Perrot, E.; Esmoulin-Malezet, C.; Pirisi, V.; Borel, P.; Bioaccessibility of carotenoids and vitamin E from their main dietary sources. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 54, 8749-8755, 2006.
- Ribani, M.; Bottoli, C.B.G.; Collins, C.H.; Jardim, I.C.S.F.; Melo, L.F.C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos, **Química Nova**, 27, 771-780, 2004
- Rodriguez-Amaya, D.B.; Kimura, M.; Godoy, H.T.; Amaya-Farfan, J. Updated Brazilian database on food carotenoids: Factors affecting carotenoid composition. **Journal of Food Composition and Analysis**, 21, 445-463, 2008.
- Scheidegger, R.; Pande, A.K.; Bounds, P.L.; Koppenol, W.H. The reaction of peroxynitrite with zeaxanthin. **Nitric Oxide: Biology and Chemistry**, 2, 8-16, 1998.
- van het Hof, K. H.; West, C. E.; Weststrate, J. A.; Hautvast, J. G. Dietary factors that affect the bioavailability of carotenoids. **The Journal of Nutrition**, 130, 503–506, 2000.



## OBJETIVOS

Tendo em vista o exposto na introdução geral, este trabalho apresenta os seguintes objetivos:

- 1) Adaptar metodologias existentes na literatura ou desenvolver novas metodologias para extração e quantificação espectrofotométrica de carotenoides de iogurte desnatado e queijo Prato, adicionados ou não de corantes naturais à base de luteína.
  
- 2) Validar as metodologias que apresentarem os melhores resultados de extração para cada matriz, determinando os parâmetros de seletividade, linearidade, limites de detecção e quantificação, precisão e exatidão.
  
- 3) Aplicar as metodologias validadas para acompanhar o comportamento dos carotenoides em iogurte desnatado com e sem adição de corante à base de luteína durante o armazenamento a 5 °C por 35 dias e em queijo prato com e sem adição de corante à base de luteína durante o armazenamento a 12 °C por 56 dias em embalagens transparentes e de cor vermelha.
  
- 4) Determinar, por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de arranjo de diodos (HPLC-DAD), o perfil de carotenoides dos corantes à base de luteína que foram adicionados ao iogurte desnatado e ao queijo prato.
  
- 5) Aplicar uma metodologia enzimática simuladora das condições fisiológicas e da sequência de eventos que ocorrem na digestão humana para avaliar a

bioacessibilidade *in vitro* do corante à base de luteína adicionado ao leite e ao iogurte, ambos com diferentes teores de gordura.

6) Verificar o efeito da digestão *in vitro* no perfil de carotenoides de leite e iogurte com diferentes teores de gordura adicionados de corante à base de luteína.



## CAPÍTULO I

### **REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**



## 1. Carotenoides

Os carotenoides são pigmentos amplamente distribuídos na natureza, sendo sintetizados por plantas superiores, algas e bactérias, e sua presença em animais é proveniente da alimentação. Estes pigmentos são responsáveis pela coloração vermelha, amarela e alaranjada de diversas frutas, vegetais, fungos, flores e também pássaros, insetos e crustáceos.

Estes pigmentos são compostos terpenoides cuja estrutura básica consiste em oito unidades de isopreno ligadas em um padrão cabeça-cauda, com a simetria invertida no centro da molécula. Esta estrutura pode ser modificada por hidrogenação, desidrogenação, ciclização ou oxidação (Davies, 1976), e estas modificações dão origem a estruturas diferenciadas que perfazem um número de mais de 700 carotenoides já isolados na natureza (Britton et al., 1995). Além disso, em frutos e flores a maior parte das xantofilas encontra-se esterificada com diferentes ácidos graxos (Pérez-Gálvez & Mínguez-Mosquera, 2005).

Os carotenoides são divididos em dois grupos: os carotenos, que são hidrocarbonetos, e as xantofilas, que possuem um ou mais grupos oxigenados. Os carotenoides possuem um extenso sistema de ligações duplas conjugadas na molécula, onde os elétrons  $\pi$  se deslocam sobre toda a cadeia poliênica, e este sistema é responsável tanto pela capacidade de absorção de luz na região do visível (cromóforo) quanto pela elevada reatividade química destes compostos (Mercadante, 2008). O cromóforo de cada carotenoide é caracterizado por seu espectro de absorção eletrônica e a posição das bandas de absorção, que geralmente são três, é uma função do número de ligações duplas conjugadas. Assim sendo, um aumento na extensão do cromóforo acarreta em um aumento no comprimento de onda de absorção máxima ( $\lambda_{\text{máx}}$ ) do composto. Em contrapartida, a introdução de grupamentos hidroxila ou da função carbonila, desde que não conjugada à cadeia poliênica, tem pouco efeito sobre a posição do  $\lambda_{\text{máx}}$  (Davies, 1976).

Os principais carotenoides encontrados em alimentos são  $\beta$ -caroteno,  $\alpha$ -caroteno,  $\beta$ -criptoxantina, licopeno, luteína e violaxantina. Com exceção da violaxantina, estes também são os carotenoides mais comumente encontrados no plasma humano e por isso têm sido os mais estudados em termos de efeitos promotores da saúde, juntamente com a zeaxantina (Rodriguez-Amaya et al., 2008).

### 1.1. Luteína

A luteína e seu isômero zeaxantina são xantofilas e diferem estruturalmente na posição de uma ligação dupla em um dos anéis. Enquanto a zeaxantina possui dois anéis terminais do tipo  $\beta$ , a luteína possui um anel  $\beta$  e um anel  $\epsilon$  (Figura 1). A dieta humana contém variadas fontes de luteína e os maiores teores são encontrados em vegetais folhosos de coloração verde escura, como o espinafre (40  $\mu\text{g/g}$ ) e a couve (50  $\mu\text{g/g}$ ), e em alimentos amarelos como o milho (5  $\mu\text{g/g}$ ) e a gema de ovo (8  $\mu\text{g/g}$ ) (Rodriguez-Amaya et al., 2008; Perry et al., 2009).

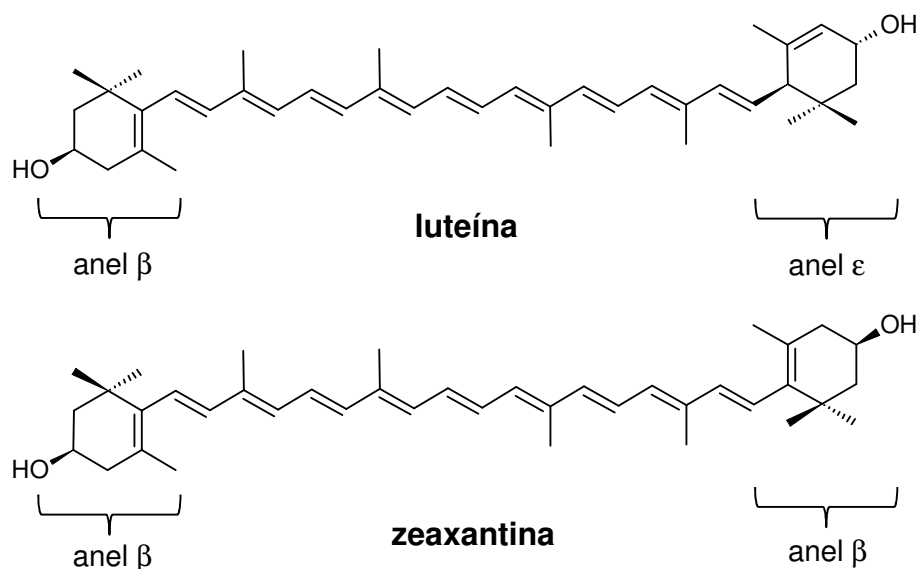


Figura 1. Estrutura química da luteína (10 ligações duplas conjugadas) e da zeaxantina (11 ligações duplas conjugadas).

O consumo de luteína tem sido inversamente correlacionado à ocorrência de doenças oculares como catarata e DMRI em humanos, e por isso, o número de estudos sobre as propriedades deste carotenoide vem crescendo nas últimas décadas (Landrum et al., 1997; Bone et al., 2000; Bhosale et al.; 2009). A DMRI caracteriza-se pela degradação da porção central da retina, incluindo a mácula, e é a maior causa de cegueira irreversível em idosos (Krinsky et al., 2003).

Dos carotenoides presentes no plasma humano, apenas a luteína e a zeaxantina são encontradas em tecidos oculares. Estas xantofilas se depositam principalmente na mácula lútea, região localizada no centro da retina, que possui a maior concentração de fotorreceptores que são responsáveis pela visão central e elevada acuidade visual (Alves-Rodrigues & Shao, 2004). Acredita-se que estes carotenoides maculares atenuem a incidência de luz azul, que é a maior forma de energia de luz visível, e que pode induzir danos foto-oxidativos pela formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio (RNS). A luteína possui um pico de absorção máxima no comprimento de onda de 445 nm, e por isso é capaz de absorver essa forma de energia (Figura 2). Esta diminuição na intensidade da luz (que normalmente é de 40% e pode chegar a 90%) pode reduzir significativamente o estresse oxidativo na retina, acarretando em provável redução do risco de DMRI. A presença de produtos de oxidação da luteína e da zeaxantina na retina sugere que esses carotenoides também atuam como antioxidantes, reduzindo a produção de ROS resultantes do metabolismo e da ação da luz (Khachik et al., 1997; Bhosale et al., 2009).

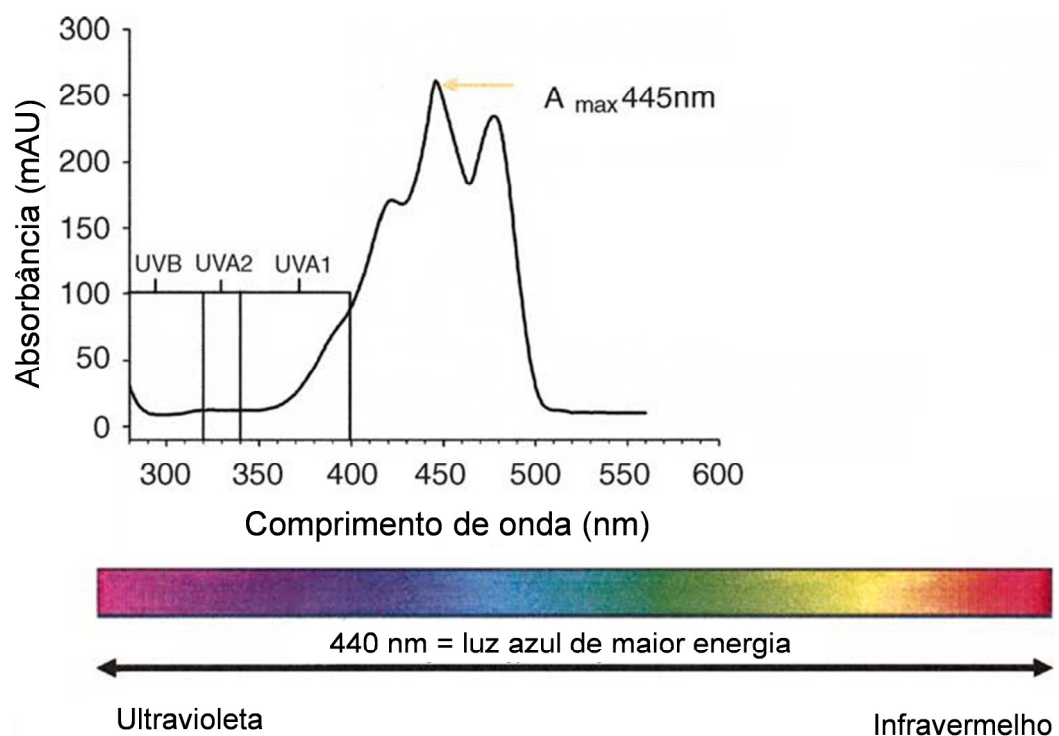


Figura 2. Espectro de absorção da luteína. Fonte: Alves-Rodrigues & Shao (2004).

## 1.2. Carotenoides como corantes em alimentos

Os carotenoides são utilizados como corantes em alimentos há séculos, através da adição de extratos de plantas e especiarias contendo estes pigmentos. Atualmente, tanto os carotenoides naturais quanto os carotenoides sintéticos idênticos aos naturais estão disponíveis para uso na indústria de alimentos. A adição de corantes aos alimentos tem como principais propósitos reforçar a cor já existente, garantir a uniformidade dos produtos, restaurar a cor perdida durante um determinado processamento, ou ainda, conferir cor a um alimento que não apresenta cor.

Algumas das fontes de carotenoides naturais de maior importância comercial são o urucum (bixina e norbixina), o tomate (licopeno) e as flores do

gênero *Tagetes* (ésteres de luteína) (Delgado-Vargas & Paredes-López, 2003). A concentração de ésteres de luteína em *Tagetes* varia de 4 a 800 µg/g de flores frescas e o perfil de ésteres compreende dipalmitato, miristato-palmitato, palmitato-estearato, dimiristato e diestearato de luteína (Gau et al., 1983; Gregory et al., 1986).

De acordo com a legislação brasileira (Brasil, 1988), os carotenoides naturais com uso permitido em alimentos são  $\alpha$ -,  $\beta$ - e  $\gamma$ -caroteno, bixina, norbixina, capsantina, capsorubina, licopeno, cantaxantina, criptoxantina, flavoxantina, luteína, rodoxantina, rubixantina e violaxantina. A mesma Resolução (Brasil, 1988) regulamenta o emprego dos seguintes carotenoides sintéticos idênticos aos naturais:  $\beta$ -caroteno,  $\beta$ -apo-8'-carotenal, éster etílico do ácido  $\beta$ -apo-8'-carotenoico, cantaxantina, criptoxantina, flavoxantina, luteína, rodoxantina, rubixantina e violaxantina. Para aplicação em iogurtes e queijos em geral, não há um limite máximo permitido pela legislação, tanto para os carotenoides de fontes naturais quanto para os sintéticos idênticos aos naturais, podendo ser utilizadas as quantidades necessárias para obtenção do efeito desejado. Entretanto, para queijos do tipo Prato, só é permitido o uso de urucum (bixina e norbixina) como corante, tornando necessários maiores estudos sobre a aplicação de diferentes carotenoides para coloração deste tipo de queijo.

## 2. Análise quantitativa de carotenoides

A extração dos carotenoides da matriz tem como finalidade a remoção do pigmento do alimento e sua transferência para o solvente. A escolha do melhor solvente para extração depende da composição da matriz a ser analisada e de sua composição de carotenoides. Em geral, os carotenoides são compostos hidrofóbicos, sendo bastante solúveis em solventes apolares como hexano e éter de petróleo, que são frequentemente utilizados para a extração desses pigmentos (Delgado-Vargas & Paredes-López, 2003). Entretanto, para extração de carotenoides de matrizes com alto teor de umidade é mais apropriado o emprego

de solventes de polaridade intermediária como acetona, metanol e tetraidrofurano (Mercadante, 2008). A utilização de celite ou *hyflosuperpel* para aumentar a superfície de contato da amostra com o solvente extrator é bastante comum (Assunção & Mercadante, 2003; De Rosso & Mercadante, 2005).

O método de extração empregado varia de acordo com a estrutura do alimento e a localização do pigmento na matriz. A extração pode ser realizada em *mixer*, vortex, almofariz e pistilo (Mercadante, 2008), ou ainda em ultrassom e mesa agitadora (Chisté et al., 2011a, b). A análise quantitativa de carotenoides requer uma extração completa e exaustiva, não podendo haver perda de material. Geralmente quatro a seis extrações são suficientes para a completa remoção dos carotenoides da matriz (Mercadante, 2008). Após a extração, é comum fazer uso de uma etapa de partição do extrato para solventes de baixa polaridade, visando à retirada de interferentes e de água que podem ter sido extraídos juntamente com os compostos de interesse.

A etapa de hidrólise alcalina, comumente chamada de saponificação, é aplicada para remoção de lipídios em amostras com alto teor de gordura e para hidrólise de clorofilas e ésteres de carotenoides presentes, respectivamente, em vegetais verdes e frutas (Mercadante, 2008; Rodriguez-Amaya, 2010). A saponificação deve ser empregada apenas quando indispensável, pois, embora auxilie a separação cromatográfica, a identificação e a quantificação, existem evidências de perdas consideráveis de carotenoides durante esta etapa (Khachik et al., 1986; Kimura et al., 1990; Biehler et al., 2010) e, conseqüentemente, da subestimação do teor de carotenoides. Caso a quantificação seja realizada por espectrofotometria UV-visível, a etapa de saponificação só se faz necessária se houver a presença de interferentes que causem turbidez ao extrato ou apresentem espectro de absorção na mesma região dos carotenoides, já que o fato de os carotenoides estarem esterificados não modifica o cromóforo da molécula e, por conseguinte, não há alteração no seu espectro de absorção (Mercadante, 2008).



O método clássico de quantificação de carotenoides é por meio de espectrofotometria na região do UV-visível. Atualmente os carotenoides têm sido mais frequentemente quantificados por cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa acoplada ao detector de arranjo de diodos (HPLC-DAD), técnica que permite a separação dos compostos e, portanto, a detecção e a quantificação de cada carotenoide individualmente, mas com o inconveniente de demandar maiores tempo e custo de análise. As análises por espectrofotometria ainda são amplamente utilizadas e têm sido adaptadas para diversos fins, principalmente para análise de alimentos ricos em um carotenoide específico, onde são empregados comprimentos de onda selecionados e seus correspondentes coeficientes de extinção (Biehler et al., 2010).

As principais dificuldades associadas à análise de carotenoides estão relacionadas à instabilidade deste grupo de pigmentos, inerente à sua estrutura química. Eles são especialmente sensíveis à luz, calor, oxigênio, ácidos e em alguns casos também aos álcalis (Davies, 1976). Assim sendo, devem ser tomadas algumas precauções durante o manuseio e a análise de carotenoides, como trabalhar sob luz indireta, usar atmosfera inerte, evitar o uso de ácidos e álcalis, armazenar extratos secos à baixa temperatura e utilizar baixas temperaturas ( $\leq 37$  °C).

Devido à grande variação na natureza das matrizes alimentícias e na composição de carotenoides dos alimentos, um único método analítico geralmente não é apropriado para ser aplicado em diferentes alimentos. Desta forma, uma otimização dos métodos já relatados na literatura, ou ainda o desenvolvimento e validação de um novo método, seguido da avaliação do seu desempenho devem ser realizados para obtenção de resultados fidedignos (Rodriguez-Amaya, 2010).

Existem na literatura alguns trabalhos sobre identificação e quantificação de carotenoides em matrizes lácteas, tanto daqueles naturalmente presentes quanto adicionados intencionalmente (Herrero-Barbudo et al., 2005; Jones et al., 2005; Aryana et al., 2006; Hulshof et al., 2006; Nozière et al., 2006; Granado-Lorencio et

al., 2010). Para extração de carotenoides foram utilizados solventes miscíveis com a água, como a acetona que foi usada para extração de carotenoides de queijo adicionado de corante luteína (Jones et al., 2005), o tetraidrofurano para extração de carotenoides naturalmente presentes em queijo (Hulshof et al., 2006) e o etanol, utilizado como solvente extrator em leite fermentado fortificado com ésteres de luteína (Granado-Lorencio et al., 2010). Também foram empregados solventes imiscíveis com a água, como o acetato de etila para extração de carotenoides de iogurte adicionado de corante luteína (Aryana et al., 2006), uma mistura de éter etílico e éter de petróleo na proporção 1:1 (v/v) e hexano para carotenoides naturalmente presentes no leite (Hulshof et al., 2006; Nozière et al., 2006), e ainda, a mistura de hexano e diclorometano na proporção 5:1 (v/v) para extração de carotenoides de leite e de leite fortificado com vitaminas A e E (Herrero-Barbudo et al., 2005). Ao se fazer a escolha do solvente para extração, deve-se considerar que o leite e seus derivados são alimentos ricos em proteína e gordura, que além de interferir na análise por dificultarem a obtenção de um extrato límpido, ainda podem estar esterificados com os compostos de interesse.

Matrizes fluidas como leite e iogurte são frequentemente extraídas com a aplicação de métodos físicos mais suaves como ultrassom, vortex ou até mesmo centrifugação (Herrero-Barbudo et al., 2005; Granado-Lorencio et al., 2010; Nozière et al., 2006). Por outro lado, para os queijos, que apresentam textura rígida, são utilizados métodos mais vigorosos como a extração em almofariz ou homogeneizador (Jones et al., 2005; Hulshof et al., 2006). A maioria dos trabalhos que utilizam CLAE-DAD para quantificação dos carotenoides em leite e produtos lácteos realiza uma etapa de saponificação dos extratos, utilizando hidróxido de potássio como álcali em concentrações que variam entre 10 e 40%, geralmente em solução metanólica (Herrero-Barbudo et al., 2005; Jones et al. 2005; Nozière et al., 2006).

## 2.1. Validação de métodos

O desenvolvimento de um método analítico ou a adaptação e implementação de um método já conhecido na rotina de um laboratório exige a verificação de sua eficiência. Este processo de verificação, chamado validação, é realizado para garantir que o método é exato e reproduzível sobre uma faixa específica em que a substância de interesse será analisada. Segundo a ANVISA (2003), a validação deve garantir, através de estudos experimentais, que o método atende às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados.

Os parâmetros normalmente avaliados na validação de métodos são: seletividade, linearidade e faixa de aplicação, precisão, exatidão, limite de detecção, limite de quantificação e robustez. A seletividade do método está relacionada com a sua capacidade de avaliar as substâncias em análise, de forma inequívoca, na presença de componentes que podem interferir na sua determinação em uma amostra complexa. Este parâmetro pode ser obtido de várias maneiras, sendo mais usual a comparação entre a matriz isenta da substância de interesse e a matriz adicionada da mesma substância, sendo que nenhum sinal deve interferir no sinal gerado pela mesma (Ribani et al., 2004).

A linearidade corresponde à capacidade do método de fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração do analito, dentro de uma faixa de aplicação (Ribani et al., 2004). Este parâmetro é avaliado pela construção de uma curva analítica dos sinais obtidos em função da concentração da substância. Os resultados devem ser analisados por métodos estatísticos adequados, como o método de regressão linear, que proporcionem estimativas matemáticas do grau de linearidade do método. Um mínimo de 5 concentrações é recomendado para determinação da linearidade (ICH, 1996). A faixa de aplicação corresponde ao intervalo entre o valor superior e inferior da concentração da substância em exame, que atenda aos requisitos de precisão e exatidão. Para produtos

formulados, a ICH (1996) recomenda o estudo de linearidade em uma faixa de concentração com variação de  $\pm 20\%$  em relação ao valor esperado.

A precisão representa a dispersão dos resultados entre ensaios independentes repetidos para uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, sob condições definidas, e geralmente é expressa como a estimativa do desvio padrão relativo (RSD %). A precisão de métodos é considerada em três níveis: repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade. A repetibilidade está relacionada com a concordância entre os resultados de medidas sucessivas de um mesmo método nas mesmas condições, realizadas pelo mesmo analista, com o mesmo equipamento, no mesmo local e em um curto espaço de tempo. A *International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use* (ICH, 1996) e a ANVISA (2003) recomendam que a repetibilidade seja verificada a partir de um mínimo de nove repetições do mesmo procedimento (por exemplo, três repetições em três níveis diferentes), ou a partir de um mínimo de seis determinações de uma concentração similar ao valor esperado. A precisão intermediária indica as variações aleatórias que podem ocorrer dentro das circunstâncias em que o método será empregado, como diferentes dias de análise, diferentes analistas ou distintos equipamentos. O número de ensaios segue as mesmas recomendações do cálculo de repetibilidade (ICH, 1996; ANVISA, 2003). A reprodutibilidade refere-se aos resultados de ensaios em colaboração entre diferentes laboratórios e deve ser considerada no caso de padronização de um procedimento analítico para inclusão em farmacopeias, CODEX, etc. A IUPAC recomenda que resultados de oito laboratórios devam ser utilizados para os ensaios de reprodutibilidade (Thompson et al., 2002).

A exatidão do método representa o grau de concordância dos resultados obtidos experimentalmente com um valor de referência aceito como verdadeiro. Este parâmetro é sempre considerado dentro de um intervalo de confiança, que é mais estreito em níveis de concentração elevados e mais amplo em níveis de traços do composto em estudo. A exatidão de um método pode ser avaliada

através da análise de materiais de referência certificados (CRM), por comparação com outros métodos validados, por testes de recuperação ou ainda pelo método de adição padrão. Os CRM são fornecidos por órgãos reconhecidos como o NIST (*National Institute of Standards and Technology*) e contêm uma concentração certificada de uma determinada substância, com o grau de incerteza associado. Os resultados da análise do CRM obtido no laboratório devem ser comparados com o valor certificado para verificação da exatidão do método. A determinação da exatidão por comparação de métodos consiste na comparação dos resultados do método que se pretende validar com um método de referência, avaliando o grau de proximidade entre os resultados. A exatidão obtida por ensaios de recuperação consiste na adição de concentrações conhecidas do analito a uma amostra isenta da substância, onde a recuperação é definida como a proporção desta substância que é extraída e passível de ser quantificada pelo método. O método de adição padrão é empregado para determinação da exatidão quando não é possível produzir um branco da matriz sem a amostra de interesse. De acordo com este método, concentrações conhecidas do analito são adicionadas na matriz, que já contém concentrações desconhecidas da substância. As amostras sem adição do padrão e com adição do padrão em diferentes níveis são analisadas e as concentrações medidas são relacionadas com a quantidade adicionada (Ribani et al., 2004).

O limite de detecção (LD) representa a menor concentração do analito que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada pelo método analítico. O limite de detecção pode ser determinado de três maneiras: pelo método visual, pelo método da relação sinal-ruído ou ainda, através de parâmetros da curva analítica. O método visual determina o LD pela adição de concentrações conhecidas do analito à matriz de maneira que se diferencie o ruído e o sinal analítico produzido pelo analito pela visualização da menor concentração visível. A relação sinal-ruído só pode ser empregada para métodos que apresentam o ruído em sua linha de base e é realizada pela comparação de sinais medidos a partir de amostras contendo baixas concentrações conhecidas do analito com os sinais do

branco. A partir desta comparação é estabelecida a concentração mínima a partir da qual o analito pode ser detectado. O LD também pode ser estimado a partir da curva analítica construída para a avaliação da linearidade do método e é expresso como:

$$LD = 3,3 \times \frac{s}{S}$$

onde  $s$  é a estimativa do desvio padrão da resposta (que pode ser a estimativa do desvio padrão do branco, da equação da linha de regressão ou do coeficiente linear da equação) e  $S$  é a inclinação ou o coeficiente angular da curva analítica (ICH, 1996; Ribani et al., 2004).

O limite de quantificação (LQ) corresponde à menor concentração da substância estudada que pode ser medida com precisão e exatidão aceitáveis, utilizando determinado método analítico. Os mesmos critérios empregados para determinação do LD também podem ser adotados para o LQ, ou seja, o cálculo pode ser realizado pelo método visual, pela relação sinal-ruído ou pelos parâmetros da curva analítica. Quando calculado pelo método da curva analítica, o LQ é expresso como:

$$LQ = 10 \times \frac{s}{S}$$

de acordo com os mesmos parâmetros empregados para cálculo do LD (ICH, 1996; Ribani et al., 2004).

A robustez de um método analítico expressa sua resistência a mudanças produzidas nos resultados quando ligeiras alterações são realizadas em suas condições experimentais, ou seja, um método robusto é aquele que não é afetado por pequenas modificações deliberadas em seus parâmetros (Thompson et al., 2002). Desta forma, a robustez é avaliada pela introdução de pequenas variações no procedimento analítico como a mudança de equipamentos, analista, marca ou concentração de reagentes, pH de soluções, temperatura de reação e a verificação de seus efeitos na produção dos resultados. Uma ferramenta bastante utilizada para avaliação da robustez é o teste de Youden, onde são realizados oito ensaios com uma combinação fatorial dos efeitos e verifica-se qual efeito ou combinação de efeitos que implicam em variações no resultado final (Thompson et al., 2002; Ribani et al., 2004).

O NIST disponibiliza 3 diferentes CRM para avaliação da exatidão de métodos quantitativos de carotenoides em alimentos: purê processado de espinafre (SRM 2385; NIST 2012), extrato de cenoura em óleo (SRM 3276; NIST 2009) e um preparado de alimento para bebês (*baby food*, SRM 2383; NIST 2000). O purê processado de espinafre fornece concentrações certificadas de luteína (incluindo seus ésteres) e  $\beta$ -caroteno, com valores de incerteza de 20 e 15 % para estes carotenoides, respectivamente. O extrato de cenoura em óleo determina valores somente para alguns carotenos: *all-trans*- $\beta$ -caroteno, *cis*- $\beta$ -caroteno totais,  $\beta$ -caroteno total (*cis+trans*) e *all-trans*- $\alpha$ -caroteno (incerteza de 23, 32, 23 e 17 %, respectivamente). O alimento infantil é o CRM que fornece valores para o maior número de carotenoides: luteína, zeaxantina,  $\beta$ -criptoxantina, licopeno,  $\alpha$ -caroteno,  $\beta$ -caroteno e ainda pelo retinol e palmitato de retinol. Os valores de incerteza para os carotenoides neste CRM variam entre 16 % para zeaxantina, juntamente com seus ésteres, até 40 % para a luteína livre. Considerando os elevados valores de incerteza de carotenoides nos materiais certificados disponíveis, a exatidão de métodos para quantificação destes pigmentos geralmente é validada através de análises de recuperação, embora a

porcentagem de recuperação não expresse verdadeiramente a influência da complexidade da matriz na eficiência da extração (Mercadante, 2008).

Apesar de existirem diversos protocolos descrevendo parâmetros para validação de métodos (ICH, 1996; Thompson et al., 2002; Ribani et al., 2004), não há um procedimento definitivo a ser adotado. O processo de validação deve ser adequado às condições e necessidades do laboratório, características do analito e da amostra e critérios de aceitação desejáveis. Portanto, sua finalidade é comprovar que o método desenvolvido é adequado para o objetivo ao qual se propõe.

### 3. Leite e produtos lácteos

A composição do leite reflete seu papel como única fonte da alimentação de mamíferos muito jovens, consistindo-se de uma mistura complexa de lipídios, proteínas, carboidratos, vitaminas e minerais. O maior componente é a água (em torno de 87%), seguida da lactose (5%), lipídios (4%), proteínas (4%) e minerais (menos de 1%). A dieta e a raça do animal influenciam a composição do leite e a maior variabilidade de composição é encontrada na fração lipídica (Swaisgood, 2010).

Os carotenoides não estão largamente distribuídos em alimentos de origem animal, tal como o leite e seus derivados, e quando presentes, são encontrados em baixos níveis. Isso se deve ao fato de que os carotenoides são obtidos através da dieta, são absorvidos, convertidos e depositados como vitamina A ou ainda podem ser modificados e armazenados na forma de metabólitos. No leite bovino, a concentração de carotenoides varia e é influenciada pela raça do animal, estado fisiológico, período de lactação e principalmente pela alimentação (Nozière et al., 2006; Calderón et al., 2007). O teor médio de carotenoides no leite é de 20 µg/100 g e o *all-trans*-β-caroteno é o principal carotenoide presente, representando cerca de 90 % do total de carotenoides. Em menores concentrações também podem ser encontradas luteína, zeaxantina e β-criptoxantina (Hulshof et al., 2006).



O iogurte é o produto resultante da fermentação do leite viabilizada pela cultura inicial mista composta por *Streptococcus salivarius* subsp *thermophilus* e por *Lactobacillus delbruechii* subsp *bulgaricus*. Este produto caracteriza-se como um gel viscoso de sabor característico atribuído ao ácido láctico, acetaldeído, diacetil, dentre outras substâncias voláteis que são produzidas pela ação simbiótica das culturas lácteas (Tamime e Robinson, 1999). O iogurte apresenta composição similar à do leite a partir do qual foi elaborado, constituindo-se em fonte de proteínas, cálcio, fósforo, magnésio, zinco e vitaminas B<sub>2</sub> e B<sub>12</sub> (Tamime e Deeth, 1980).

O Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Queijo Prato, aprovado pela portaria n° 358 de 4 de setembro de 1997 do Ministério da Agricultura e do Abastecimento, define queijo prato como um queijo maturado, obtido por coagulação do leite por meio de coalho e/ou enzimas coagulantes apropriadas, complementada ou não pela ação de bactérias lácticas específicas. É classificado como um queijo gordo de média umidade e de massa semicozida, devendo apresentar consistência semidura e elástica, textura lisa, podendo apresentar algumas olhaduras bem distribuídas. Para adquirir suas características específicas deve maturar pelo tempo mínimo de 25 dias (Brasil, 1997).

O leite e seus derivados são produtos bastante aceitos por estarem relacionados a hábitos alimentares considerados “saudáveis”, principalmente por serem carreadores efetivos de micronutrientes como as vitaminas A e E (Heyes et al., 2001). O Brasil tem demonstrado um desenvolvimento considerável no mercado de lácteos desde o final da década de 1980, que está diretamente relacionado ao crescimento populacional, ao aumento da renda média *per capita* e à mudança nos hábitos de consumo. O consumo de iogurte vem crescendo no país, e dados mostram que as vendas deste produto aumentaram cerca de 32% do ano de 2006 para 2007 (Necnetwork, 2008). O consumo *per capita* de queijo também demonstrou crescimento entre os anos 2000 e 2008, subindo de 2,6 para 3,4 Kg de queijo, segundo dados da EMBRAPA (Brasil, 2008). Este índice é bastante inferior ao consumo registrado em 2008 nos EUA (15 Kg), que é o país

com maior consumo mundial de queijo, mas é superior ao índice médio de consumo de queijo registrado nos países asiáticos em 2008 (1,8 Kg *per capita*).

A fortificação de alimentos de consumo frequente tem se mostrado uma forma eficaz e de baixo custo para aumentar o aporte de micronutrientes e reduzir a incidência da deficiência dos mesmos (Berner et al., 2001; Dary & Mora, 2002). Tendo em vista os efeitos promotores da saúde atribuídos à luteína, seu emprego na fortificação de produtos lácteos é uma alternativa bastante promissora para aumentar a ingestão deste carotenoide pela população, principalmente entre os idosos.

Os produtos lácteos em geral são bastante suscetíveis à foto-oxidação já que possuem como componente importante a riboflavina (1,75 mg/L), vitamina B2, que é uma molécula foto-sensibilizadora. Durante a estocagem e exposição nas gôndolas dos supermercados, estes produtos ficam sujeitos à ação da luz fluorescente, principalmente quando embalados em materiais transparentes, o que proporciona condições favoráveis para absorção de luz pela riboflavina. A riboflavina é capaz de absorver luz e passar do estado singlete fundamental ( $^1\text{Rf}$ ) para o estado singlete excitado ( $^1\text{Rf}^*$ ), que é convertido no estado triplete excitado ( $^3\text{Rf}^*$ ) por intercruzamento de sistemas. A partir daí, a  $^3\text{Rf}^*$  pode seguir dois mecanismos de reação (Figura 3). No mecanismo do Tipo I, a  $^3\text{Rf}^*$  reage com uma molécula biológica (RH), por abstração de hidrogênio ou doação de elétrons, produzindo radicais livres e íons radicalares. No mecanismo Tipo II, a  $^3\text{Rf}^*$  transfere sua energia para o oxigênio molecular triplete ( $^3\text{O}_2$ ), formando oxigênio molecular no estado singlete ( $^1\text{O}_2$ ), que também pode oxidar uma molécula biológica. Esta molécula biológica pode ser uma proteína, um ácido graxo ou ainda uma vitamina lipossolúvel, acarretando na perda destes nutrientes, na formação de *off-flavors* e também na formação de produtos de oxidação que podem ser prejudiciais à saúde humana (Bradley et al., 2006).



absorção e posteriormente passando à corrente sanguínea. A bioacessibilidade inclui a sequência de eventos que ocorrem durante a transformação do alimento em material capaz de ser assimilado pelo organismo, sua absorção pelas células do epitélio intestinal e seu metabolismo pré-sistêmico, tanto intestinal quanto hepático. Somada à bioatividade, representa o que é chamado de “biodisponibilidade” (Figura 4), termo que é utilizado de forma indiscriminada e por muitas vezes mal aplicado. O conceito de bioatividade está relacionado com o modo como os compostos bioativos são transportados e alcançam os tecidos-alvo, como interagem com biomoléculas, como são metabolizados ou biotransformados, como e quais biomarcadores geram e com a resposta fisiológica que causam no organismo. As alegações de efeitos promotores de saúde e de redução do risco de doenças atribuídas a certas classes de alimentos são baseadas em estudos de bioatividade (Fernández-García et al., 2009).

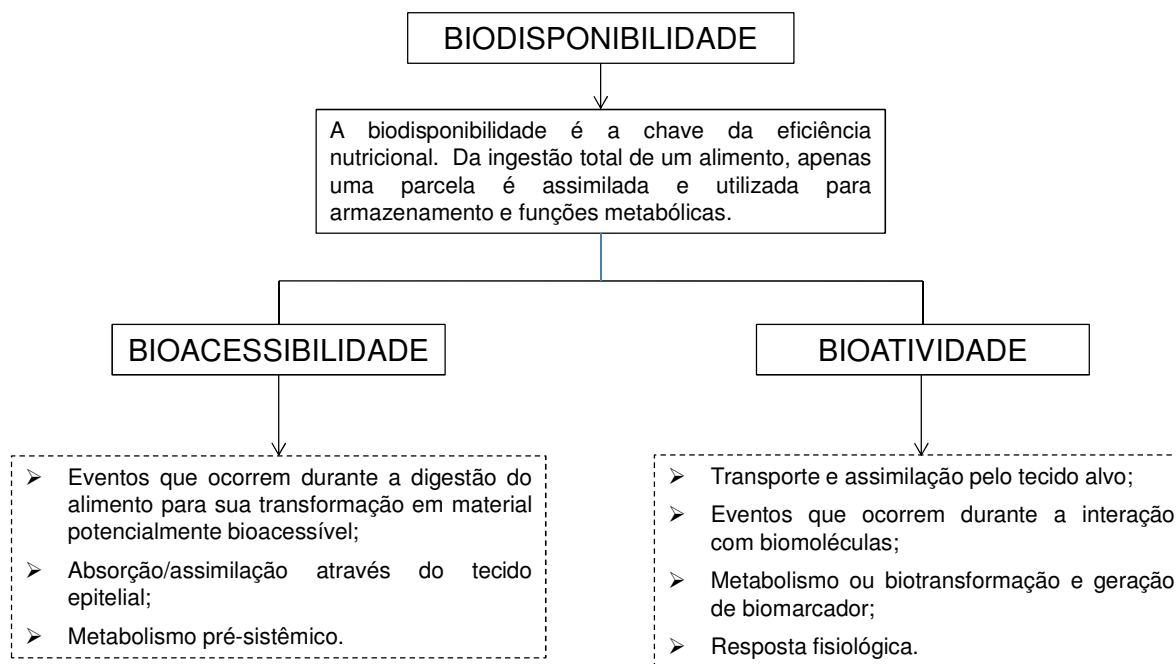


Figura 4. Definição de biodisponibilidade como o somatório de bioacessibilidade e bioatividade e eventos físico-químicos envolvidos em cada etapa. Fonte: Fernández-García et al. (2009).

Paralelamente ao crescente interesse sobre as substâncias bioativas presentes nos alimentos, cresce também a necessidade de dados a respeito da bioacessibilidade destes compostos no organismo humano. Estudos em humanos, que indubitavelmente são o melhor meio de se avaliar a ingestão e a distribuição dos nutrientes da dieta, são ensaios que apresentam inúmeras implicações éticas e ainda demandam tempo e elevados custos para que se obtenham resultados significativos (Biehler et al., 2011). Desta forma, métodos *in vitro* têm sido desenvolvidos e aplicados como uma alternativa simples e de menor custo para estimar a bioacessibilidade de diferentes classes de compostos, incluindo os carotenoides (Garrett et al., 1999; Hedren et al., 2002.; Biehler et al., 2011). Estes ensaios *in vitro* simulam a passagem do alimento pelo trato gastrintestinal humano e embora sejam focados em aspectos parciais da digestão, como a liberação do composto da matriz e sua incorporação em micelas, evidências demonstram que os resultados destes métodos para carotenoides podem ser correlacionados com dados obtidos a partir de estudos em humanos (Reboul et al., 2006).

A transformação dos carotenoides em material bioacessível para o organismo é similar a que ocorre com outros componentes lipídicos do alimento e se dá basicamente em três etapas: solubilização, micelarização e absorção. A solubilização tem início com a liberação dos carotenoides da matriz alimentícia através da ruptura celular, o que ocorre principalmente durante o processamento, a preparação e a mastigação do alimento. Em seguida, os pigmentos são agrupados em pequenas gotas de gordura na emulsão gástrica e sofrem hidrólise enzimática pela ação de enzimas como a lipase pancreática e a colesterol esterase. Posteriormente ocorre a etapa de micelarização, onde há a diminuição do tamanho das gotículas de gordura e a formação das micelas mistas pela ação de sais biliares. As micelas mistas são agregados moleculares que transportam o material lipossolúvel tornando-o acessível às células do epitélio intestinal e que são compostas por fosfolipídios biliares, lipídios da dieta e seus produtos de hidrólise. Os carotenoides são absorvidos pelas células intestinais e incorporados aos quilomícrons, os quais são secretados no sistema linfático e alcançam a

corrente sanguínea pelas veias subclávia esquerda e jugular interna esquerda (Yonekura & Nagao, 2007; Fernández-García et al., 2012).

A determinação da bioacessibilidade de carotenoides é bastante complexa, pois sofre influência de distintos fatores associados ao carotenoide, à matriz alimentícia que o contém e ao indivíduo que virá a consumir o alimento. A lipossolubilidade do carotenoide está intrinsicamente relacionada com sua estrutura química e interfere na eficiência da etapa de micelarização (Fernández-García et al., 2012). Existem estudos que comprovam que as xantofilas, como a luteína, são mais bioacessíveis quando comparadas aos carotenos (van het Hof et al., 1999; Reboul et al., 2006) provavelmente por se organizarem de maneira distinta na estrutura das micelas. Enquanto os carotenos, que são mais hidrofóbicos, se localizam no interior das micelas, as xantofilas encontram-se na superfície das mesmas, estando mais acessíveis para absorção pelas células do epitélio intestinal (Borel et al., 1996). Além disso, o fato de as xantofilas estarem ou não esterificadas com ácidos graxos também altera sua bioacessibilidade. O aumento da lipossolubilidade devido à mudança na estrutura, e a dependência da reação de desesterificação (provavelmente realizada pela ação de lipases pancreáticas) aumentam a necessidade de sais biliares e enzimas digestivas para que a assimilação dos ésteres de xantofilas seja efetiva (Fernández-García et al., 2012).

A composição da matriz alimentícia é outro fator de grande impacto na bioacessibilidade dos carotenoides. A ingestão concomitante de lipídios e de carotenoides é determinante para a absorção destes pigmentos. A presença de lipídios estimula as secreções biliares e os níveis de lipase pancreática, aumentando a capacidade de micelarização (Hornero-Méndez & Mínguez-Mosquera, 2007). Entretanto, estudos comparativos indicam que certos tipos de lipídios, como triacilgliceróis de cadeia curta e média, podem diminuir a bioacessibilidade dos carotenoides (Hollander & Ruble, 1978). Além dos lipídios, a presença de fibras solúveis também influi na etapa de micelarização, reduzindo sua eficiência devido à solubilização das secreções biliares nos geis formados

durante a digestão gástrica, causando uma redução na bioacessibilidade dos carotenoides (Erdman et al., 1986).

O tipo de processamento ao qual o alimento é submetido pode alterar a fração do composto que é solúvel na matriz. O emprego de homogeneização mecânica e o tratamento térmico aumentam a bioacessibilidade dos carotenoides, provocando o enfraquecimento ou rompimento da estrutura da parede celular, e conseqüentemente facilitando a liberação dos pigmentos. O cozimento também atua dissociando complexos entre proteínas e carotenoides, que são bastante comuns em frutas e vegetais *in natura*. Quando foi avaliada a bioacessibilidade do  $\beta$ -caroteno de cenouras processadas de diferentes maneiras, verificou-se que o cozimento duplicou a bioacessibilidade deste carotenoide em cenouras picadas. Além disso, a diminuição no tamanho de partícula do alimento também levou a um aumento no nível de  $\beta$ -caroteno acessível, quando foram comparadas cenouras picadas e polpa de cenoura (Hedrén et al., 2002).

Os fatores relacionados ao indivíduo também são determinantes na bioacessibilidade, como o estado nutricional, baixa absorção de lipídios, presença de inibidores, parasitas intestinais, infecções e também fatores genéticos (Rodriguez-Amaya, 2010). Existem evidências de que a absorção de carotenoides é maior em mulheres do que em homens, fato que pode estar relacionado a diferenças de peso e composição corporal (Castenmiller & West, 1998). Com relação ao estado nutricional, a absorção de carotenoides também parece ser dependente dos níveis de vitamina A, já que indivíduos com elevados níveis plasmáticos desta vitamina apresentam reduzida absorção de carotenoides (Castenmiller & West, 1998). Um estudo de bioacessibilidade *in vitro* demonstrou que a ausência da enzima pancreatina resultou em uma drástica queda na micelarização de carotenoides (Biehler et al., 2011). Esta situação pode ocorrer *in vivo* em casos de pacientes com fibrose cística, que apresentam redução nas concentrações secretadas de pancreatina, possivelmente resultando em uma absorção inadequada de luteína, zeaxantina e  $\beta$ -caroteno.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alves-Rodrigues, A.; Shao, A. The Science behind lutein. **Toxicology Letters**, 150, 57-83, 2004.
- ANVISA Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RE nº 899**, de 29 de maio de 2003.
- Aryana, K. J.; Barnes, H. T.; Emmick, T. K.; McGrew, P.; Moser, B. Lutein is stable in strawberry yogurt and does not affect its characteristics. **Journal of Food Science**, 71, 6, 467-472, 2006.
- Assunção, R.B.; Mercadante, A.Z. Carotenoids and ascorbic acid from cashew apple (*Anacardium occidentale* L.): variety and geographic effects. **Food Chemistry**, 81, 495-502, 2003.
- Berner, L.A.; Clydesdale, F.G.; Douglass, J.S. Fortification contributed greatly to vitamin and mineral intakes in the United States, 1989-1991. **The Journal of Nutrition**, 131, 2177-2183, 2001.
- Bhosale, P.; Serban, B.; Bernstein, P.S.; Retinal carotenoids can attenuate formation of A2E in the retinal pigment epithelium. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 483, 175-181, 2009.
- Biehler, E.; Kaulmann, A.; Hoffmann, L.; Krause, E.; Bohn, T. Dietary and host-related factors influencing carotenoid bioaccessibility from spinach (*Spinacia oleracea*). **Food Chemistry**, 125, 1328-1334, 2011.
- Biehler, E.; Mayer, F.; Hoffmann, L.; Krause, E.; Bohn, T. Comparison of 3 spectrophotometric methods for carotenoid determination in frequently consumed fruits and vegetables. **Journal of Food Science**, 75, 55-61, 2010.
- Bone, R.A.; Landrum, J.T.; Dixon, Z.; Chen, Y.; Llerena, C.M. Lutein and zeaxanthin in the eyes, serum and diet of human subjects. **Experimental Eye Research**, 71, 239-245, 2000.



- Borel, P.; Grolier, P.; Armand, M.; Partier, A.; Lafont, H.; Lairon, D.; Azais-Braesco, V. Carotenoids in biological emulsions: Solubility, surface-to-core distribution, and release from lipid droplets. **Journal of Lipid Research**, 37, 250–261, 1996.
- Bradley, D.G.; Kim, H.J.; Min, D.B. Effect, quenching mechanisms, and kinetics of water soluble compounds in riboflavin photosensitized oxidation of milk. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 54, 6016-6020, 2006.
- Brasil. Conselho Nacional de Saúde. **Resolução CNS/MS n° 04, de 24 de novembro de 1988**. Aprova a Tabela de aditivos intencionais.
- Brasil. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA Gado de Leite. Consumo per capita mundial de queijos, 2008. Disponível em: <  
<http://www.cnpqgl.embrapa.br/>> Acesso em: 20 de jun. 2011.
- Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Portaria n° 358 de 4 de setembro de 1997**. Aprova o Regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade do queijo Prato.
- Britton, G. UV/visible spectroscopy. In *Carotenoids. vol. 1B: Spectroscopy*, G. Britton; S. Liaansen-Jensen; H. Pfander Eds. Basel: Birkhuaser, 1995.
- Calderón, F.; Chauveau-Duriot, B.; Martin, B.; Graulet, B.; Doreau, M.; Nozière, P. Variations in carotenoids, vitamins A and E, and color in cow's plasma and milk during late pregnancy and the first three months of lactation. **Journal of Dairy Science**, 90, 2335-2346, 2007.
- Castenmiller, J.J.M.; West, C.E. Bioavailability and bioconversion of carotenoids. **Annual Review of Nutrition**, 18, 19-38, 1998.
- Chisté, R.C.; Mercadante, A.Z.; Gomes, A.; Fernandes, E.; Lima, J.L.F.C.; Bragagnolo, N. *In vitro* scavenging capacity of annatto seed extracts against reactive oxygen and nitrogen species. **Food Chemistry**, 127, 419-426, 2011a.
- Chisté, R.C.; Yamashita, F.; Gozzo, F.C.; Mercadante, A.Z. Simultaneous extraction and analysis by high performance liquid chromatography coupled to

- diode array and mass spectrometric detectors of bixin and phenolic compounds from annatto seeds. **Journal of Chromatography A**, 1218, 57-63, 2011b.
- Dary, O.; Mora, J.O. Food fortification to reduce vitamin A deficiency: International vitamin A consultative group recommendations, **The Journal of Nutrition**, 132, 2927S-2930S, 2002.
- Davies, B.H. Carotenoids, In *Chemistry and biochemistry of plant pigments, vol. 2*, T.W. Goodwin Ed. London: Academic Press, 1976.
- De Rosso, V. & Mercadante, A.Z. Carotenoid composition of two Brazilian genotypes of acerola (*Malpighia puniceifolia* L.) from two harvests. **Food Research International**, 38, 1073-1077, 2005.
- Delgado-Vargas, F.; Paredes-López, O. Carotenoids, In *Natural colorants for food and nutraceuticals uses*. New York: CRC Press, 2003.
- Di Mascio, P.; Kaiser, S.; Sies, H. Lycopene as the most efficient biological carotenoids singlet oxygen quencher. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 274, 532-538, 1989.
- Erdman, J.W.; Fahey, G.C.; White, C.B. Effects of purified dietary fiber sources on beta-carotene utilization by the chick. **The Journal of Nutrition**, 116, 2415–2423. 1986.
- Fernández-García, E.; Carvajal-Lérída, I.; Jarén-Galán, M.; Garrido-Fernández, J.; Pérez-Gálvez, A.; Hornero-Méndez, D. Carotenoids bioavailability from foods: From plants pigments to efficient biological activities. **Food Research International**, 46, 438-450, 2012.
- Fernández-García, E.; Carvajal-Lérída, I.; Pérez-Gálvez, A. In vitro bioaccessibility assessment as a prediction tool of nutritional efficiency. **Nutrition Research**, 29, 751-760, 2009.
- Garrett, D.A.; Failla, M.L.; Sarama, R.J. Development of an in vitro digestion method to assess carotenoid bioavailability from meals. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 47, 4301-4309, 1999.

- Gau, W.; Plosche, H.J.; Wunsche, C. Mass spectrometric identification of xanthophyll fatty acid esters from Marigold flowers (*Tagetes erecta*) obtained by high performance liquid chromatography and counter current distribution. **Journal of Chromatography**, 262, 277–284, 1983.
- Granado-Lorencio, F.; Herrero-Barbudo, C.; Olmedilla-Alonso, B.; Blanco-Navarro, I.; Pérez-Sacristán, B. Lutein bioavailability from lutein ester-fortified fermented milk: *in vivo* and *in vivo* study. **Journal of Nutritional Biochemistry**, 21, 2, 133-139, 2010.
- Gregory, G.K.; Chen, T.S.; Philip, T. Quantitative analysis of lutein esters in marigold flowers (*Tagetes erecta*) by high performance liquid chromatography. **Journal of Food Science**. 51, 1093–1094, 1986.
- Hedren, E.; Diaz, V.; Svanberg, U. Estimation of carotenoid accessibility from carrots determined by an *in vitro* digestion method. **European Journal of Clinical Nutrition**, 56, 425-430, 2002.
- Herrero-Barbudo, M. C.; Granada-Lorencio, F.; Blanco-Navarro, I.; Olmedilla-Alonso, B. Retinol,  $\alpha$ - and  $\gamma$ -tocopherol and carotenoids in natural and vitamin A- and E-fortified dairy products commercialized in Spain. **International Dairy Journal**, 15, 521-526, 2005.
- Heyes, K.C.; Pronczuk, A.; Perlman, D. Vitamin E in fortified cow milk uniquely enriches human plasma lipoproteins. **The American Journal of Clinical Nutrition**, 74, 211-218, 2001.
- Hollander, D.; Ruble, P.E. Beta-carotene intestinal absorption: Bile, fatty acid, pH, and flow rate effects on transport. **The American Journal of Physiology**, 235, E686–E691, 1978.
- Hornero-Méndez, D.; Mínguez-Mosquera, M.I. Bioaccessibility of carotenes from carrots: Effect of cooking and addition of oil. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, 8, 407-412, 2007.

Hulshof, P. J. M.; Van Roekel-Jansen, T.; Van de Bovenkamp, P.; West, C. E. Variation in retinol and carotenoid content of milk and milk products in The Netherlands. **Journal of Food Composition and Analysis**, 19, 67-75, 2006.

ICH International Conference on Harmonization of Technical Requirements for registration of Pharmaceutical for Human use. **Q 2B- validation of Analytical procedure: methodology**, 1996.

Jones, S. T.; Aryana, K. J.; Losso, J. N. Storage stability of lutein during ripening of cheddar cheese. **Journal of Dairy Science**, 88, 1661-1670, 2005.

Khachik, F.; Beecher, G. R.; Whitaker, N.F. Separation, identification, and quantification of the major carotenoid and chlorophyll constituents in extracts of several green vegetables by liquid chromatography. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 34, 603-616, 1986.

Khachik, F.; Bernstein, P.S.; Garland, D.L. Identification of lutein and zeaxanthin oxidation products in human and monkey retinas. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, 38, 1802-1811, 1997.

Kimura, M.; Rodriguez-Amaya, D. B.; Godoy, H. T. Assessment of the saponification step in the quantitative determination of carotenoids and provitamin A. **Food Chemistry**, 35, 187-195, 1990.

Krinsky, N.I.; Landrum, J.T.; Bone, R.A. Biologic mechanisms of the protective role of lutein and zeaxanthin in the eye. **Annual Reviews of Nutrition**, 23, 171-201, 2003.

Landrum, J.T.; Bone, R.A.; Joa, H.; Kilburn, M.D.; Moore, L.L.; Sprague, K.E. A one year study of the macular pigment: the effect of 140 days of a lutein supplement. **Experimental Eye Research**, 65, 57-62, 1997.

Mercadante, A. Z. Analysis of Carotenoids. In *Food Colorants: Chemical and Functional Properties*, C. Socaciu Ed. New York: CRC Press, 2008.

- Montenegro, M.A.; Rios, A.O.; Mercadante, A.Z.; Nazareno, M.A.; Borsarelli, C.D. Model studies on the photosensitized isomerization of bixin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 52, 376-373, 2004.
- Montenegro, M.A.; Nunes, I.L.; Mercadante, A.Z.; Borsarelli, C.D. Photoprotection of vitamins in skimmed milk by an aqueous soluble lycopene-gum Arabic microcapsule. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 55, 323-329, 2007.
- NECNETWORK. **Cresce o consumo de iogurte no Brasil**. 2008. Disponível em: <[http://www.necnet.net/artigo.php?id\\_artigo=40246&item=16807](http://www.necnet.net/artigo.php?id_artigo=40246&item=16807)> Acesso em: 25 jun. 2011.
- NIST National Institute of Standards & Analysis. Baby food composite, **Certificate of Analysis: Standard Reference Material® 2383**, 2000.
- NIST National Institute of Standards & Analysis. Carrot extract in oil, **Certificate of Analysis: Standard Reference Material® 3276**, 2009.
- NIST National Institute of Standards & Analysis. Slurried spinach, **Certificate of Analysis: Standard Reference Material® 2385**, 2012.
- Nozière, P.; Grolier, P.; Durand, D.; Ferlay, A.; Pradel, P.; Martin, B. Variations in carotenoids, fat-soluble micronutrients, and color in cow's plasma and milk following changes in forage and feeding level. **Journal of Dairy Science**, 89, 2634-2648, 2006.
- Pérez-Gálvez, A.; Mínguez-Mosquera, M.I. Pérez-Gálvez, A.; Mínguez-Mosquera, M.I. Esterification of xanthophylls and its effect on chemical behavior and bioavailability of carotenoid in the human. **Nutrition Research**, 25, 631-640, 2005.
- Perry, A.; Rasmussen, H.; Johnson, E.J. Xanthophyll (lutein, zeaxanthin) content in fruits, vegetables and corn and egg products. **Journal of Food Composition and Analysis**, 22, 9-15, 2009.

- Reboul, E.; Richelle, M.; Perrot, E.; Esmoulin-Malezet, C.; Pirisi, V.; Borel, P.; Bioaccessibility of carotenoids and vitamin E from their main dietary sources. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 54, 8749-8755, 2006.
- Ribani, M.; Bottoli, C.B.G.; Collins, C.H.; Jardim, I.C.S.F.; Melo, L.F.C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos, **Química Nova**, 27, 771-780, 2004.
- Rodriguez-Amaya, D. B. Quantitative analysis, in vitro assessment of bioavailability and antioxidant activity of food carotenoids – A review. **Journal of Food Composition and Analysis**, 23, 726-740, 2010.
- Rodriguez-Amaya, D.B.; Kimura, M.; Godoy, H.T.; Amaya-Farfan, J. Updated Brazilian database on food carotenoids: Factors affecting carotenoid composition. **Journal of Food Composition and Analysis**, 21, 445-463, 2008.
- Swaigood. H.E. Características do leite. In *Química de Alimentos de Fennema*, S. Damodaran, K.L. Parkin, O.R. Fennema Eds. A. Brandelli; A.O. Rios; A.L.O. de Carvalho; F. Cladera-Olivera; I. Nunes; P.F. Hertz Trads. Porto Alegre: Artmed, 2010.
- Tamime, A.Y.; Deeth, H.C. Yogurt technology and biochemistry. **Journal of Food Protection**. 43, 939-977, 1980.
- Tamime, A.Y.; Robinson, R.K. **Yogurt – Science and Technology**. 2 ed. New York: CRC Press, 1999.
- Thompson, M.; Ellison, S.L.R.; Wood, R. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis – IUPAC Technical Report. **Pure Applied Chemistry**, 74, 835-855, 2002.
- van het Hof, K.H.; Brouwer, I.A.; West, C.E.; Haddeman, E., van Steegers-Theunissen, R.P.M.; Dusseldorp, M.; Weststrate, J.A.; Eskes, T.K.A.B.; Hautvast, J.G.A.J. Bioavailability of lutein from vegetables is 5 times higher than that of  $\beta$ -carotene. **American Journal of Clinical Nutrition**, 70, 261–268, 1999.

Yonekura, L.; Nagao, A. Intestinal absorption of dietary carotenoids. **Molecular Nutritional & Food Research**, 51, 107-115, 2007.





## CAPÍTULO II

**Desenvolvimento e validação de método espectrofotométrico para  
determinação de corante à base de luteína adicionado em iogurte desnatado**

Ana A. O. Xavier, Lígia D. Domingos, Walkíria H. Viotto, Adriana Z. Mercadante

Reproduzido de *Química Nova*, a ser publicado, v. 35 (2012), publicado na web em 31/08/2012, Xavier, A.A.O., Domingos, L.D., Viotto, W.H., Mercadante, A.Z. **Desenvolvimento e validação de método espectrofotométrico para determinação de corante à base de luteína adicionado em iogurte desnatado**, sob permissão da © Sociedade Brasileira de Química.



## DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO PARA DETERMINAÇÃO DE CORANTE À BASE DE LUTEÍNA ADICIONADO EM IOGURTE DESNATADO

Ana Augusta Odorissi Xavier e Adriana Zerlotti Mercadante\*

Departamento de Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Rua Monteiro Lobato, 80, 13083-862 Campinas - SP, Brasil

Lígia Dozena Domingos e Walkíria Hanada Viotto

Departamento de Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Rua Monteiro Lobato, 80, 13083-862 Campinas - SP, Brasil

Recebido em 3/2/12; aceito em 2/7/12; publicado na web em 31/8/12

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF A SPECTROPHOTOMETRIC METHOD FOR DETERMINATION OF LUTEIN COLORANT ADDED TO NONFAT YOGURT. A simple analytical method for extraction and quantification of lutein colorant added to yogurt was developed and validated. The method allowed complete extraction of carotenoids using tetrahydrofuran in vortex, followed by centrifugation, partition to diethyl ether/petroleum ether, and drying. The carotenoids dissolved in ethanol were quantified by UV-Vis spectrophotometry. This method showed linearity in the range tested (1.41-13.42  $\mu\text{g g}^{-1}$ ), limits of detection and quantification of 0.42 and 1.28  $\mu\text{g g}^{-1}$ , respectively, low relative standard deviation (3.4%) and recovery ranging from 95 to 103%. The method proved reliable for quantification of lutein added to yogurt.

Keywords: UV-Vis spectroscopy; yogurt; lutein colorant.

### INTRODUÇÃO

Os carotenoides são pigmentos sintetizados por plantas superiores, microrganismos e alguns animais, com coloração que varia do amarelo ao vermelho. Sua estrutura terpenoide apresenta um extenso sistema de ligações duplas conjugadas, que é responsável tanto por sua capacidade de absorver luz na região do visível quanto por sua elevada reatividade química.<sup>1</sup> Os carotenoides são conhecidos por seu emprego como corantes e também por sua atividade biológica, e seu consumo tem sido inversamente correlacionado com a ocorrência de doenças crônico-degenerativas.<sup>2</sup> Dentre estes pigmentos, a luteína se destaca pela sua associação com a diminuição da ocorrência e prevenção da catarata e da degeneração macular relacionada à idade (DMRI).<sup>3-5</sup> A DMRI caracteriza-se pela degradação da porção central da retina e é a maior causa de cegueira irreversível em idosos.<sup>6</sup>

O leite e seus derivados são produtos bastante aceitos pelo mercado consumidor por estarem relacionados a hábitos alimentares ditos "saúdáveis", já que são fontes de cálcio, proteínas e vitaminas A e E.<sup>7</sup> Tendo em vista o crescimento do mercado de produtos derivados do leite e de alimentos funcionais,<sup>8</sup> os produtos lácteos se apresentam como potenciais veículos de adição de substâncias benéficas à saúde, como a luteína, considerando a relação inversa entre o consumo deste carotenoide e o desenvolvimento de DMRI.

A análise quantitativa de carotenoides em iogurte e outras matrizes lácteas envolve várias etapas, incluindo a extração com solventes de baixa polaridade, saponificação e posterior separação dos compostos por cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa, geralmente acoplada a um detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD).<sup>9-11</sup> Esta técnica permite a detecção e quantificação de cada composto separadamente, mas com as desvantagens de maior tempo de análise, alto custo do equipamento e a necessidade de um extrato livre de impurezas. Por outro lado, o método clássico de quantificação de carotenoides por espectrofotometria na região do UV-visível ainda tem sido empregado em diversas matrizes,

principalmente naquelas ricas em um carotenoide específico, onde se utiliza o comprimento de onda de absorção máxima do carotenoide majoritário e seu correspondente coeficiente de absorvibilidade.<sup>12</sup> Além disso, os parâmetros analíticos do método devem ser adequados à intenção de uso do mesmo, ou seja, um método para análise de compostos presentes em elevadas concentrações, como o corante luteína adicionado ao iogurte, não requer a mesma sensibilidade de um método desenvolvido para análise de traços.<sup>13</sup>

O corante natural à base de luteína adicionado aos iogurtes preparados neste estudo constitui uma matriz bastante complexa pois contém, além de carotenoides, amido modificado, ácido ascórbico, palmitato de ascorbilo, alfa-tocoferol, benzoato de sódio, óleo de girassol e maltodextrina. Devido à presença de óleos vegetais, para realizar a análise do corante por CLAE é necessário saponificar os extratos com uma concentração de álcali maior que a usual (10% KOH), o que pode levar a perdas e consequente subestimação do teor de carotenoides.<sup>14</sup> Além disso, a luteína extraída das flores de *Tagetes erecta* L. (família Asteraceae), fonte da luteína presente no corante, encontra-se predominantemente esterificada com ácidos graxos, o que corrobora a necessidade de uma etapa de saponificação dos extratos.<sup>15</sup> O aumento de etapas no procedimento de extração do corante eleva tanto o custo quanto o tempo de análise, inviabilizando a aplicação do método em estudos de estabilidade da luteína em iogurte. A introdução de novas etapas também implica em provável aumento do desvio padrão relativo, o que é indesejável quando se trata da avaliação de mudanças de concentração de um composto durante o período de armazenamento.

O objetivo do presente estudo foi desenvolver e validar um método simples, de baixo custo e reprodutível para extração e quantificação por espectrofotometria UV-visível de carotenoides em iogurte adicionado de corante natural à base de luteína.

### PARTE EXPERIMENTAL

#### Materiais e equipamentos

O leite em pó desnatado Molico® (Nestlé – Araçatuba, Brasil)

\*e-mail: azm@fea.unicamp.br

foi adquirido em um supermercado na cidade de Campinas (Brasil), sendo todo do mesmo lote. A cultura láctea liofilizada, constituída de *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus bulgaricus* (YO-MIX 505 LYO 200<sup>®</sup>), foi fornecida pela Danisco (Cotia, Brasil). O corante natural à base de luteína Vegex Lutein WS<sup>®</sup> foi adquirido da Christian Hansen (Horsholm, Dinamarca). Esta formulação contém 0,3% de luteína, possui características hidrofílicas e é utilizada para fins alimentícios. A protease bacteriana Protex 6L<sup>®</sup> (Genencor Int., Rochester, EUA) foi cedida pela Danisco (Tonder, Dinamarca). Os solventes acetona, acetato de etila, etanol, éter etílico, éter de petróleo, metanol e tetraidrofurano, todos de grau analítico, foram adquiridos da Synth (Diadema, Brasil), assim como o sulfato de sódio anidro e hidróxido de potássio (KOH). Os solventes acetonitrila, metanol e acetato de etila, todos grau CLAE, foram adquiridos da J. T. Baker (Phillipsburg, EUA). O padrão de luteína com pureza de 99% foi doado pela DSM Nutritional Products (Basel, Suíça). Previamente à análise por CLAE, os extratos e solventes foram filtrados em membrana de polietileno de 0,22 e 0,45 µm, respectivamente, da Millipore (Billerica, EUA).

A fermentação dos iogurtes foi realizada em estufa Marconi modelo MA 415/S (Piracicaba, Brasil). Para extração dos carotenoides foram utilizados mesa agitadora orbital Marconi modelo MA140/T (Piracicaba, Brasil), homogeneizador de bancada Marconi modelo MA102 (Piracicaba, Brasil), agitador de soluções tipo vortex Phoenix Luferco, modelo AP56 (Araraquara, Brasil), centrífuga Beckman Coulter, modelo Allegra<sup>®</sup> 64R (Brea, EUA) e evaporador rotatório Buchi (Flawil, Suíça). A quantificação foi realizada em espectrofotômetro com arranjo de diodos Agilent, modelo 8453 (Palo Alto, EUA).

A análise dos carotenoides do corante à base de luteína adicionado ao iogurte foi realizada por CLAE, utilizando um equipamento modelo 600E da Waters (Milford, EUA) equipado com detector de arranjo de diodos (DAD) Waters modelo 996, sistema desgaseificador, sistema de injeção *Rheodyne* com alça de amostra de 20 µL (Rohnert Park, EUA) e sistema de aquisição e processamento de dados Millennium.

## Métodos

### Análise por CLAE de carotenoides do corante à base de luteína

O corante (0,05 g) foi dissolvido em 1 mL de água destilada e os carotenoides foram exaustivamente extraídos em vortex, utilizando éter etílico (2 mL), seguido de acetato de etila (4 mL). Após cada extração, o extrato foi centrifugado para separação de fases e a fase orgânica foi coletada, seca sob fluxo de nitrogênio, redissolvida em acetato de etila/acetonitrila (1:1, v/v<sup>-1</sup>) e analisada por CLAE. O extrato remanescente foi seco, redissolvido em éter de petróleo e saponificado com igual volume de solução metanólica 10% de KOH.<sup>16</sup> Após retirada do álcali, o extrato saponificado foi seco e analisado nas mesmas condições utilizadas para o extrato bruto (não saponificado).

Os carotenoides dos extratos bruto e saponificado foram separados em coluna C<sub>18</sub> NovaPak de 300 x 3,9 mm (tamanho de partícula 4 µm), usando como fase móvel acetonitrila/metanol (9:1, v/v<sup>-1</sup>) e acetato de etila, com gradiente linear de acetato de etila de 0 a 100% em 30 min. O fluxo empregado foi de 1 mL min<sup>-1</sup> e a temperatura da coluna foi mantida a 29 °C. Os espectros de absorção UV-visível foram adquiridos entre 200 e 600 nm e os cromatogramas foram processados a 450 nm.<sup>17</sup> Os picos foram identificados com base na ordem de eluição em coluna C<sub>18</sub> e nas seguintes características do espectro UV-visível: λ<sub>max</sub>, estrutura fina espectral calculada como percentagem das alturas (III/II)% e intensidade do pico *cis* calculada como (A<sub>B</sub>/A<sub>II</sub>)%, assinaladas na Figura 1,<sup>16</sup> comparando com informações disponíveis na literatura.<sup>15,17-19</sup>

### Produção dos iogurtes

O leite em pó desnatado foi reconstituído a 10% de sólidos

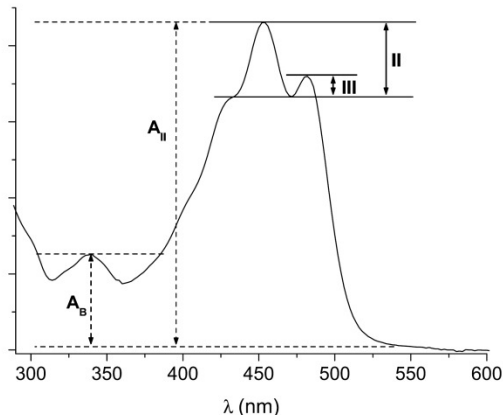


Figura 1. Parâmetros utilizados para cálculo da estrutura fina e intensidade do pico *cis* do espectro UV-visível de carotenoide

totais e adicionado de 2,5% da cultura previamente ativada. Em seguida, a formulação de luteína foi adicionada nas concentrações posteriormente descritas nos ensaios dos parâmetros de validação. O leite foi distribuído em copos plásticos, selados por termo indução, e incubados em estufa a 45 °C, onde permaneceram até atingir pH 4,8 (aproximadamente durante 3 h). Os copos foram então resfriados em banho de gelo e armazenados a 5 °C para as análises posteriores. Um iogurte controle, sem adição do corante à base de luteína, também foi produzido e armazenado utilizando o mesmo procedimento de fabricação e as mesmas condições previamente descritas.

### Extração dos carotenoides

Para extração dos carotenoides totais, os solventes testados foram acetona, acetato de etila e tetraidrofurano, combinados aos seguintes equipamentos para extração: mesa agitadora, homogeneizador, agitador tipo vortex e almofariz. As combinações de solvente e equipamento de extração foram realizadas de acordo com métodos já existentes na literatura para determinação de carotenoides em leite e produtos lácteos.<sup>9-11,20</sup> A necessidade do emprego de uma etapa de saponificação dos extratos, com 10% de KOH em solução metanólica, também foi verificada.<sup>9,10,20</sup>

Após cada extração, o solvente foi completamente evaporado e o extrato seco foi redissolvido em etanol para a quantificação dos carotenoides totais.

### Quantificação dos carotenoides totais

A determinação dos carotenoides totais foi realizada por espectrofotometria no UV-visível, pela leitura da absorbância do extrato etanólico de carotenoides no comprimento de onda de 445 nm, λ<sub>max</sub> de absorção da luteína em etanol. A concentração de carotenoides totais foi calculada a partir da Lei de Lambert-Beer:

$$C (\mu\text{g mL}^{-1}) = \frac{A \times 10^4}{E_{1\text{cm}}^{1\%}} \quad (1)$$

onde C é a concentração de carotenoides totais (expressa como luteína), A é a absorbância do extrato a 445 nm e E<sub>1cm</sub><sup>1%</sup> é o coeficiente de absorvidade da luteína em etanol, que corresponde a 2550.<sup>18</sup>

A determinação de carotenoides totais também foi realizada no iogurte controle para verificar se a concentração de carotenoides presente neste iogurte interfere na quantificação de carotenoides totais no iogurte adicionado de corante luteína.

#### Validação do método de extração

Após o teste das diferentes combinações entre solventes e equipamentos para extração dos carotenoides, o método que apresentou os melhores resultados foi validado através dos parâmetros de seletividade, linearidade, faixa de aplicação, limites de detecção e de quantificação, precisão e exatidão.<sup>13,21</sup>

A seletividade do método foi avaliada através da comparação de três espectros de absorção no UV-visível: do padrão de luteína, de um extrato obtido a partir de um iogurte adicionado de corante à base de luteína e de um extrato preparado a partir do iogurte controle. A concentração do padrão de luteína utilizada foi  $2,47 \mu\text{g mL}^{-1}$  e a do extrato de iogurte adicionado de luteína de  $1,22 \mu\text{g de luteína mL}^{-1}$  (que equivale à concentração aproximada de  $11,20 \mu\text{g de luteína g}^{-1}$  de iogurte, quando extraída de 1 g do produto e diluída em 10 mL de etanol, que são condições fixadas pelo método).

A linearidade do método e a faixa de trabalho foram verificadas através de uma curva analítica construída com extratos de carotenoides obtidos a partir de iogurtes adicionados de diferentes concentrações do corante à base de luteína, na faixa de 1,41 a  $13,42 \mu\text{g de luteína g}^{-1}$  de iogurte. A faixa de concentração dos testes foi definida a fim de contemplar um maior número de concentrações inferiores à concentração média de luteína no iogurte (aproximadamente  $11,20 \mu\text{g g}^{-1}$ ), uma vez que o objetivo do método é acompanhar os teores de luteína durante o armazenamento do iogurte e a tendência é que a concentração diminua com o decorrer do tempo.

Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram determinados a partir dos parâmetros da curva analítica construída para o ensaio de linearidade, e foram expressos em  $\mu\text{g g}^{-1}$ .<sup>13</sup>

A precisão foi determinada através da concordância dos resultados no mesmo laboratório, de um mesmo analista, em dias diferentes. Foram realizadas três extrações em 3 dias diferentes a partir de uma mesma amostra de iogurte adicionado do corante à base de luteína na concentração de  $11,49 \mu\text{g de luteína g}^{-1}$  de iogurte, que corresponde à concentração média inicial de luteína adicionada ao iogurte. A precisão foi expressa como desvio padrão relativo (DPR).<sup>13</sup>

A exatidão foi verificada por ensaios de recuperação em iogurtes adicionados de diferentes concentrações conhecidas de corante à base de luteína. Foram utilizados três níveis de adição ( $5,53$ ;  $11,49$  e  $13,45 \mu\text{g de luteína g}^{-1}$  de iogurte), sendo as extrações realizadas em triplicata em cada nível de adição. Essas concentrações foram utilizadas porque correspondem aproximadamente a 50, 100 e 125% da concentração média de luteína nos iogurtes.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Perfil de carotenoides do corante à base de luteína por CLAE-DAD

O cromatograma dos carotenoides do extrato não saponificado do corante demonstrou a presença de pelo menos oito ésteres de luteína (Figura 2a), enquanto no extrato saponificado (Figura 2b) foi encontrado apenas o pico da luteína. Este resultado já era esperado, pois a presença de mais de 90% da luteína na forma esterificada em flores de *Tagetes erecta* L. foi previamente relatada.<sup>15,17</sup> Os ésteres presentes no corante à base de luteína foram classificados em mono e di-ésteres (Figura 2a), por comparação dos tempos de retenção com dados da literatura.<sup>15,17</sup> Como não há padrões de ésteres de luteína disponíveis comercialmente, o fato de toda a luteína presente no corante estar esterificada confirma a necessidade de uma etapa de saponificação dos extratos para a quantificação por CLAE e justifica a escolha de um método espectrofotométrico para emprego na quantificação de luteína adicionada em iogurte.

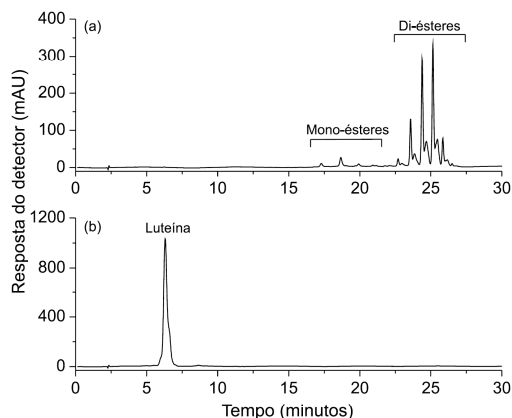


Figura 2. Cromatograma, obtido por CLAE-DAD, do extrato não saponificado (a) e do extrato saponificado (b) de carotenoides do corante à base de luteína. As condições cromatográficas estão descritas no texto

### Desenvolvimento do método analítico

A escolha do melhor solvente para extração depende da composição da matriz e de sua composição de carotenoides. Para extração de carotenoides de matrizes com alto teor de umidade, como o iogurte, é mais apropriado o emprego de solventes com polaridade intermediária e, por isso, foram escolhidos acetato de etila, acetona e tetraidrofurano.

#### Acetato de etila

A primeira escolha de solvente foi o acetato de etila, já utilizado anteriormente na extração de luteína adicionada em iogurte desnatado.<sup>10</sup> Este solvente foi inicialmente testado utilizando uma mesa agitadora como equipamento para extração, seguida de centrifugação para separação de fases. Entretanto, este procedimento não possibilitou a extração completa dos carotenoides, fato verificado visualmente, já que ao término da extração, a amostra ainda mantinha a coloração amarelada.

Um homogeneizador foi então empregado, visando um maior contato entre a amostra e o solvente. Como ocorrido no ensaio em mesa agitadora, a extração com homogeneizador não foi completa.

Como a formulação de luteína adicionada ao iogurte é hidrossolúvel e o iogurte apresenta um elevado teor de umidade, é possível que o fato de o acetato de etila ser um solvente imiscível com água tenha resultado na extração incompleta. Conseqüentemente, optou-se pelo emprego de solventes miscíveis com a água, como acetona e tetraidrofurano.

#### Acetona

Este solvente já foi utilizado em outro estudo para extração de carotenoides em queijo<sup>9</sup> e também tem sido amplamente empregado na extração de outras matrizes, como frutas e vegetais.<sup>16,22,23</sup> Para os testes com acetona, o uso de mesa agitadora foi descartado. Foram realizadas extrações em homogeneizador e almofariz, ambas resultando em valores de recuperação de carotenoides totais inferiores a 80%. Em seguida, foi testado o vortex, escolhido pela praticidade do uso e para tentar minimizar perdas de material. Entretanto, a combinação acetona e vortex também gerou resultados insatisfatórios, pois produziu um extrato turvo, provavelmente pela presença de proteínas que devem ter sido extraídas juntamente com os carotenoides.



### Tetraidrofurano

As proteínas são capazes de formar complexos com os carotenoides e o único solvente capaz de romper este complexo é o tetraidrofurano.<sup>24</sup> Este solvente já foi empregado para extração de carotenoides de leite e produtos lácteos.<sup>11</sup> Devido à praticidade do uso do vortex, os testes com tetraidrofurano foram realizados neste equipamento.

Os extratos obtidos com tetraidrofurano apresentaram índices de recuperação de carotenoides maiores que 90%, razão pela qual foram utilizados para se verificar a necessidade da etapa de saponificação. Os extratos foram transferidos para uma mistura de éter etílico e éter de petróleo (2:1, vv<sup>-1</sup>) em funil de separação, e lavados com cerca de 5 L de água destilada. Foi adicionada uma solução metanólica 10% de KOH, na proporção 1:1 (vv<sup>-1</sup>) aos extratos etéreos, e estes foram mantidos sob agitação, por 16 h a 84 rpm à temperatura ambiente, em mesa agitadora. Após a saponificação, o extrato foi novamente particionado para éter etílico e éter de petróleo (2:1, vv<sup>-1</sup>) e lavado com água destilada até todo o álcali ser removido (pH da água de lavagem próximo de 7). A etapa de saponificação foi responsável por perdas de carotenoides que variaram de 22 a 41% e estes resultados corroboram dados existentes na literatura, que relatam perdas consideráveis de carotenoides devido a esta reação.<sup>14,24,25</sup> No presente trabalho, o extrato obtido com tetraidrofurano apresentou-se límpido no solvente utilizado para quantificação (etanol). Consequentemente, não há necessidade da inclusão de uma etapa de saponificação no procedimento de extração.

O método que permitiu uma completa extração dos carotenoides da amostra de iogurte está apresentado na Figura 3. Em função do iogurte possuir elevado teor de proteína (cerca de 38%, base seca), o tetraidrofurano mostrou-se um solvente adequado para extração de carotenoides nesta matriz, por ser capaz de desnaturar complexos de

proteínas com carotenoides, facilitando a liberação dos pigmentos e evitando a formação de emulsão durante a extração.<sup>24</sup> A agitação em vortex proporcionou maior recuperação dos carotenoides, por permitir que o solvente fosse separado do resíduo sólido por centrifugação no mesmo tubo onde a amostra foi extraída, diminuindo a possibilidade de perda de amostra.

Quando o objetivo da análise é a quantificação, é necessária uma extração completa e exaustiva da matriz. No método proposto, a remoção completa dos carotenoides foi alcançada após cinco extrações, já que a partir da sexta extração os extratos não apresentaram banda de absorção no comprimento de onda de 445 nm.

É sabido que o extrato de carotenoides obtido por solventes miscíveis com a água, como é o caso do tetraidrofurano, contém elevados teores de água, além de compostos hidrossolúveis presentes na matriz.<sup>1</sup> Com o intuito de remover a água, compostos polares e o solvente foi realizada a partição do extrato para uma mistura de éter etílico e éter de petróleo, na proporção 2:1 (vv<sup>-1</sup>), seguida de lavagem com água destilada. Esta proporção foi utilizada devido à presença majoritária da luteína no extrato obtido a partir do iogurte, pois como este carotenoide possui dois grupos hidroxila em sua estrutura (Figura 4), é preferencialmente solúvel em éter etílico do que em éter de petróleo. Posteriormente à etapa de partição, foi adicionado sulfato de sódio anidro para retirada de resíduos da água de lavagem. Em seguida, o éter foi totalmente evaporado em evaporador rotatório, com temperatura do banho inferior a 38 °C, uma vez que os carotenoides são suscetíveis à isomerização em temperaturas elevadas.<sup>26</sup> O extrato seco foi redissolvido em etanol e, imediatamente, procedeu-se à leitura da absorbância para quantificação dos carotenoides totais, seguindo o procedimento descrito anteriormente.

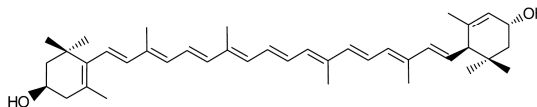


Figura 4. Estrutura química da luteína

### Validação do método

O teor de carotenoides totais do iogurte controle foi inferior ao limite de quantificação do método desenvolvido (1,28 µg g<sup>-1</sup>), comprovando que não houve interferência dos carotenoides provenientes do leite desnatado na quantificação dos carotenoides totais do iogurte adicionado de corante luteína.

A seletividade de um método consiste na capacidade de medir um composto na presença de outros componentes ou substâncias interferentes.<sup>21</sup> Os carotenoides possuem espectro de absorção no UV-visível bastante característico, apresentando geralmente três bandas, cuja posição é uma função do número de ligações duplas conjugadas na molécula.<sup>18</sup> A Figura 5 apresenta os espectros de absorção da solução de padrão de luteína e dos extratos obtidos a partir dos iogurtes adicionados ou não de corante à base de luteína. Foi possível observar que o espectro do extrato do iogurte adicionado de corante apresenta a mesma forma do espectro do padrão de luteína, ambos mostrando comprimentos de onda de absorção máxima a 421, 445 e 473 nm em etanol. Além disso, o espectro de absorção do extrato do iogurte controle não interferiu nem se sobrepôs ao espectro do extrato do iogurte adicionado de corante na região espectral próxima a 445 nm, atestando a seletividade do método de extração. Caso o iogurte seja totalmente adulterado com outro corante de menor custo, como o carotenoide bixina, o método desenvolvido é capaz de detectar esta fraude facilmente, uma vez que a bixina apresenta características espectrais na região do UV-visível (comprimentos de

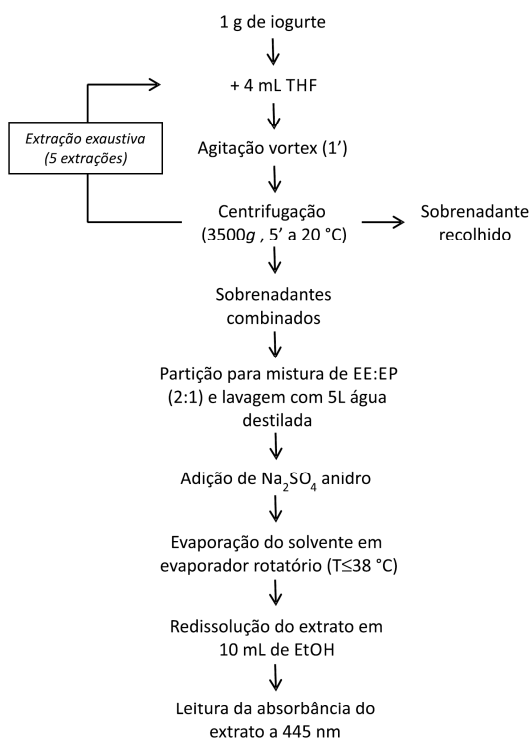
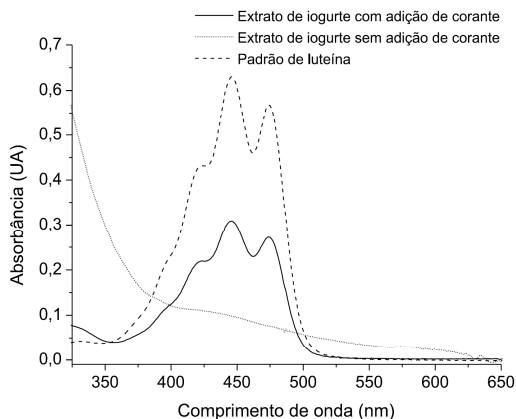


Figura 3. Fluxograma para extração e quantificação de carotenoides totais em iogurte

onda de absorção máxima de 429, 457 e 484 nm) diferentes das da luteína. Porém, se a adulteração for parcial, seria necessário utilizar um método de espectrofotometria de derivadas para quantificação como, por exemplo, o desenvolvido para corantes artificiais,<sup>27</sup> pois estes dois carotenoides são extraídos juntos e a presença de bixina pode levar à superestimação do teor de luteína no iogurte.



**Figura 5.** Espectro de absorção no UV-visível do padrão de luteína ( $2,47 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), do extrato obtido a partir do iogurte adicionado de corante à base de luteína e do extrato obtido do iogurte controle

A faixa de linearidade do método foi de  $1,41$  a  $13,42 \mu\text{g g}^{-1}$ , e os parâmetros da curva analítica são apresentados na Tabela 1. Estes parâmetros foram utilizados para a determinação do LD e LQ, que foram de  $0,42$  e  $1,28 \mu\text{g g}^{-1}$ , respectivamente, indicando boa sensibilidade. Dados da literatura apontam um LD inferior ( $0,014 \mu\text{g g}^{-1}$ ) ao encontrado no presente trabalho,<sup>28</sup> quando realizada a quantificação de luteína em leite e fórmulas pediátricas por CLAE-DAD, provavelmente por se tratar de um método analítico mais sensível que a quantificação por espectrofotometria. Usualmente, a faixa de linearidade de um método, assim como seus LD e LQ, é determinada através de uma curva analítica obtida pela diluição do padrão do composto que se deseja quantificar em solvente. Entretanto, como a matriz estudada pode exercer efeito na quantificação do composto de interesse, é necessário verificar se a faixa de trabalho e os limites estimados pela curva analítica em solvente são coerentes e correspondem aos resultados práticos. No presente trabalho, uma curva analítica foi construída a partir de soluções etanólicas do corante luteína, na faixa de  $0,10$ - $1,25 \mu\text{g mL}^{-1}$ , correspondente à faixa de concentração dos extratos do iogurte adicionado do corante luteína. Os LD e LQ estimados matematicamente pela curva de diluição do corante foram extremamente baixos,  $3,62 \times 10^{-16}$  e  $1,10 \times 10^{-15} \mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente, sendo experimentalmente impraticáveis para iogurte, utilizando o método proposto. Por conseguinte, foi empregado o método de superposição de matriz para determinação da faixa de aplicação e limites, construindo-se a curva analítica com extratos obtidos a partir de amostras de iogurte adicionadas de diferentes concentrações de corante luteína. Este método de superposição é utilizado para compensar o efeito da matriz ou possíveis interferentes e fornece uma melhor correspondência com a composição da amostra. Além disso, é desejável que a faixa de aplicação e os limites estejam na mesma unidade dos resultados obtidos pelo método, no caso  $\mu\text{g g}^{-1}$ .<sup>13</sup>

O valor do DPR, que expressa a repetibilidade do método, foi igual a 3,4%. Os métodos para análise de compostos presentes em níveis de concentração de  $\mu\text{g g}^{-1}$  devem apresentar DPR inferior a

**Tabela 1.** Resultados da linearidade do método

Parâmetros	Resultados
Faixa de linearidade	$1,41 - 13,42 \mu\text{g g}^{-1}$
Equação: $y = ax + b$	$y = 0,0274x - 0,0035$
Coefficiente angular $\pm$ D.P. <sup>a</sup>	$0,0274 \pm 0,0030$
Coefficiente linear $\pm$ D.P. <sup>a</sup>	$-0,0035 \pm 0,0144$
Coefficiente de determinação	0,9938

<sup>a</sup>Resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão de três repetições.

16%.<sup>29</sup> Desta forma, o método desenvolvido no presente estudo apresentou um excelente DPR, provavelmente devido ao baixo número de etapas e simplicidade. A exatidão do procedimento analítico foi avaliada por testes de recuperação em três níveis de adição, e variou de 95 a 103% (Tabela 2). Considerando que os valores de recuperação em todos os níveis testados foram próximos a 100%, o método foi considerado exato.

**Tabela 2.** Recuperação de luteína nas amostras de iogurte adicionadas de corante à base de luteína

Concentração adicionada ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	Concentração encontrada ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) <sup>1</sup>	Recuperação <sup>2</sup> (%)
5,53	$5,46 \pm 0,31$	99
11,49	$10,96 \pm 0,14$	95
13,45	$13,91 \pm 0,05$	103

<sup>1</sup>Resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão de três repetições. <sup>2</sup>Calculada a partir da média da concentração de três repetições.

## CONCLUSÃO

O método proposto para extração e quantificação por espectrofotometria no UV-visível de carotenoides em iogurte adicionado de corante à base de luteína demonstrou seletividade, linearidade na faixa estudada, sensibilidade, precisão e exatidão adequadas. Este novo método se apresenta como uma alternativa mais rápida, de fácil execução e de baixo custo para quantificação de corante à base de luteína adicionado em iogurte.

## REFERÊNCIAS

- Mercadante, A. Z. Em *Food Colorants: Chemical and Functional Properties*; Socaciu, C., ed.; CRC Press: New York, 2008, chap. 6.2.
- Krinsky, N. I.; *J. Nutr.* **2002**, *132*, 540S.
- Loane, E.; Kelliher, C.; Beatty, S.; Nolan, J. M.; *Br. J. Ophthalmol.* **2008**, *92*, 1163.
- Mares-Perlman, J. A.; Fischer, A. I.; Klein, R.; Palta, M.; Block, G.; Millen, A. E.; Wright, J. D.; *Am. J. Epidemiol.* **2001**, *153*, 424.
- Bhosale, P.; Serban, B.; Bernstein, P. S.; *Arch. Biochem. Biophys.* **2009**, *483*, 175.
- Loane, E.; Nolan, J. M.; O'Donovan, O.; Bhosale, P.; Bernstein, P. S.; Beatty, S.; *Surv. Ophthalmol.* **2008**, *53*, 68.
- Heyes, K. C.; Pronczuk, A.; Perlman, D.; *Am. J. Clin. Nutr.* **2001**, *74*, 211.
- [http://www.acnielsen.com.br/press/documents/OsProdutosMaisQuentesDoMundo\\_HB\\_jun\\_04.pdf](http://www.acnielsen.com.br/press/documents/OsProdutosMaisQuentesDoMundo_HB_jun_04.pdf), acessada em Dezembro 2011.
- Jones, S. T.; Aryana, K. J.; Losso, J. N.; *J. Dairy Sci.* **2005**, *88*, 1661.
- Aryana, K. J.; Barnes, H. T.; Emmick, T. K.; McGrew, P.; Moser, B.; *J. Food Sci.* **2006**, *71*, 467.
- Hulshof, P. J. M.; van Roekel-Jansen, T.; van de Bovenkamp, P.; West, C. E.; *J. Food Comp. Anal.* **2006**, *19*, 67.

12. Biehler, E.; Mayer, F.; Hoffmann, L.; Krause, E.; Bohn, T.; *J. Food Sci.* **2010**, *75*, 55.
13. Ribani, M.; Bottoli, C. B. G.; Collins, C. H.; Jardim, I. C. S. F.; Melo, L. F. C.; *Quim. Nova* **2004**, *27*, 771.
14. Kimura, M.; Rodríguez-Amaya, D. B.; Godoy, H. T.; *Food Chem.* **1990**, *35*, 187.
15. Rivas, J. D. L.; *J. Chromatogr.* **1989**, *464*, 442.
16. De Rosso, V.; Mercadante, A. Z.; *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 5062.
17. Piccaglia, R.; Marotti, M.; Grandi, S.; *Ind. Crop Prod.* **1998**, *8*, 45.
18. Davies, B. H. Em *Chemistry and biochemistry of plant pigments*; Goodwin, T. W., ed.; Academic Press: London, 1976, chap. 19.
19. Gau, W.; Ploschke, H.J.; Wünsche, C.; *J. Chromatogr.* **1983**, *262*, 277.
20. Nozière, P.; Grolier, P.; Durand, D.; Ferlay, A.; Pradel, P.; Martin, B.; *J. Dairy Sci.* **2006**, *89*, 2634.
21. International Conference on Harmonization (ICH); *Validation of Analytical Procedures: Methodology*, Q2B (CPMP/ICH/281/95), 1995.
22. Barreto, G. P. M.; Fabi, J. P.; De Rosso, V. V.; Cordenunsi, B. R.; Lajolo, F. M.; Nascimento, J. R. O.; Mercadante, A. Z.; *J. Food Comp. Anal.* **2011**, *24*, 620.
23. Faria, A. F.; Hasegawa, P. N.; Chagas, E. A.; Pio, R.; Purgatto, E.; Mercadante, A. Z.; *J. Food Comp. Anal.* **2009**, *22*, 196.
24. Khachik, F.; Beecher, G. R.; Whitaker, N. F.; *J. Agric. Food Chem.* **1986**, *34*, 603.
25. Wondracek, D. C.; Vieira, R. F.; Silva, D. B.; Costa, T. S. A.; Sano, S. M.; Faleiro, F. G.; *Quim. Nova* **2012**, *35*, 180.
26. Rodríguez-Amaya, D.; *A guide to carotenoid analysis in food*, ILSI Press: Washington, 2001.
27. Vidotti, E. C.; Rollemberg, M. C. E.; *Quim. Nova* **2006**, *29*, 230.
28. Gill, B. D.; Indyk, H. E.; *Int. Dairy J.* **2008**, *18*, 894.
29. Horwitz, W.; *Anal. Chem.* **1982**, *54*, 67.



## CAPÍTULO III

### **Estabilidade Oxidativa de Iogurte Adicionado de Corante Luteína**

Lígia D. Domingos, Ana. A. O. Xavier, Adriana Z. Mercadante, Ademir J.

Petenate, Renato A. Jorge, Walkíria. H. Viotto

Este Capítulo refere-se a um trabalho em conjunto, e por isso estão incluídas análises que não fazem parte do objetivo da tese (estabilidade e produtos de degradação da riboflavina, e análise sensorial). Estas análises foram realizadas pela autora Lígia D. Domingos, sob a supervisão da Profa. Dra. Walkíria H. Viotto, no Laboratório de Leite e Derivados do DTA-FEA-UNICAMP.

Artigo em preparação para ser submetido à revista *Journal of Dairy Science*



## SUMÁRIO INTERPRETATIVO

### **Estabilidade Oxidativa de Iogurte Adicionado de Corante Luteína**

Domingos, L. D.

O armazenamento de iogurtes em supermercados sob a incidência de luz favorece a foto-oxidação destes produtos devido à presença de riboflavina. Este composto é capaz de absorver luz desencadeando reações responsáveis pela formação de *off-flavors* e pela perda de nutrientes. A adição de luteína em iogurte pode prevenir o dano foto-oxidativo pelo fato deste pigmento atuar como filtro de luz e desativador de espécies reativas. Além disso, a complementação deste carotenoide na dieta humana vem sendo associado à diminuição e prevenção da degeneração macular relacionada à idade. O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência da adição de luteína na estabilidade oxidativa do iogurte.

## RESUMO

Este trabalho avaliou o efeito da adição de corante luteína na estabilidade oxidativa de iogurte durante 35 dias de armazenamento refrigerado, na presença e ausência de luz. Os iogurtes foram produzidos com o equivalente a 1,5 mg de luteína no produto final (120 g) e sem adição de luteína e foram caracterizados quanto ao teor de carotenoides totais e de riboflavina, e o comportamento da riboflavina e da luteína foi acompanhado durante o armazenamento. Houve diminuição do teor de riboflavina e o aparecimento de produtos de oxidação deste componente nos iogurtes sem adição de luteína e expostos à luz durante o armazenamento. Por outro lado, os iogurtes adicionados de luteína apresentaram teores de riboflavina e de luteína constantes durante todo o período de armazenamento, tanto para as amostras armazenadas sob luz quanto para aquelas mantidas no escuro. Os iogurtes produzidos com teores de luteína de 0,5 mg, 1,5 mg e 2,5 mg por porção de iogurte (120 g) foram avaliados quanto à aceitação sensorial, e a análise estatística não apontou diferenças entre as amostras para os atributos de aroma e sabor. Diante dos resultados é possível afirmar que a luteína manteve-se estável durante o armazenamento e que ofereceu proteção à riboflavina contra a foto-oxidação, preservando a qualidade do iogurte.

**Palavras-chave:** leite fermentado, carotenoides, riboflavina, foto-oxidação.

## 1. INTRODUÇÃO

Os carotenoides são pigmentos naturais conhecidos por suas funções biológicas e propriedades corantes. São sintetizados por plantas superiores, algas e bactérias e sua presença em animais é atribuída à ingestão de alimentos. A luteína é o segundo carotenoide mais prevalente no corpo humano (Khachik et al., 1997) e se acumula principalmente na mácula, região central da retina humana, que é responsável pela acuidade visual e onde está concentrada grande parte dos fotorreceptores (Landrum et al., 1999). Fontes ricas em luteína incluem os vegetais verdes como o espinafre (40 µg/g) e a couve (50 µg/g), os vegetais amarelos como o milho (5 µg/g) e a gema de ovo (8 µg/g) (Rodriguez-Amaya et al., 2008; Perry et al., 2009).

Nos olhos, acredita-se que a luteína apresente duas grandes funções protetoras: (1) como filtro de luz azul e (2) como desativadora de espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio (RNS). A luz azul é a forma de luz visível de maior energia (comprimento de onda aproximado de 450 nm) e é conhecida por induzir o dano foto-oxidativo através da geração de ROS. A luteína possui pico de absorção máxima no comprimento de onda de 446 nm e, por isso, é capaz de absorver a luz azul, diminuindo a intensidade de luz que chega à retina e provavelmente reduzindo a formação de ROS e RNS (Krinsky, 1989; Beatty et al., 1999; Scheidegger et al., 1998). O consumo de luteína vem sendo associado à diminuição e prevenção da ocorrência de catarata e a Degeneração Macular Relacionada à Idade (DMRI) e, por isso, as pesquisas sobre as propriedades deste carotenoide vêm crescendo nas últimas décadas (Landrum et al., 1997;

Bhosale et al., 2009). A DMRI é a principal causa de cegueira irreversível em idosos e atinge cerca de 50 milhões de pessoas acima de 75 anos no mundo, sendo mais de 10 milhões nos Estados Unidos e mais de 190 mil no Reino Unido (Klein et al., 2004; Evans et al., 2004). A ingestão de 6 mg de luteína ao dia foi relacionada com a diminuição de mais de 43 % do risco de DMRI (Seddon et al., 1994). A luteína também pode ser um importante aliado na redução do estresse oxidativo e danos ao DNA, que contribuem para o desenvolvimento de células cancerígenas no organismo (Serpeloni et al., 2010, 2012).

A aplicação de luteína como ingrediente funcional em produtos lácteos é uma opção conveniente, visto que a população em geral busca cada vez mais alimentos que trazem benefícios à saúde. Entretanto, é importante que o carotenoide não se degrade durante o período de armazenamento e se apresente disponível no momento do consumo. Poucos estudos sobre a adição de luteína em produtos lácteos foram encontrados na literatura até o momento. Jones et al. (2005) avaliaram a adição de diferentes concentrações de luteína em queijo Cheddar e constataram que não houve degradação do carotenoide durante as 24 semanas de maturação do queijo. Já em iogurte adicionado de diferentes concentrações de luteína, houve diminuição de cerca de 10 % da concentração inicial do corante ao final do período de 5 semanas de estocagem refrigerada (Aryana et al., 2006).

Apesar das propriedades antioxidantes, a luteína é sensível à ação da luz devido à presença de ligações duplas conjugadas, uma vez que apresenta

degradação principalmente nos comprimentos de onda de 200 a 400 nm e em 463 nm, como observado em bebida modelo adicionada do carotenoide, envasada em embalagens transparentes (Kline et al., 2011).

Os produtos lácteos são suscetíveis à foto-oxidação devido à presença da riboflavina (RBF), vitamina B<sub>2</sub>, que é uma molécula sensibilizadora. A RBF é capaz de absorver a energia luminosa e passar do seu estado singlete fundamental para o estado triplete excitado, podendo seguir dois mecanismos de reação: reagir diretamente com uma molécula biológica, produzindo radicais livres e íons radicalares, ou transferir sua energia para moléculas de oxigênio formando o oxigênio singlete, que também pode vir a degradar moléculas biológicas. Estas moléculas biológicas podem ser proteínas, ácidos graxos e vitaminas lipossolúveis presentes no leite. Assim, essas reações podem acarretar perdas nutricionais e alterações sensoriais, que são um indicador de ocorrência de foto-oxidação em produtos lácteos (Borle et al., 2001).

A RBF caracteriza-se pela presença de ligações duplas conjugadas e bases nitrogenadas em estrutura de anel. Apresenta faixas de absorção máxima de luz a 225, 275, 370 e 450 nm (Drossler et al. 2003), sendo a última a faixa mais crítica na foto-oxidação de produtos lácteos, pois se encontra na região de luz visível emitida pela luz fluorescente presente em grande parte dos estabelecimentos comerciais. A distribuição das ROS formadas pela sensibilização da RBF depende da disponibilidade de oxigênio, da concentração de RBF e da presença de outras substâncias oxidantes ou desativadoras (Choe et al, 2005). A luteína pode atuar

como antioxidante na foto-oxidação, principalmente por processo físico, chamado de *quenching* físico. Neste mecanismo ocorre a transferência de energia do oxigênio singlete ou da RBF no seu estado triplete excitado para o carotenoide, resultando no carotenoide excitado mais o oxigênio ou o sensibilizador no estado fundamental. O carotenoide rapidamente dissipa esta energia voltando para seu estado fundamental, sendo capaz de desativar novamente outras espécies (Di Mascio et al., 1989).

A RBF é altamente fluorescente (com emissão máxima ao redor de 525 nm) assim como os produtos gerados por sua foto-degradação, o lumicromo e a lumiflavina, que apresentam emissão máxima na região de 444 a 479 nm e 516 a 522 nm, respectivamente (Fox & Thayer, 1998). Desta forma, uma das maneiras de avaliar a ocorrência de foto-oxidação em produtos lácteos é a determinação de riboflavina e de seus produtos de degradação utilizando a espectroscopia de fluorescência (Becker et al., 2003; Andersen et al., 2005; Wold et al., 2006; Zandomenighi et al., 2007).

Neste trabalho avaliou-se a influência da adição de luteína na estabilidade oxidativa do iogurte, na ausência e na presença de luz, através do monitoramento da luteína e da riboflavina. Ao final dos experimentos, foi realizado um teste de aceitação sensorial para verificar a influência de diferentes concentrações de luteína na preferência dos consumidores.



## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Material

O leite em pó desnatado Molico<sup>®</sup> (Nestlé, Araçatuba, Brasil) foi adquirido em supermercado da cidade de Campinas (Brasil), sendo todo do mesmo lote e em quantidade suficiente para o desenvolvimento da pesquisa. A cultura láctea mista liofilizada de *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus bulgaricus* (YO-MIX 505 LYO 200) foi fornecida pela Danisco (Cotia, Brasil). A formulação de luteína 0,3 % utilizada foi a Vegex Lutein WS<sup>®</sup> – corante natural de luteína para fins alimentícios, da Christian Hansen (Horsholm - Dinamarca). A água utilizada nos experimentos foi inicialmente bi-destilada e em seguida deionizada (Millipore, Bedford, MA, EUA). Os copos plásticos de polipropileno opaco utilizados para o envase dos iogurtes foram fornecidos pela Dixie Toga (Votorantim, Brasil).

### 2.2. Preparo dos iogurtes

Os iogurtes foram produzidos a partir de leite desnatado em pó, reconstituído a 10 % de sólidos totais e da cultura láctea mista liofilizada. Metade do volume de leite foi adicionado de corante luteína, antes da inoculação da cultura láctea. O corante luteína foi adicionado de modo que a concentração final no produto fosse equivalente a 1,5 mg de luteína/120 g de iogurte. O leite foi adicionado de cultura e distribuído em copos plásticos que foram selados por termo indução. A fermentação do leite, realizada em estufa (Marconi modelo MA 415/S, Piracicaba, Brasil) a 45 °C foi interrompida através de resfriamento dos

copos em banho de gelo quando o pH 4,8 foi atingido. Os copos de iogurte, adicionados ou não de luteína, foram igualmente distribuídos em estufas BOD (Marconi modelo MA 415, Piracicaba, Brasil) adaptadas com luz fluorescente ((lâmpada TL8<sup>®</sup> 15 W, OSRAM, Osasco, Brasil), onde foram armazenados durante 35 dias a 5 °C, na presença e ausência de luz (intensidade luminosa de 1.000 lux). As amostras armazenadas sob incidência de luz receberam radiação na parte superior, de forma semelhante às condições encontradas em supermercados. As amostras foram retiradas aleatoriamente nos dias de análise, e em seu lugar foram colocadas embalagens vazias com as mesmas características e igualmente seladas. O procedimento de preparação e as análises do iogurte foram repetidos novamente, resultando em duplicata de processamento.

### 2.3. Caracterização dos iogurtes

A determinação da composição do iogurte foi realizada após 2 dias de fabricação. As análises foram realizadas em triplicata, segundo os procedimentos descritos pela AOAC (2006). O pH foi determinado por método potenciométrico (Digimed modelo DM22, São Paulo, Brasil). A acidez dos iogurtes sem adição de luteína foi determinada por titulação com NaOH 0,01 M, enquanto a dos iogurtes adicionados de luteína foi determinada pela titulação com NaOH 0,01 M com auxílio de potenciômetro, sob agitação constante, até pH 8,0 - 8,25. Os resultados foram expressos em graus Dornic.

O extrato seco total foi determinado gravimetricamente em estufa com circulação forçada de ar a 100 °C durante 24 h. O teor de gordura foi determinado segundo o método de Mojonnier, descrito pela AOAC (2006), sendo realizadas três extrações com álcool etílico, éter etílico e éter de petróleo. A fase orgânica foi coletada em placas de vidro, que permaneceram sob aquecimento até total evaporação dos solventes, sendo posteriormente levadas à estufa a 105 °C durante 50 min. Os teores de nitrogênio e de proteína foram determinados pelo método de Kjeldahl (AOAC, 2006). A porcentagem de proteína total foi obtida pela multiplicação da porcentagem de nitrogênio por 6,38.

#### 2.4. Monitoramento da estabilidade oxidativa durante a estocagem refrigerada

As análises dos teores de luteína e RBF, e a verificação do aparecimento de produtos de oxidação da RBF foram realizadas nos dias 0, 7, 14, 21, 28 e 35 de estocagem refrigerada. As determinações de RBF foram realizadas em duplicata e o teor de luteína foi determinado em triplicata. Antes de cada análise, o iogurte foi homogeneizado no próprio copo.

##### *Teor de luteína*

A determinação de luteína em iogurte foi realizada segundo Xavier et al. (2012) e todas as análises foram realizadas em ambiente com iluminação reduzida. Para os iogurtes com adição de corante,  $1,0 \pm 0,1$  g de iogurte foi extraído 5 vezes com tetraidrofurano em vortex, seguido de centrifugação para

separação de fases. Os extratos foram combinados e transferidos para uma mistura de éter etílico e éter de petróleo (2:1, v/v) em funil de separação, seguido de lavagem com água destilada. O solvente foi completamente evaporado em evaporador rotatório ( $T \leq 38 \text{ }^\circ\text{C}$ ) e o extrato seco foi redissolvido em 10 mL de etanol. A absorbância do extrato a 445 nm foi medida em espectrofotômetro (UV-visível Agilent 8453, Santa Clara, EUA) e a concentração de luteína foi calculada de acordo com a lei de Lambert-Beer, utilizando o coeficiente de absorvidade igual a 2550, correspondente à luteína em etanol.

A determinação do teor de carotenoides totais dos iogurtes sem adição de corante (controle) foi realizada da mesma maneira, utilizando  $4,0 \pm 0,1 \text{ g}$  de amostra. A análise foi realizada para avaliar o teor de carotenoides totais do iogurte provenientes naturalmente do leite. O teor de carotenoides totais no iogurte foi inferior ao limite de detecção do método ( $< 0,05 \text{ } \mu\text{g/g}$ ). Desta forma, os resultados de carotenoides totais obtidos para os iogurtes adicionados de luteína foram expressos como  $\mu\text{g luteína/g iogurte}$ .

#### *Determinação de riboflavina*

A determinação de RBF em iogurte foi realizada por titulação espectrofluorimétrica da RBF com solução de *Riboflavin binding protein* (RBPO), baseado no método descrito por Zandomeneghi et al. (2007), otimizado e validado por Domingos (2010). A RBPO (forma apo, Sigma R8628) foi adquirida da *Sigma Chemical Company* (St. Louis, EUA). O espectrofotômetro Cary Eclipse<sup>®</sup> (Varian,

Palo Alto, EUA) foi equipado com um acessório capaz de regular a inclinação do ângulo de posicionamento da amostra para permitir medidas em *front-face* (Varian Accessory Solid Sample, Melbourne, Australia), a fim de minimizar a radiação que reflete e se espalha durante a incidência da luz na amostra. Após testes com diferentes ângulos, o melhor foi o de 27° em relação à luz incidente. As medidas foram realizadas em cubetas de quartzo (1 × 1 cm), utilizando 0,3 g de iogurte e 400 µL de água, para facilitar a homogeneização da amostra adicionada de solução de RBPO durante a titulação. As fendas de excitação e emissão foram iguais (10 nm), o tempo de integração foi de 0,5 s e o incremento no comprimento de onda do espectro de varredura foi de 1 nm. A emissão foi medida entre 480 nm e 700 nm, com excitação da amostra a 450 nm. Os experimentos de titulação da RBF foram efetuados pela adição de alíquotas de 10 a 15 µL de RBPO na amostra a fim de suprimir gradualmente a fluorescência. Após cada adição, a cubeta foi agitada vagarosamente em vortex durante 30 s e, em seguida, a emissão foi medida. Cerca de 15 a 20 adições foram necessárias em cada experimento. As titulações dos iogurtes durante o período de armazenamento foram realizadas em duplicata.

#### *Avaliação da degradação de RBF*

Para ilustrar a foto-degradação da RBF e o aparecimento de produtos de degradação nos iogurtes, medidas espectrofluorimétricas foram realizadas no espectrofotômetro Cary Eclipse<sup>®</sup> (Varian, Palo Alto, EUA). As condições utilizadas

foram as mesmas descritas para a determinação da riboflavina, com exceção da emissão, que foi medida entre 400 nm e 700 nm, com excitação a 380 nm.

## 2.5. Análise sensorial

Para o teste de aceitação sensorial foram produzidos iogurtes com teores de luteína equivalentes a 0,5; 1,5 e 2,5 mg por porção (120 g de produto) e adicionados de aroma de maracujá idêntico ao natural (Duas Rodas, Jaraguá do Sul, Brasil). Foram recrutados 100 provadores não treinados, entre alunos e funcionários da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), que foram selecionados em função do consumo de iogurte, disponibilidade e interesse em participar do teste. Os provadores assinaram um termo de livre consentimento previamente à participação nas análises, onde também foram informados que o iogurte continha luteína. Os testes foram realizados em cabines individuais, sob luz branca, no Laboratório de Análise Sensorial do Departamento de Tecnologia de Alimentos da UNICAMP (Parecer Comitê de Ética em Pesquisa n° 083/2009). As amostras foram codificadas com três dígitos e apresentadas de forma monádica e em ordem aleatória, em copos descartáveis brancos com um volume aproximado de 25 mL de iogurte, à temperatura de 10 °C. Entre a avaliação das amostras foram servidos água e biscoito água e sal. Os atributos de aparência, aroma, sabor e impressão global foram avaliados com a utilização de escala estruturada de nove pontos onde 1 correspondia a desgostei extremamente e 9 correspondia a gostei extremamente.

Para a intenção de compra foi utilizada uma escala estruturada de 5 pontos onde 1 correspondia a certamente compraria e 5 correspondia a certamente não compraria (Stone & Sidel, 1985).

## 2.6. Planejamento experimental e avaliação estatística dos resultados

Para avaliação dos teores de riboflavina durante o tempo de estocagem refrigerada foi adotado um delineamento do tipo *split-split-plot*. O fator estudado foi a adição de corante luteína no iogurte, sendo a condição de armazenamento uma sub-parcela do corante luteína, e o tempo de armazenamento uma sub-parcela a condição de armazenamento. Os ensaios foram realizados em 2 blocos. As diferenças entre os tratamentos das amostras e os tempos de estocagem e as interações obtidas nas avaliações de riboflavina e de luteína foram avaliadas por ANOVA. Os fatores e/ou interações que apresentaram valores de  $p \leq 0,05$  foram considerados significativamente diferentes. Os resultados obtidos no teste de aceitação foram analisados por Análise de Variância (ANOVA) e teste de Tukey (5 % de probabilidade). Para os resultados da intenção de compra foi plotado um histograma de barras.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1. Caracterização dos iogurtes

Apesar dos iogurtes demonstrarem diferença significativa ( $p < 0,05$ ) no pH e nos teores de acidez e gordura, ambos apresentaram a composição típica para iogurte desnatado (Tabela 1).

Tabela 1. Composição média dos iogurtes com e sem adição de luteína.

Composição	Sem luteína	Com luteína
pH	4,43 <sup>b</sup> ± 0,08	4,55 <sup>a</sup> ± 0,06
Acidez (% ácido láctico)	0,80 <sup>a</sup> ± 0,04	0,71 <sup>b</sup> ± 0,05
Proteína total (%)	3,60 <sup>a</sup> ± 0,23	3,60 <sup>a</sup> ± 0,27
EST (%)	9,40 <sup>a</sup> ± 0,15	9,46 <sup>a</sup> ± 0,07
Gordura (%)	0,06 <sup>b</sup> ± 0,05	0,10 <sup>a</sup> ± 0,01

Valores expressos como média ± desvio padrão de três repetições.

Médias acompanhadas por letras diferentes na mesma linha apresentam diferença significativa. EST = Extrato seco total.



### 3.2. Influência da luz na estabilidade do corante luteína adicionado ao iogurte

O teor de luteína permaneceu constante durante todo o tempo de armazenamento, nos iogurtes armazenados tanto na presença quanto na ausência de luz (Figura 2).

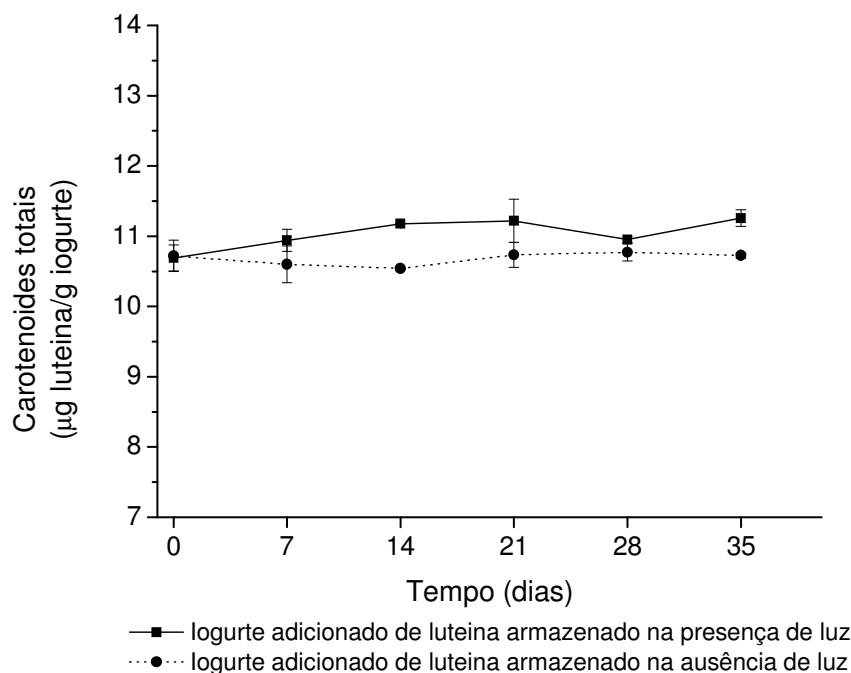


Figura 2. Comportamento da luteína nos iogurtes armazenados na ausência e presença de luz durante o armazenamento refrigerado.

Um comportamento similar foi observado por Jones et al. (2005) para luteína adicionada em queijo Cheddar, onde não foi detectada variação no teor deste carotenoide durante o armazenamento por 24 semanas a 4,5 °C. Em outro estudo, que avaliou a adição de luteína em iogurte desnatado, o carotenoide

apresentou redução de cerca de 10 % da sua concentração inicial, ao final de 5 semanas de armazenamento (Aryana et al., 2006). Segundo Mercadante (2008), a presença de macromoléculas pode conferir fotoproteção aos carotenoides em alimentos, tanto pela complexação destas macromoléculas com os carotenoides ou ainda atuando como filtro, reduzindo a incidência de luz e, conseqüentemente, a fotodegradação dos pigmentos.

### 3.2. Influência da luz na estabilidade da riboflavina

Na Tabela 2 está apresentada a avaliação estatística dos resultados (graus de liberdade, quadrados médios e probabilidades) do efeito da adição de luteína, da exposição à luz e do tempo de armazenamento nos teores de riboflavina dos iogurtes.

O tempo de armazenamento e a luz exerceram influência significativa sobre os teores de riboflavina. Além disso, as interações tempo de estocagem\*adição de luteína, tempo de estocagem\*presença de luz e adição de luteína\*presença de luz também foram significativas. Como a interação de duas variáveis exerceu influência sobre o parâmetro analisado, foi avaliado apenas o efeito das interações, e não das variáveis independentemente.

Tabela 2. Quadrados médios e probabilidades para o comportamento da riboflavina dos iogurtes durante o tempo de armazenamento.

<b>Riboflavina</b>			
<b>Fator</b>	<b>GL</b>	<b>SQM</b>	<b>P – valor</b>
<b>Luteína</b>	1	0,00802	0,0911
<b>Erro I</b>	1	0,00017	
<b>Luz</b>	1	0,01627	0,0017
<b>Luteína*luz</b>	1	0,01653	0,0017
<b>Erro II</b>	2	0,00003	
<b>Tempo</b>	5	0,00184	<0,0001
<b>Luteína*tempo</b>	5	0,00127	0,0004
<b>Luz*tempo</b>	5	0,00165	<0,0001
<b>Erro III</b>	25	0,00019	

GL = graus de liberdade; SQM = quadrado médio; p = probabilidade.

As amostras armazenadas na ausência de luz apresentaram teor de RBF praticamente constante durante o período de estocagem (aproximadamente 0,24

mg de RBF/100 g de iogurte). Por outro lado, os iogurtes expostos à luz sofreram uma queda de cerca de 30 % nos teores de RBF durante a estocagem, evidenciando a ocorrência de foto-oxidação da riboflavina, e que a foto-degradação aumenta com o decorrer do tempo de armazenamento (Figura 3).

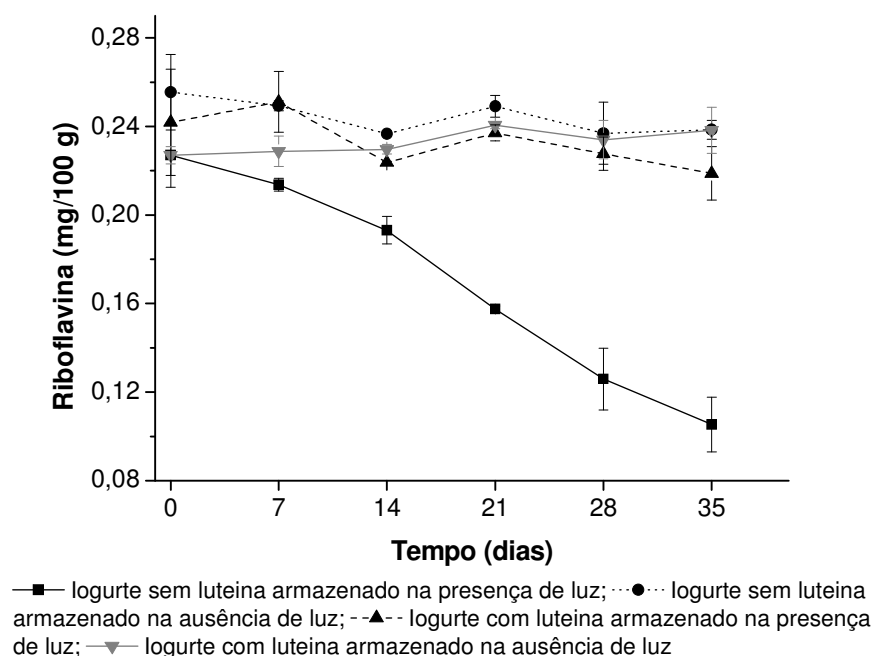


Figura 3. Teores de RBF em iogurtes adicionados ou não de corante luteína, armazenados na presença e ausência de luz durante 35 dias de armazenamento a 5 °C.

Os iogurtes adicionados de luteína não apresentaram variação no conteúdo de RBF, independentemente da presença ou ausência de luz (Figura 4), permanecendo entre 0,23 e 0,24 mg de RBF/100 g de iogurte, durante todo o

período de armazenamento. Os iogurtes sem adição de luteína apresentaram uma sensível redução no teor de RBF (aproximadamente 0,17 mg de RBF/100 g de iogurte) quando expostos à luz em comparação com aqueles armazenados no escuro (0,25 mg de RBF/100 g). Estes resultados sugerem que a luteína atuou evitando a foto-oxidação da RBF, provavelmente através do *quenching* físico de ROS e também como filtro de luz (Choe et al., 2005; Montenegro et al., 2007).

Quando a luteína estava presente nos iogurtes, o teor de RBF se manteve praticamente inalterado durante os 35 dias de estocagem refrigerada, que é o tempo aproximado de vida de prateleira de iogurtes comerciais.

### 3.3. Formação de produtos de degradação da riboflavina.

A Figura 4 ilustra que durante o período de armazenamento refrigerado sob incidência de luz, houve redução da fluorescência em comprimento de onda próximo a 525 nm, indicando degradação da RBF. Em contrapartida, foi observado um aumento da fluorescência na região de 414 a 490 nm com o decorrer do tempo de armazenamento, o que pode indicar a formação do lumicromo, um dos compostos fluorescentes resultantes da degradação da RBF, juntamente com a lumiflavina (Fox e Thayer, 1998). Wold *et al.* (2002, 2006) e Andersen *et al.* (2005) também verificaram o mesmo perfil de redução de fluorescência da RBF durante a avaliação de foto-oxidação em produtos lácteos.

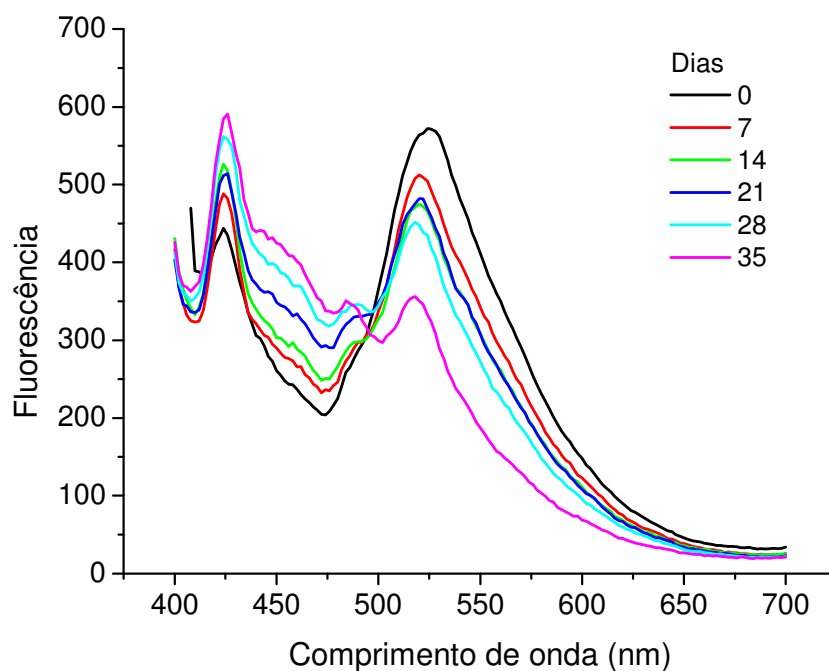


Figura 4. Espectro de fluorescência dos iogurtes sem adição de corante luteína, no decorrer de 35 dias de exposição à luz.

#### 3.4. Aceitação sensorial e intenção de compra

As amostras de iogurtes adicionadas de diferentes quantidades do corante luteína apresentaram boa aceitação sensorial, com médias que variaram entre 6 (gostei ligeiramente) e 7 (gostei moderadamente) para os atributos de aparência, aroma, sabor e impressão global. As amostras não apresentaram diferenças nos atributos aroma e sabor ( $p > 0,05$ ). Entretanto, a amostra adicionada de 2,5 mg de luteína apresentou menor média ( $p < 0,05$ ) para o atributo aparência, provavelmente por apresentar cor amarela mais intensa em relação às outras

amostras. É possível que tal fato também justifique a diferença apresentada pela mesma amostra no atributo impressão global (Tabela 3).

Tabela 3. Notas médias atribuídas pelos provadores aos iogurtes adicionados de diferentes concentrações de luteína para os atributos aparência, aroma, sabor e impressão global.

Atributos	Teor de luteína (mg/120g)		
	0,5	1,5	2,5
Aparência	6,55 <sup>a</sup>	6,43 <sup>a</sup>	5,34 <sup>b</sup>
Aroma	6,25 <sup>a</sup>	6,59 <sup>a</sup>	7,2 <sup>a</sup>
Sabor	6,44 <sup>a</sup>	6,42 <sup>a</sup>	6,34 <sup>a</sup>
Impressão Global	6,43 <sup>a</sup>	6,43 <sup>a</sup>	6,01 <sup>b</sup>

Médias acompanhadas por letras diferentes em uma mesma linha apresentam diferença significativa.

Em geral, todas as amostras apresentaram elevada intenção de compra, sendo que aproximadamente 50 % dos provadores afirmou que certamente

compraria ou provavelmente compraria os iogurtes adicionados com corante luteína (Figura 5).

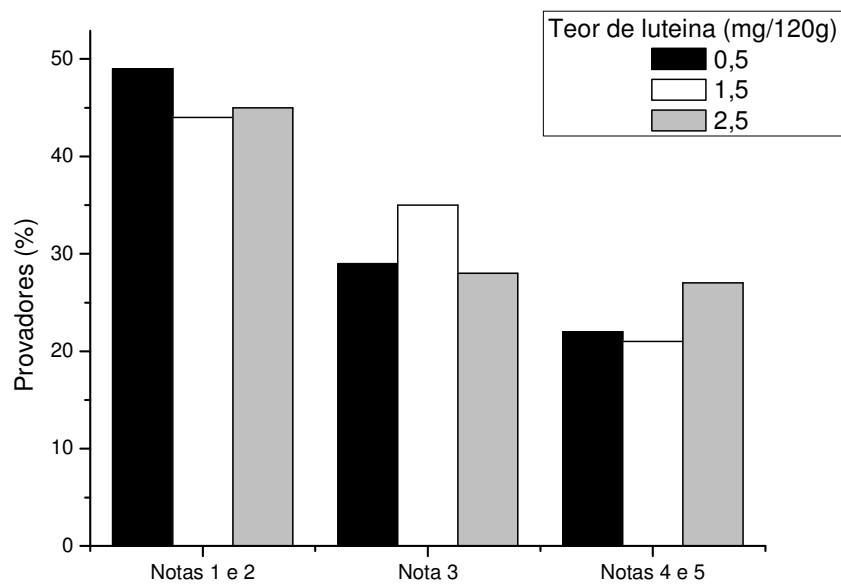


Figura 5. Histograma de frequência da intenção de compra dos iogurtes adicionados de diferentes concentrações de luteína, atribuídas pelos provadores. Nota 1 = certamente compraria. Nota 5 = certamente não compraria.

#### 4. CONCLUSÃO

A adição de luteína conferiu estabilidade oxidativa aos iogurtes. Mesmo sob exposição à luz, não houve mudanças nos níveis de RBF bem como não ocorreu a formação de compostos de degradação durante o armazenamento refrigerado do iogurte. Os teores de luteína permaneceram praticamente inalterados com o tempo de exposição à luz, o que significa que toda a luteína adicionada ao iogurte estará presente no produto durante todo o tempo de vida de prateleira. Além



disso, a boa aceitação sensorial e intenção de compra do iogurte com luteína indicam a viabilidade da produção em escala comercial do iogurte desenvolvido no presente trabalho.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à FAPESP, à CAPES e ao CNPq pelo auxílio financeiro.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Andersen, C. M., M. Vishart, and V. K. Holm. 2005. Application of fluorescence spectroscopy in the evaluation of light-induced oxidation in cheese. *J. Agric. Food Chem.* 53: 9985–9992.
- AOAC. Association of Official Methods Analytical Chemists. *Official Methods of Analytical Chemists of the Association Chemistry*, 2006.
- Aryana, K. J., H. T. Barnes, T. K. Emmick, P. Mcgrew, and B. Moser. 2006. Lutein is stable in strawberry yogurt and does not affect its characteristics. *J. Food Sci.* 71: S467 –S472.
- Beatty, S., M. Boulton, D. Henson, H-H. Koh, and I. J. Murray. 1999. Macular pigment and age related macular degeneration. *Br J Ophthalmol.* 83:867–877.

- Becker, E. M., J. Christensen, C. S. Frederiksen, and V. K. Haugaard. 2003. Front-face fluorescence spectroscopy and chemometrics in analysis of yogurt: Rapid analysis of riboflavin. *J. Dairy Sci.* 86: 2508–2515.
- Bhosale, P., B. Serban, and P. S. Bernstein. 2009. Retinal carotenoids can attenuate formation of A2E in the retinal pigment epithelium. *Arch Biochem. Biophys.* 483: 175-181.
- Borle F., R. Sieber, and J. O. Bosset. 2001. Photo-oxidation and photoprotection of foods, with particular reference to dairy products: An update, of a review article (1993-2000). *Sci. Aliment.* 21:571-590.
- Choe, E., R. Huang, and D. B. Min. 2005. Chemical reactions and stability of riboflavin in foods. *J. Food Sci.* 70:28–36.
- Di Mascio, P., S. Kaiser, and H. Sies. 1989. Lycopene as the most efficient biological carotenoids singlet oxygen quencher. *Arch. Biochem. Biophys.* 274:532-538.
- Domingos, L. D. 2010. Estabilidade e qualidade de iogurte adicionado de luteína e validação de método para determinação de riboflavina em iogurte. Dissertação de Mestrado em Tecnologia de Alimentos – Faculdade de Engenharia de Alimentos/ Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- Drossler, P., W. Holzer, A. Penzkofer, and P. Hegemann. 2003. Fluorescence quenching of riboflavin in aqueous solution by methionin and cystein. *Chem. Phys.* 286: 409-420.

- Evans, J. R., A. E. Fletcher, and R. P. L. Wormald. 2004. Age-related macular degeneration causing visual impairment in people 75 years or older in Britain: an add-on study to the Medical Research Council Trial of Assessment and Management of Older People in the Community. *Ophthalmology*. 111:513–517.
- Fox, J. B., and D. W. Thayer. 1998. Radical oxidation of riboflavin. *Int. J. Vit. Nutr. Res.* 68: 174-180.
- Jones, S. T., K. J. Aryana, and J. N. Losso. 2005. Storage and stability of lutein during ripening of cheddar cheese. *J. Dairy Sci.* 88: 1661–1670.
- Khachik, F., P.S. Bernstein, and D.L. Garland. 1997. Identification of lutein and zeaxanthin oxidation products in human and monkey retinas. *Invest. Ophth. Vis. Sci.* 38:1802-1811.
- Klein, R., T. Peto, A. Bird, M. R. Vannewkirk. 2004. The epidemiology of age-related macular degeneration. *Am. J. Ophthalmol.* 137:486–495.
- Kline, M. A., S. E. Duncan, L. M. Bianchi, W. N. Eigel, and S. F. O'Keefe. 2011. Light wavelength effects on a lutein-fortified model colloidal beverage. *J. Agric. Food Chem.* 59: 7203-7210.
- Krinsky, N. I. 1989. Antioxidant functions of carotenoids. *Free Radical Bio. Med.* 7:617-635.

- Landrum, J. T., R. A. Bone, H. Joa, M. D. Kilburn, L. L. Moore, and K. E. A. Sprague. 1997. One year study of the macular pigment: the effect of 140 days of a lutein supplement. *Exp. Eye Res.* 65: 57-62.
- Landrum, J. T., R. A. Bone, Y. Chen, C. Herrero, C. M. Llerena, and E. Twarowska. 1999. Carotenoids in human retina. *Pure Appl. Chem.* 71: 2237 – 2244.
- Mercadante, A. Z. 2008. Carotenoids in foods: sources and stability during processing and storage. In: *Food Colorants—Chemical and Functional Properties*. Vol X. C. Socaciu, ed. CRC Press, New York, USA.
- Montenegro, M. A., I. L. Nunes, A. Z. Mercadante, and C. D. Borsarelli. 2007. Photoprotection of vitamins in skimmed milk by an aqueous soluble lycopene-gum arabic microcapsule. *J. Agric. Food Chem.* 55: 323-329.
- Perry, A., H. Rasmussen, and E. J. Johnson. 2009. Xanthophyll (lutein, zeaxanthin) content in fruits, vegetables and corn and egg products. *J. Food Comp. Anal.* 22: 9-1.
- Rodriguez-Amaya, D. B., M. Kimura, H. T. Godoy, and J. Amaya-Farfan. 2008. Updated Brazilian database on food carotenoids: Factors affecting carotenoid composition. *J. Food Comp. Anal.* 21:445-463.
- Scheidegger, R., A. K. Pande, P. L. Bounds, and W. H. Koppenol. 1998. The reaction of peroxyne with zeaxanthin. *Nitric Oxide-Biol. Ch.* 2:8-16.

Seddon, J. M., U. A. Ajani, R. D. Sperduto, R. Hiller, N. Blair, T. C. Burton, M. D. Farber, E. S. Gragoudas, J. Haller, D. T. Miller, L. A. Yannuzzi, W. Willett. 1994. Dietary carotenoids, vitamins A, C, and E, and advanced age-related macular degeneration. Eye Disease Case-Control Study Group. *JAMA-J. Am. Med. Assoc.* 272:1413–1320.

Serpeloni, J. M., D. Grotto, A. Z. Mercadante, M. L. P. Bianchi, and L. M. G. Antunes. 2010. Lutein improves antioxidant defense in vivo and protects against DNA damage and chromosome instability induced by cisplatin. *Arch. Toxicol.* 84:811–822.

Serpeloni, J. M., G. R. M. Barcelos, J. P. F. Angeli, A. Z. Mercadante, M. L. P. Bianchi, and L. M. G. Antunes. 2012. Dietary carotenoid lutein protects against DNA damage and alterations of the redox status induced by cisplatin in human derived HepG2 cells. *Toxicol. in Vitro.* 26:288–294.

Stone, H. and J. L. Sidel. 1985. *Sensory Evaluation Practices*. 2th ed. Academic Press: Orlando, USA.

Wold, J. P., K. Jørgensen, and F. Lundby. 2002. Nondestructive measurement of light-induced oxidation in dairy products by fluorescence spectroscopy and imaging. *J. Dairy Sci.* 85: 1693-1704.

Wold, J. P., A. Veberg, F. Lundby, A. N. Nilsen, and J. Moan. 2006. Influence of storage time and color of light on photooxidation in cheese: A study based

on sensory analysis and fluorescence spectroscopy. *Int. Dairy J.* 16: 1218–1226.

Xavier, A. A. O., L. D. Domingos, W. H. Viotto, and A. Z. Mercadante. 2012. Desenvolvimento e validação de método espectrofotométrico para determinação de corante à base de luteína adicionado em iogurte desnatado. *No prelo, Quim. Nova*, QN 117/12.

Zandomeneghi, M., L. Carbonaro, and G. Zandomeneghi. 2007. Biochemical fluorimetric method for the determination of riboflavin in milk. *J. Agric. Food Chem.* 55: 5990- 5994.

## CAPÍTULO IV

### **Desenvolvimento, validação e aplicação de um novo método para avaliação da estabilidade de luteína adicionada em queijo Prato**

Ana A. O. Xavier, Diogo Maus, Walkíria H. Viotto, Adriana Z. Mercadante

Artigo em preparação para ser submetido à revista *Food Analytical Methods*





## RESUMO

A ingestão de luteína vem sendo relacionada com a diminuição do risco e prevenção de doenças oculares como a degeneração macular relacionada à idade e a catarata. O queijo Prato é o único queijo brasileiro adicionado de corante, onde geralmente se emprega o urucum, que tem coloração amarelo-alaranjada devido à presença do carotenoide bixina. A luteína adicionada ao queijo, se estável durante o processamento e armazenamento, é uma alternativa à coloração conferida pelo urucum, além de constituir uma fonte adicional deste carotenoide à dieta humana. Um método espectrofotométrico simples foi desenvolvido e validado para quantificação de corante luteína adicionado em queijo Prato, e a estabilidade deste carotenoide foi avaliada durante o armazenamento refrigerado do queijo por 56 dias, utilizando diferentes materiais de embalagem. A extração exaustiva foi realizada com acetato de etila em vortex, seguido de centrifugação e partição do extrato para mistura de éter etílico/éter de petróleo. Os carotenoides foram dissolvidos em etanol e a absorbância medida a 445 nm. O método apresentou linearidade na faixa de 0,05 a 1,15 mg/g de queijo, com limites de detecção e quantificação estimados de 0,02 e 0,06 mg/g, respectivamente. A repetibilidade foi de 2,85 %, expressa como desvio padrão relativo, e a recuperação variou entre 93 e 98 %. O método desenvolvido e validado foi confiável para a quantificação de luteína adicionada em queijo Prato. As análises de luteína durante o armazenamento indicaram que não houve alteração nos níveis deste carotenoide, independente do tipo de embalagem e da exposição à luz.

Palavras-chave: carotenoide, validação de método, estabilidade, produto lácteo.



O queijo Prato é um queijo maturado obtido por coagulação enzimática do leite, complementada ou não pela ação de bactérias lácticas específicas. É classificado como um queijo gordo, de média umidade e de massa semicozida, devendo apresentar consistência semidura e elástica, textura lisa, podendo apresentar algumas olhaduras bem distribuídas.<sup>6</sup> O queijo Prato é fabricado em todas as regiões do Brasil e é o único queijo brasileiro com adição permitida de corante, tendo sua coloração conferida pelo urucum.<sup>7</sup> O urucum é um corante natural obtido das sementes de *Bixa orellana* L., cuja coloração vermelho-alaranjada é devida à presença majoritária do carotenoide bixina.<sup>8</sup> A adição de luteína ao queijo Prato é uma iniciativa bastante válida, pois surge como uma alternativa ao urucum na coloração do queijo Prato, além de oferecer uma fonte alternativa de ingestão deste carotenoide, principalmente para a população idosa.

O método recentemente desenvolvido para determinação de corante luteína em iogurte foi testado para queijo Prato,<sup>9</sup> entretanto, não demonstrou desempenho satisfatório pois a extração dos carotenoides não foi exaustiva. Diante deste fato, o objetivo do presente trabalho foi desenvolver e validar um método rápido e simples de extração e quantificação de corante à base de luteína em queijo Prato. O método, depois de validado, foi empregado para acompanhar a estabilidade do corante luteína durante o armazenamento refrigerado do queijo Prato embalado em dois tipos diferentes de embalagem (transparente e pigmentada de cor vermelha), na ausência e presença de luz fluorescente.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Material, reagentes e equipamentos

O leite para fabricação do queijo foi adquirido do laticínio Ati latte (Itatiba, Brasil). Foi empregada a cultura láctica Lyofast MOS 062 E (Sacco Brasil, Campinas, Brasil), composta de *Streptococcus thermophilus*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e/ou subsp. *cremoris*, na proporção de 4:4:2, coalho bovino em pó (Christian Hansen, Valinhos, Brasil) e o emulsificante polissorbato 80 (Oxiteno, São Paulo, Brasil). A formulação de corante natural à base de luteína Lutein 20% FS foi adquirida da DSM Nutritional Products (Basel, Suíça). Esta formulação contém cristais micronizados de luteína (extraída de *Tagetes erecta*) dispersos em óleo de milho, com *dl*- $\alpha$ -tocoferol como antioxidante, e apresenta-se como um óleo viscoso vermelho contendo no mínimo 20% de luteína e no máximo 2% de zeaxantina. Os solventes acetato de etila, etanol, éter etílico, éter de petróleo, metanol e tetraidrofurano, todos de grau analítico, foram adquiridos da Synth (Diadema, Brasil), assim como o sulfato de sódio anidro e o cloreto de cálcio. O padrão de luteína com pureza de 99 % foi doado pela DSM Nutritional Products (Basel, Suíça).

Para embalagem dos queijos foram utilizados sacos plásticos termoencolhíveis transparentes e pigmentados de cor vermelha, constituídos de coextrusados de poliamidas e poliolefinas, que foram fornecidos pela SPEL (São Paulo, Brasil).

Os queijos foram fabricados em um tanque automático (Biosinox, Lambari, Brasil), com capacidade para 150 L, composto de lira para corte e agitação ajustável, e prensados em prensa vertical pneumática (Inoxmilk, Lambari, Brasil). Após a embalagem, os queijos foram armazenados em estufas do tipo BOD (Marconi modelo MA 415<sup>®</sup>, Piracicaba, Brasil) na ausência e presença de luz fluorescente (lâmpada TL8<sup>®</sup> 15 W, OSRAM, Osasco, Brasil).

Para extração dos carotenoides foram utilizados um agitador de soluções tipo vortex (Phoenix Luferco, modelo AP56, Araraquara, Brasil), uma centrífuga Beckman Coulter, modelo Allegra<sup>®</sup> 64R (Brea, EUA), e um evaporador rotatório Buchi (Flawil, Suíça). A quantificação foi realizada em espectrofotômetro com arranjo de diodos Agilent, modelo 8453 (Palo Alto, EUA).

O perfil de carotenoides do corante foi determinado em cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE) da Waters (Milford, EUA) modelo 600E, acoplado a um detector de arranjo de diodos (DAD) Waters modelo 996, sistema de injeção “Rheodyne” com alça de amostra de 20 µL (Rohnert Park, EUA) e sistema de aquisição e processamento de dados Millenium.

## 2.2. Análise por CLAE de carotenoides do corante à base de luteína

O corante foi diluído em acetonitrila/acetato de etila (1:1) para injeção no HPLC. Os carotenoides foram separados em coluna C<sub>18</sub> NovaPak (300 X 3,9 mm, tamanho de partícula 4 µm) mantida a 29 °C com gradiente linear de 100 % acetonitrila/metanol (9:1, v/v) a 100 % de acetato de etila em 30 min, com fluxo de

1 mL/min. Os espectros de absorção UV-visível foram adquiridos entre 200 e 600 nm e os cromatogramas foram processado a 450 nm.<sup>10</sup> Os picos foram identificados com base na ordem de eluição em coluna C<sub>18</sub> e nas características do espectro UV-visível ( $\lambda_{\max}$ , estrutura fina do espectro (% III/II) e intensidade do pico “cis” (% A<sub>B</sub>/A<sub>II</sub>)), comparando com informações disponíveis na literatura.<sup>10-13</sup>

### 2.3. Fabricação do queijo prato

O leite pasteurizado foi transferido para o tanque de fabricação, aquecido a 35 °C, seguido de adição da cultura láctica na proporção de 1 % (m/m), do cloreto de cálcio 50 % (200 ppm), da formulação de luteína (0,04 %) e de polissorbato 80 (0,06 %). O emprego do emulsificante polissorbato 80 foi necessário para facilitar a dispersão da formulação da luteína no leite, considerando que a formulação de corante adicionada é uma preparação lipofílica. O coalho bovino em pó foi adicionado em quantidade suficiente para coagular o leite em 30 min. Após a coagulação, o ponto de corte foi verificado e o gel foi cortado durante 10 min, resultando em cubos de aproximadamente 1 cm de aresta. Posteriormente, iniciou-se uma agitação lenta por aproximadamente 10 min (1ª mexedura), seguida pelo aquecimento indireto da coalhada até 42 °C, na proporção de 1 °C a cada 2-3 min, e o aumento progressivo da agitação (2ª mexedura), para que ocorresse o semicozimento da massa. O soro foi drenado e a massa foi colocada em formas para prensagem. Após a prensagem, os queijos foram cortados ao meio e procedeu-se a salga em salmoura por 12 h a 5 °C, utilizando solução de

NaCl 20 %. Os queijos foram secos a 12 °C por 48 h e embalados a vácuo em sacos plásticos termoencolhíveis.

#### 2.4. Extração dos carotenoides

Os testes para extração dos carotenoides de queijo prato foram realizados de acordo com metodologias já existentes na literatura para determinação de carotenoides em leite e produtos lácteos.<sup>9,14-16</sup> Foram empregados como solventes extratores tetraidrofurano, acetato de etila e éter etílico e o procedimento de extração foi realizado utilizando vortex ou almofariz e pistilo.

Após cada teste de extração, o solvente foi completamente evaporado em evaporador rotatório e o extrato seco foi redissolvido em etanol para quantificação dos carotenoides totais através de espectrofotometria no UV-visível. Todas as análises foram realizadas em ambiente com iluminação reduzida.

#### 2.5. Quantificação dos carotenoides totais

A determinação dos carotenoides totais do queijo Prato foi realizada por espectrofotometria no UV-visível, pela leitura da absorbância do extrato etanólico de carotenoides no comprimento de onda de 445 nm, que é o  $\lambda_{\max}$  de absorção da luteína em etanol. A concentração de carotenoides totais foi calculada a partir da Lei de Lambert-Beer, utilizando  $E_{1cm}^{1\%} = 2550$  correspondente ao coeficiente de absorvidade da luteína em etanol.<sup>11</sup>

Para verificar se a concentração de carotenoides presente neste queijo interfere na quantificação de carotenoides totais no queijo adicionado de corante luteína, a determinação de carotenoides totais também foi realizada no queijo sem adição de corante luteína. A fase oleosa de 15 g de queijo foi separada por centrifugação a 20000 *g* a 25 °C durante 30 min, recolhida e os carotenoides foram extraídos utilizando éter de petróleo como solvente. Para quantificação, o volume do extrato foi aferido com éter de petróleo em balão volumétrico, e a leitura da absorbância do extrato foi realizada a 450 nm,  $\lambda_{\text{max}}$  de absorção do  $\beta$ -caroteno em éter de petróleo (carotenoide majoritário em queijo).<sup>16</sup> A concentração de carotenoides totais foi calculada a partir da Lei de Lambert-Beer, utilizando  $E_{1\text{cm}}^{1\%}$  igual a 2592, correspondente ao coeficiente de absorvidade do  $\beta$ -caroteno em éter de petróleo.

## 2.6. Validação do método

Para validação do método desenvolvido no presente trabalho, foram avaliados os seguintes parâmetros: linearidade, faixa de aplicação, limites de detecção (LD) e quantificação (LQ), precisão e exatidão. Os testes empregados e os critérios de aceitação utilizados estão de acordo com as recomendações da ICH e de Ribani e colaboradores.<sup>17,18</sup>

A linearidade do método e sua faixa de aplicação foram determinadas através da construção de uma curva analítica utilizando extratos de carotenoides obtidos de amostras de queijo prato, adicionados de diferentes concentrações



conhecidas do corante à base de luteína, no intervalo de concentração de 0,05 e 1,2 mg de luteína/g de queijo.

Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram determinados a partir dos parâmetros da curva analítica construída para o ensaio de linearidade e foram expressos em mg/g.

A precisão foi determinada através da concordância dos resultados no mesmo laboratório, em dias diferentes. Foram realizadas três extrações em três dias diferentes a partir da mesma amostra de queijo com corante à base de luteína na concentração de 0,70 mg de luteína/g de queijo. A precisão foi expressa como desvio padrão relativo (DPR).

A exatidão foi verificada por ensaios de recuperação, onde concentrações conhecidas do corante à base de luteína foram adicionadas ao queijo. Foram realizados três níveis de adição (0,30; 0,70 e 1,05 mg de luteína/g de queijo) e as extrações foram realizadas em triplicata para cada nível.

## 2.7. Estabilidade do corante luteína durante o armazenamento do queijo Prato

A metodologia desenvolvida e validada foi empregada para acompanhar a estabilidade do corante luteína durante 56 dias de armazenamento refrigerado do queijo Prato em distintas condições. Após a fabricação, os queijos foram embalados em dois tipos de embalagens plásticas termoencolhíveis: pigmentadas (cor vermelha) e transparentes, e foram armazenados em estufas BOD na

presença e na ausência de luz fluorescente, totalizando 4 tratamentos diferentes. As amostras armazenadas sob luz receberam radiação na parte superior, de modo semelhante às condições encontradas em supermercados. Os queijos foram armazenados a 12 °C e virados a cada sete dias durante o período de maturação. Para as análises do teor de carotenoides totais, os queijos foram escolhidos aleatoriamente, triturados em multiprocessador e homogeneizados para constituição de uma amostra representativa. Estas análises foram realizadas logo após a fabricação dos queijos (dia 0) e nos dias 14, 28, 42 e 56 dias de armazenamento.

## 2.8. Análise Estatística

As diferenças entre os tratamentos das amostras durante o tempo de armazenamento e as interações entre elas foram avaliadas por análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey (nível de significância de 5 %), utilizando o *software Statistica* versão 8.0.<sup>19</sup>

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1. Perfil de carotenoides do corante à base de luteína

O cromatograma, obtido por CLAE-DAD (Figura 2), do corante à base de luteína demonstrou a presença de *all-trans*-luteína (Tabela 1) como carotenoide majoritário (96 %). Também foi detectada a presença de *all-trans*-zeaxantina (1 %) e outro composto que, por suas características espectrais, corresponde a um

derivado da luteína (3 %). A presença de pequenas concentrações de zeaxantina já foi relatada em extrato de *Tagetes erecta* L., onde juntamente com seus isômeros *cis*, correspondiam a 5 % dos carotenoides do extrato.<sup>20</sup> Surpreendentemente, não foram detectados ésteres de luteína na formulação de corante adicionada aos queijos. Este resultado difere daqueles encontrados em estudo prévio realizado por nosso grupo de pesquisa, onde a análise cromatográfica de corante hidrossolúvel à base de luteína, também extraído de *Tagetes erecta* L., demonstrou apenas a presença de ésteres de luteína.<sup>9</sup> Outros autores que estudaram a composição de extratos de luteína obtidos da mesma fonte, identificaram perfil semelhante, onde cerca de 90 % da composição de carotenoides dos extratos corresponde a ésteres de luteína.<sup>10,13</sup> É possível que durante a produção da formulação comercial de luteína os extratos tenham sido saponificados, visto que esse procedimento, além de hidrolisar os ésteres, proporciona um aumento no seu poder corante.<sup>21</sup>

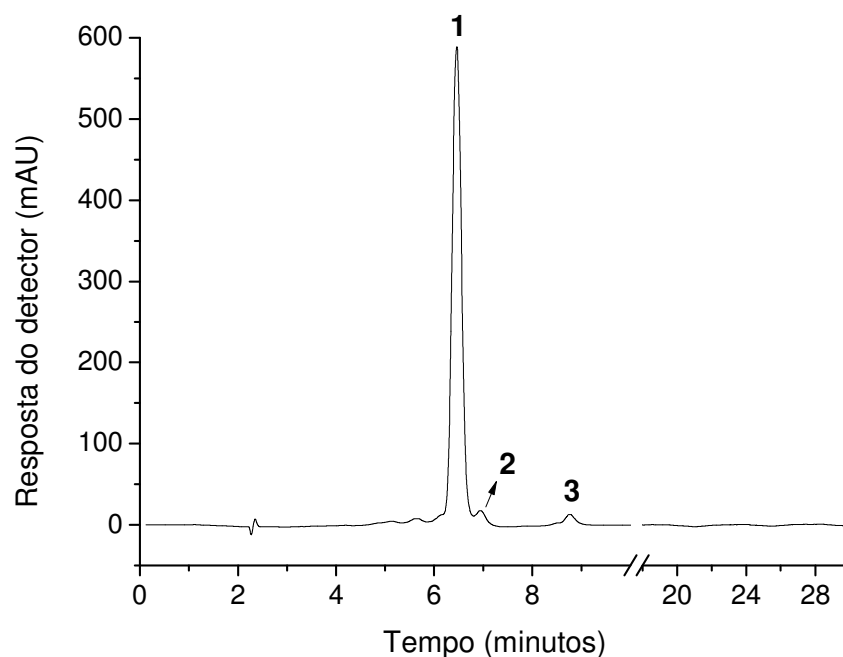


Figura 2. Cromatograma do corante à base de luteína obtido por CLAE-DAD, processado a 450 nm. As condições cromatográficas estão descritas no texto. Pico 1: luteína, pico 2: zeaxantina, pico 3: derivado de luteína.

Tabela 1. Características cromatográficas e espectrofotométricas (UV-visível) dos carotenoides do corante à base de luteína, obtidos por CLAE-DAD.

Pico <sup>a</sup>	Carotenoide	$t_R$ (min) <sup>b</sup>	$\lambda_{m\acute{a}x}$ (nm)	%III/II	%A <sub>B</sub> /A <sub>II</sub>
1	All- <i>trans</i> -luteína	6,4	423, 446, 475	59	0
2	All- <i>trans</i> -zeaxantina	6,9	428, 453, 482	47	0
3	Derivado de luteína	8,7	338, 423, 445, 474	40	51

<sup>a</sup>Numerados de acordo com a Figura 2.

<sup>b</sup>Tempo de retenção em coluna C<sub>18</sub>.

### 3.2. Desenvolvimento do método de extração

Os solventes para os testes de extração foram escolhidos por terem seu uso já relatado na literatura para extração de carotenoides de matrizes lácteas. Aryana e colaboradores<sup>15</sup> empregaram acetato de etila para extração de carotenoides de iogurte, enquanto Hulshof e colaboradores<sup>16</sup> utilizaram éter etílico para extração em leite. O tetraidrofurano (THF) foi utilizado tanto para extração de carotenoides de queijo quanto de iogurte.<sup>9,16</sup>

Inicialmente foi testado um agitador do tipo vortex como equipamento de extração, por este já ter sido empregado previamente em método desenvolvido e validado em nosso laboratório para determinação de luteína em iogurte desnatado.<sup>9</sup> Os carotenoides foram extraídos a partir de 1 g de amostra triturada de queijo com os três solventes propostos, seguido de centrifugação a 3500 g durante 5 min, a 20 °C para separação das fases. Entretanto, a extração não foi eficiente com a utilização de nenhum dos solventes testados, provavelmente pelo fato da agitação em vortex não permitir o rompimento da estrutura sólida do queijo, diminuindo o contato entre o solvente e os carotenoides.

Uma extração utilizando almofariz e pistilo foi então realizada, visando o rompimento manual da estrutura do queijo. Também foi adicionado *hyflsupercel* para aumentar a superfície de contato entre o solvente e a amostra.<sup>22</sup> O primeiro teste em almofariz foi realizado com acetato de etila, visto que este solvente já foi empregado para extração de luteína de iogurte desnatado adicionado de uma formulação de luteína semelhante à utilizada neste trabalho.<sup>15</sup> Segundo estes autores, a luteína foi extraída com acetato de etila em mesa agitadora, porém este

método não foi validado. O procedimento de extração de luteína do queijo em almofariz, utilizando acetato de etila como solvente, resultou em valores de recuperação superiores a 90 % e, portanto, foi o método para extração dos carotenoides de queijo escolhido para ser validado. Para a extração, foram pesados  $0,20 \pm 0,01$  g de queijo em um almofariz, e foi adicionada a mesma quantidade de *hyfflosupercel*. Em seguida, adicionou-se acetato de etila e a amostra foi macerada com o auxílio de um pistilo. O extrato foi transferido para um tubo de vidro, centrifugado a 3500 g durante 5 min a 20 °C e o sobrenadante foi transferido para um erlenmeyer. Para extração exaustiva dos carotenoides presentes no queijo, o processo de extração e centrifugação foi repetido 5 vezes. Os extratos foram combinados e transferidos para um funil de separação contendo uma mistura de éter etílico/éter de petróleo (2:1, v/v) para a etapa de partição. O extrato foi lavado com 4 L de água destilada, recolhido em outro erlenmeyer e adicionado de sulfato de sódio anidro para adsorção de resíduos de água da etapa de lavagem. Em seguida, o extrato foi transferido para um balão de fundo redondo e o solvente foi completamente evaporado em evaporador rotatório ( $T \leq 38$  °C). O extrato seco foi então redissolvido em etanol e o volume foi aferido em balão volumétrico de 10 mL para leitura da absorbância na região do visível e quantificação dos carotenoides totais.

A análise quantitativa de carotenoides requer uma extração exaustiva da amostra, onde geralmente de 4 a 6 extrações são necessárias.<sup>22</sup> A completa remoção dos carotenoides do queijo Prato foi alcançada após 5 extrações, visto

que após a quinta extração, o espectro UV-visível dos extratos não apresentou banda de absorção a 445 nm.

O fato de o acetato de etila ter sido o melhor solvente para extração dos carotenoides do queijo pode ser explicado por seu índice de polaridade intermediário (índice de polaridade = 4,3),<sup>23</sup> que facilita sua entrada na estrutura do queijo Prato, o qual apesar de ser classificado como um queijo gordo (de 45 a 59,9 % de gordura no extrato seco), também apresenta elevado teor de umidade (cerca de 45 %). A escolha do acetato de etila como solvente extrator justifica a realização da etapa de partição dos extratos, pois, apesar de ser imiscível com a água, este solvente pode extrair compostos com características mais polares que podem causar turbidez impedindo a quantificação espectrofotométrica. Os extratos foram transferidos para mistura de éter etílico e éter de petróleo na proporção 2:1, já que a luteína, o carotenoide majoritário do extrato, é solúvel preferencialmente em éter etílico do que em éter de petróleo. A completa evaporação do solvente foi realizada em evaporador rotatório, com temperatura do banho cuidadosamente controlada para não exceder os 38 °C, já que os carotenoides são sensíveis à isomerização em temperaturas elevadas.<sup>24</sup>

### 3.3. Validação do método

O teor de carotenoides totais no queijo Prato sem adição de corante luteína foi determinado na gordura extraída dos queijos, já que é sabido que os carotenoides naturalmente presentes em produtos lácteos encontram-se nesta

fração do alimento. O teor médio de carotenoides totais para o queijo Prato sem adição de luteína foi de 0,20 µg de β-caroteno/g de queijo, cerca de 1000 vezes inferior aos valores de carotenoides totais dos queijos adicionados de corante luteína, que continham valores próximos a 700 µg de luteína/g de queijo. Desta forma, admitiu-se que o teor de carotenoides totais naturalmente presente nos queijos não exerceu influência na quantificação dos carotenoides totais do queijo adicionado de corante luteína.

O método demonstrou ser linear na faixa testada (0,05 - 1,15 mg/g), com coeficiente de determinação igual a 0,9984. A curva analítica construída com os extratos obtidos a partir de queijos adicionados de diferentes concentrações de corante luteína está apresentada na Figura 3.

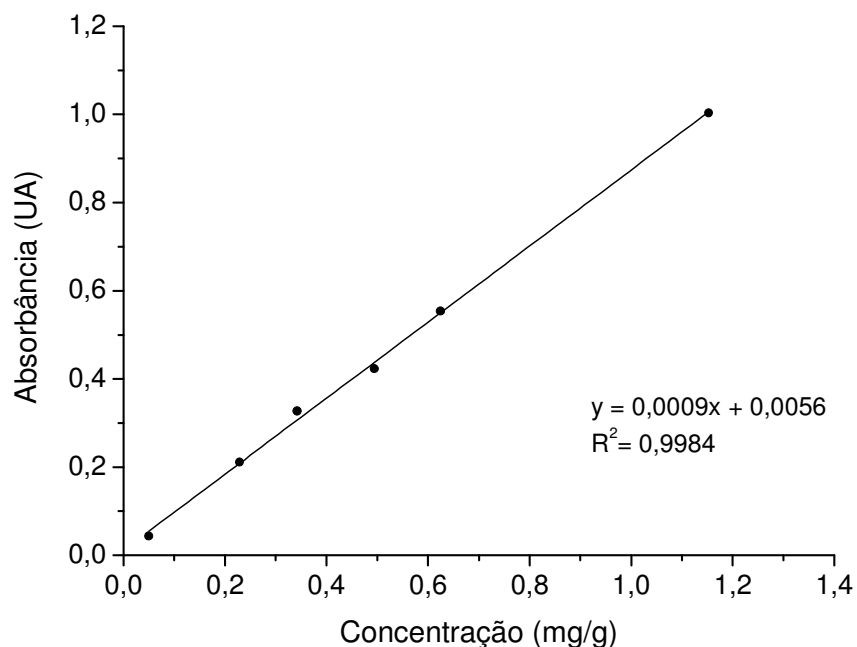


Figura 3. Curva analítica dos extratos de carotenoides totais obtidos de queijo Prato adicionado de diferentes concentrações de corante à base de luteína.



Os parâmetros da curva foram empregados para estimar o LD e LQ do método, que foram 0,02 e 0,06 mg/g, respectivamente. Gill & Indyk<sup>25</sup> encontraram limite bastante inferior em análise de luteína em leite e fórmulas pediátricas (LD = 0,014 µg/g), provavelmente pela quantificação ter sido realizada por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de arranjo de diodos, uma técnica analítica bem mais sensível que a quantificação por espectrofotometria. Em outro trabalho de nosso grupo de pesquisa, também foram encontrados limites inferiores na análise de luteína adicionada a iogurte desnatado, quantificada por espectrofotometria (LD = 0,42 µg/g e LQ = 1,28 µg/g).<sup>9</sup> Embora os limites do método validado no presente estudo sejam superiores a outros já relatados na literatura para carotenoides em produtos lácteos, estes estão adequados à finalidade a qual o método se propõe.

O DPR do método, que indica a repetibilidade, foi de 2,85 %. De acordo com Horwitz,<sup>26</sup> para métodos de análises de compostos presentes em níveis de mg/g, o valor máximo de DPR aceitável é de 6 %, atestando desta forma a excelente repetibilidade do método proposto. Biehler e colaboradores<sup>27</sup> compararam a eficiência de 4 métodos espectrofotométricos para quantificação de carotenoides de diversas matrizes vegetais e obtiveram valores de DPR que variaram de 6,1 a 7,0 %. A exatidão do método, avaliada por testes de recuperação em três níveis de adição, variou entre 93 e 98 % (Tabela 2). Por serem obtidos valores muito próximos a 100 % de recuperação, o método foi considerado exato.

Tabela 2. Valores de recuperação de luteína em queijo Prato adicionado de corante à base de luteína.

Concentração adicionada (mg/g)	Concentração encontrada (mg/g) <sup>1</sup>	Recuperação <sup>2</sup> (%)
0,35	0,32 ± 0,03	93
0,70	0,69 ± 0,02	98
1,05	1,01 ± 0,02	96

<sup>1</sup>Média ± desvio padrão, n = 3.

<sup>2</sup>Média da recuperação, n = 3.

#### 3.4. Estabilidade da luteína adicionada em queijo Prato

O método validado foi aplicado para monitorar os teores de carotenoides em queijo Prato adicionado de corante luteína, embalado em dois tipos de embalagens (transparente e vermelha), durante o armazenamento refrigerado tanto na presença como na ausência da luz. Os níveis médios de luteína encontrados para os queijos embalados em embalagem transparente foram de 0,69 mg/g para os expostos à luz e 0,70 mg/g para os não expostos à luz. Os resultados para os queijos embalados em embalagem vermelha foram semelhantes, onde as concentrações médias foram de 0,69 mg/g para os queijos expostos à luz e 0,70 mg/g para os não expostos à luz (Figura 4).

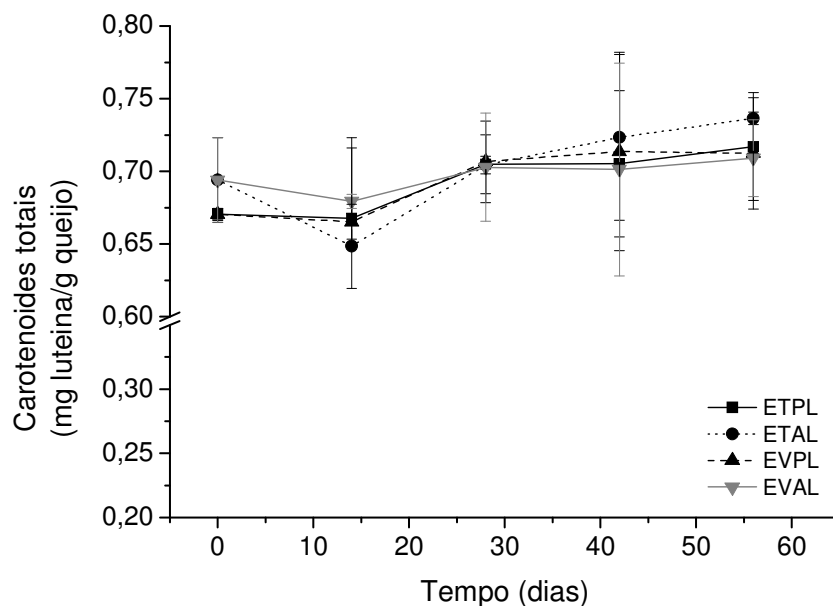


Figura 4. Concentração de luteína em queijo Prato embalado em diferentes tipos de embalagens e em armazenados a 12 °C sob diferentes condições. ■ETPL= queijo armazenado em embalagem transparente, na presença de luz; ●ETAL= queijo armazenado em embalagem transparente, na ausência de luz; ▼EVPL= queijo armazenado em embalagem vermelha, na presença de luz; ▲EVAL= queijo armazenado em embalagem vermelha, na ausência de luz. Os resultados correspondem a duplicata de processamento dos queijos e triplicata de análise de extração.

Tabela 3. Quadrados médios e probabilidades para teor de luteína dos queijos durante o tempo de estocagem.

Fatores	Luteína		
	gl	QM	p
Embalagem	1	29,877	0,9335
Luz	1	355,156	0,3781
Embalagem x luz	1	54,920	0,7019
Tempo	4	3.901,020	0,0634
Embalagem x tempo	4	244,868	0,9486
Luz x tempo	4	230,620	0,9536

gl = graus de liberdade; QM = quadrados médios; p = probabilidade.

Os carotenoides presentes nos alimentos são suscetíveis à oxidação dependendo das condições de processamento e armazenamento, sendo fatores críticos a exposição à luz e o tipo de embalagem utilizada para envase. As principais implicações destas reações de oxidação são a perda da cor e da atividade biológica.<sup>24</sup> Não obstante, a análise estatística não revelou diferença significativa ao nível de 5 % entre os diferentes tratamentos (Tabela 3), ou seja, não houve influência do tipo de embalagem nos níveis de luteína, ainda que a embalagem pigmentada de cor vermelha ofereça maior barreira à passagem da luz, em comparação com a embalagem transparente. Além disso, a exposição ou não à luz fluorescente também não influenciou nos teores de luteína. A presença de

macromoléculas como as proteínas, pode oferecer certa fotoproteção aos carotenoides, através da complexação com estes pigmentos, ou atuando como filtro, reduzindo a incidência da luz.<sup>22</sup>

Resultados semelhantes foram obtidos quando uma formulação de luteína foi adicionada em queijo Cheddar nas concentrações de 1, 3 e 6 mg de luteína/porção de queijo (28 g), e não foi verificada alteração na concentração de luteína durante 24 semanas de maturação do queijo em câmara fria do tipo *walk-in* a 4,5 °C, para todos os níveis de adição estudados.<sup>14</sup> Em outro estudo realizado em iogurte desnatado,<sup>15</sup> uma perda de cerca de 10 % nos teores de luteína foi relatada após 5 semanas de armazenamento. Em trabalho prévio realizado por nosso grupo (Capítulo III), não foram verificadas alterações nos níveis de luteína adicionada em iogurte desnatado durante 35 dias de armazenamento refrigerado, tanto para amostras expostas à luz quanto para as mantidas no escuro. Os iogurtes continham teores de luteína de 1,5 mg de luteína por porção (120 g).

O método desenvolvido demonstrou linearidade na faixa estudada, precisão e exatidão adequadas para extração e quantificação espectrofotométrica de luteína adicionada em queijo Prato. Além disso, o método é uma alternativa rápida e de baixo custo para quantificação de carotenoides em queijo adicionado de corante luteína, quando comparado às análises por CLAE. O acompanhamento dos níveis de luteína durante o armazenamento refrigerado de queijo prato revelou que não houve degradação da luteína adicionada, independente do tipo de embalagem empregada e das condições de ausência ou presença de luz. Isso

significa que a adição de corante luteína é tecnicamente viável, pois toda a luteína adicionada estará presente no produto durante sua vida de prateleira, que geralmente é de 60 dias.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à FAPESP pelo suporte financeiro. A. A. O. Xavier e D. Maus são bolsistas de doutorado do CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), do Governo Federal Brasileiro.

## REFERÊNCIAS

- 1 G. Britton. In Carotenoids, vol. 1. G. Britton, S. Liaansen-Jensen, and H. Pfander Eds. Basel: Birkhauser (1995).
- 2 ChJ. Chiu, and A. Taylor, *Exp. Eye Res.* 84, 229 (2007).
- 3 F. Khachik, P. S. Bernstein, and D. L. Garland, *Inv. Ophth. Vis. Sci.* 38, 1802 (1997).
- 4 P. Bhosale, B. Serban, and P. S. Bernstein, *Arch. Biochem. Biophys.* 483, 175 (2009).
- 5 R. Scheidegger, A. K. Pande, P L. Bounds, and W. H. Koppenol, *Nitric Oxide-Biol. Ch.* 2, 8 (1998).
- 6 Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria n° 358 (1997).

- 7 Brasil. Conselho Nacional de Saúde. Resolução CNS/MS nº 04 (1988).
- 8 H. D. Preston, and M. D. Rickard, *Food Chem.* 5, 47 (1980).
- 9 A. A. O. Xavier, L. D. Domingos, W. H. Viotto, and A. Z. Mercadante, *Quim. Nova.* Aceito para publicação QN 117/12 (2012).
- 10 R. Piccaglia, M. Marotti, and S. Grandi, *Ind. Crop. Prod.* 8, 45 (1998).
- 11 B. H. Davies, In *Chemistry and biochemistry of plant pigments*, vol. 2. T.W. Goodwin, Ed.; London:Academic Press (1976).
- 12 W. Gau, H. J. Ploschke, and C. Wünsche, *J. Chromatogr.* 262, 277 (1983).
- 13 J. Rivas, *J.Chromatogr.* 464, 442 (1989).
- 14 S. T. Jones, K. J. Aryana, and J. N. Losso, *J. Dairy Sci.*, 88, 1661 (2005).
- 15 K. J. Aryana, H. T. Barnes, T. K. Emmick, P. McGrew, and B. Moser, *J. Food Sci.* 71, 467 (2006).
- 16 P. J. M. Hulshof, T. Van Roekel-Jansen, P. Van de Bovenkamp, and C. E. West, *J. Food Comp. Anal.* 19, 67 (2006).
- 17 ICH International Conference on Harmonization of Technical Requirements for registration of Pharmaceutical for Human use, Q2B- validation of Analytical procedure: methodology (1996).
- 18 M. Ribani, C. B. G. Bottoli, C. H. Collins, I. C. S. F. Jardim, and L. F. C. Melo, *Quim. Nova.* 27, 771 (2004).

- 19 STATSOFT, Statistica (data analysis software system) v. 8 (2007).
- 20 W. L. Hadden, R. H. Watkins, L. W. Levy, E. Regalado, D. M. Rivadeneira, R. B. van Breemen, and S. J. Schwartz, *J. Agric. Food Chem.* 47, 4189 (1999).
- 21 D. L. Fletcher, and C. M. Papa, *Poultry Sci.* 65, 1708 (1986).
- 22 A. Z. Mercadante, In *Food Colorants: Chemical and Functional Properties*, C. Socaciu Ed. New York: CRC Press (2008).
- 23 Brasil. *Farmacopéia Brasileira*, vol.2. ANVISA Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 5th ed. Manguinhos: Editora Fiocruz (2010).
- 24 D. Rodriguez-Amaya, *A guide to carotenoid analysis in food*. ILSI Press: Washington (2001).
- 25 B. D. Gill, and H. E. Indyk, *Int. Dairy J.* 18, 894 (2008).
- 26 W. Horwitz, *Anal. Chem.* 54, 67. (1982).
- 27 E. Biehler, F. Mayer, L. Hoffmann, E. Krause, and T. Bohn, *J. Food Sci.* 75, C55 (2010).



## CAPÍTULO V

**Bioacessibilidade de luteína adicionada em leite e iogurte com diferentes teores de gordura utilizando um modelo de digestão *in vitro***

Ana A. O. Xavier, Adriana Z. Mercadante, Antonio Pérez-Gálvez

Este trabalho foi realizado durante período de Doutorado-Sanduíche no *Departamento de Biotecnología de Alimentos do Instituto de la Grasa (CSIC - Consejo Superior de Investigaciones Científicas)*, em Sevilha – Espanha.

Artigo em preparação para ser submetido à revista *Journal of Agricultural and Food Chemistry*



## RESUMO

A bioacessibilidade de uma formulação hidrossolúvel de luteína adicionada em leite e em iogurte com diferentes teores de gordura foi avaliada por um método de digestão *in vitro*. A luteína apresentou-se mais bioacessível nos leites semidesnatado e integral (21,2 e 19,4 %, respectivamente), em comparação ao leite desnatado, que apresentou a menor bioacessibilidade da luteína (6,2 %). Os três iogurtes demonstraram valores de micelarização estatisticamente diferentes, sendo 2,6 % para o iogurte desnatado, 11,8 % para o iogurte semidesnatado e 21,1 % para o iogurte integral. Estes resultados sugerem que o teor de lipídios e a complexidade da matriz alimentar influenciam a micelarização dos carotenoides. Foram hidrolisados 85 % dos ésteres de luteína durante a digestão *in vitro*, provavelmente pela ação da lipase pancreática. Os leites semidesnatado e integral, e o iogurte integral revelaram-se bons veículos para adição de corante luteína, visto que apresentaram índices de bioacessibilidade semelhantes aos de alimentos que são fonte desta xantofila.

**Palavras-chave:** bioacessibilidade, luteína, leite, iogurte, lipídios.

## 1. INTRODUÇÃO

Os carotenoides são um grupo de pigmentos naturais sintetizados por plantas superiores, algas e bactérias, cuja coloração varia do amarelo ao vermelho. Embora estejam amplamente difundidos na natureza, sendo que mais de 700 carotenoides já foram isolados, apenas cerca de 40 carotenoides são encontrados em alimentos que fazem parte da dieta humana.<sup>1</sup> Dentre eles, somente a luteína e a zeaxantina acumulam-se na mácula lútea humana, região que contém a maior densidade de fotorreceptores e que é responsável por nossa elevada acuidade visual.<sup>2</sup> Acredita-se que estas xantofilas desempenhem um importante papel protetor na manutenção da saúde ocular, provavelmente por sua atuação como filtro de luz azul e como desativadoras de espécies reativas de oxigênio.<sup>3,4</sup> Níveis elevados de luteína e zeaxantina na dieta e no plasma foram relacionados com uma diminuição de 43 % no risco de ocorrência de degeneração macular relacionada à idade (DMRI), maior causa de cegueira irreversível em idosos.<sup>5</sup> Além disso, a presença de produtos de oxidação destas xantofilas na retina reforça a hipótese de sua ação como antioxidante.<sup>6,7</sup>

A extração de compostos bioativos como a luteína a partir de fontes apropriadas, a fim de torná-los mais puros e concentrados e sua adição a matrizes alimentares consumíveis é bastante comum.<sup>8</sup> Estes alimentos adicionados ou enriquecidos com substâncias bioativas representam um mercado crescente, e seu consumo tem sido incentivado com o propósito de alcançar os efeitos bioquímicos esperados destas substâncias sem a necessidade da ingestão de suplementos ou de mudanças de hábitos alimentares.<sup>9</sup> Desta forma, a adição de

luteína em produtos frequentemente presentes na dieta da população, como os produtos lácteos, é uma iniciativa que amplia a gama de alimentos que podem ser fontes de carotenoides, além de agregar valor a estes produtos.

Um aspecto essencial a ser considerado durante o desenvolvimento de produtos fortificados ou adicionados de substâncias bioativas é a biodisponibilidade destes compostos,<sup>10</sup> visto que apenas uma parcela de todos os componentes presentes nos alimentos é realmente assimilada e utilizada pelo organismo para desempenhar as funções biológicas. A biodisponibilidade é um conceito que vem sendo definido como a soma da bioacessibilidade, que representa a fração de um composto que é liberado da matriz e torna-se disponível para absorção intestinal, e da bioatividade, que inclui eventos que vão desde o transporte do composto para o tecido-alvo, até a geração da resposta fisiológica esperada.<sup>8</sup> Experimentalmente, métodos enzimáticos que simulam *in vitro* a digestão humana têm sido amplamente utilizados para avaliar a bioacessibilidade de carotenoides.<sup>11-15</sup> Os métodos *in vitro* são uma alternativa simples e de menor custo para estimar a bioacessibilidade de carotenoides, e embora estejam focados em aspectos parciais da digestão, seus resultados têm sido correlacionados satisfatoriamente com aqueles obtidos através de estudos *in vivo*.<sup>16</sup>

Existem na literatura trabalhos sobre a viabilidade da adição de luteína em produtos lácteos.<sup>17-19</sup> Entretanto, dados a respeito da bioacessibilidade da luteína adicionada a este tipo de produtos ainda são escassos. Desta forma, o objetivo

deste trabalho foi avaliar a bioacessibilidade da luteína adicionada em leite e em iogurte, empregando um modelo enzimático de digestão *in vitro*. Uma formulação comercial de luteína foi adicionada em leite com diferentes teores de gordura, e a partir de cada tipo de leite foram produzidos os respectivos iogurtes. Além disso, para avaliar as transformações do corante de luteína durante a digestão, o perfil de carotenoides da formulação de luteína, e dos três tipos de leite e de iogurte foi determinado através de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Amostras

As amostras de leite da Central Lechera Asturiana (Corporación Peñasanta Alimentaria S.A., Granda, Espanha) foram adquiridas em supermercado da cidade de Sevilla (Espanha), sendo o leite desnatado e integral na forma de leite em pó, e o leite semidesnatado como leite fluido UHT. A formulação hidrossolúvel de luteína 0,3 % para fins alimentícios Vegex Lutein WS<sup>®</sup> (Christian Hansen, Horsholm, Dinamarca) e a cultura láctea mista liofilizada de *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus bulgaricus* (YO-MIX 505 LYO 200), fornecida pela Danisco (Cotia, Brasil), foram utilizadas para o preparo dos iogurtes desnatado, semidesnatado e integral.

## 2.2. Reagentes

As enzimas pepsina de mucosa gástrica suína, extrato de bile suína, pancreatina e lipase de pâncreas suíno foram adquiridas da Sigma (St. Louis, EUA). A acetona e o tetraidrofurano grau HPLC foram adquiridos da Romyl (Teknokroma, Barcelona, Espanha), e a água purificada foi obtida a partir de sistema purificador Milli-Q (Millipore, Milford, EUA). Os demais reagentes empregados foram todos de grau analítico.

## 2.3. Preparação dos iogurtes

O leite na forma de pó foi reconstituído, de acordo com as instruções do fabricante, a 10 % de sólidos totais para o leite desnatado e a 12,5 % para o leite integral. A decisão de uso de leite em pó partiu do pressuposto que este tipo de leite apresenta menor variação em sua composição. Não foi encontrado leite em pó semidesnatado no mercado, e, portanto neste caso foi utilizado leite fluido. Para preparação dos iogurtes, a formulação de luteína foi adicionada aos leites, de modo que a concentração final no produto fosse de 10 µg de luteína/g de iogurte. Após, a cultura láctea mista foi adicionada na concentração de 2,5 % (m/v) sobre o volume de leite. O leite já adicionado da cultura láctea foi distribuído em frascos plásticos com tampa de rosca, e acondicionado em estufa a 45 °C, para fermentação. A fermentação foi interrompida através de resfriamento dos frascos em banho de gelo quando o pH 4,8 foi atingido, o que ocorreu aproximadamente

após 3 h de incubação. Os iogurtes foram mantidos em câmara fria a 4 °C até o momento das análises.

#### 2.4. Bioacessibilidade *in vitro* dos carotenoides

As condições experimentais utilizadas para determinação da bioacessibilidade *in vitro* foram as descritas por Fernández-García et al. (2008) e Garrett et al. (2000), com algumas modificações (Figura 1).<sup>20,21</sup>

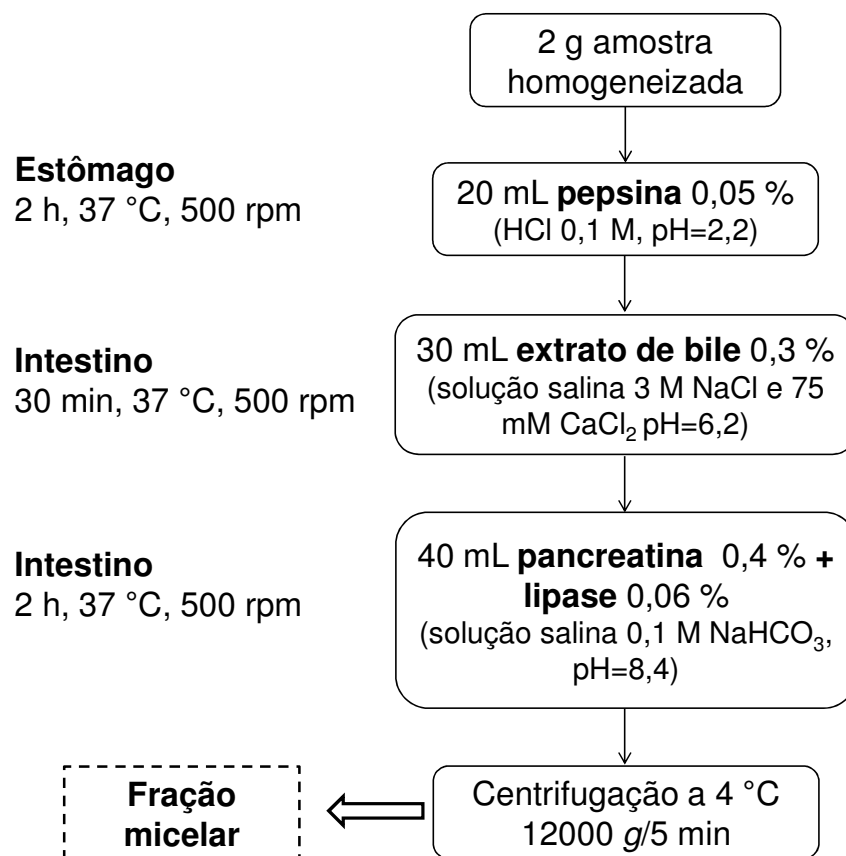


Figura 1. Condições do procedimento de digestão *in vitro*.



Resumidamente, as amostras de leite ou de iogurte (2 g) foram adicionadas de 20 mL de solução de pepsina 0,05 % em HCl 0,1 M e incubadas durante 2 h em banho a 37 °C com agitação magnética (fase gástrica). Ao término da incubação, as amostras foram resfriadas, o pH foi ajustado para 7,0 com solução de NaOH 5 %, foram adicionados 30 mL de extrato de bile 0,3 % em solução salina, e foram novamente incubadas a 37 °C com agitação magnética durante 30 minutos. As amostras foram resfriadas e adicionadas de 40 mL de pancreatina 0,4 % e lipase 0,066 % em solução salina, sendo levadas à terceira incubação 37 °C com agitação magnética por 2 horas. A fração micelar foi isolada da amostra digerida por centrifugação em centrífuga Avanti™ J-25 (BeckmanCoulter™, Brea, EUA) equipada com rotor Beckman modelo JA-25.50 (Kildare, Irlanda). O sobrenadante (fração micelar) foi coletado e utilizado para extração e quantificação de carotenoides totais. A bioacessibilidade da formulação à base de luteína também foi determinada, realizando a diluição da formulação em água para atingir a mesma concentração de luteína adicionada no leite e iogurte (10 µg/g).

#### 2.5. Determinação do teor de carotenoides da fração micelar

A fração micelar foi dividida em 6 tubos de 50 mL do tipo Falcon, sendo que cada tubo continha aproximadamente 15 mL de fração micelar. Em seguida, 15 mL de éter etílico foi adicionado em cada tubo, seguido de agitação em vortex durante 30 segundos. Foram adicionados 10 mL de solução aquosa de NaCl 10 % em cada tubo e agitou-se vagarosamente. Os tubos foram centrifugados a 3000 g

por 5 min para separação de fases. A fase orgânica foi coletada e os carotenoides foram novamente extraídos com éter etílico, desta vez sem adição de solução salina. Os extratos de todos os tubos foram combinados e o solvente foi totalmente evaporado em evaporador rotatório ( $T < 38\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). O extrato seco foi redissolvido em etanol e a absorvância foi medida a 445 nm (comprimento de onda de absorção máxima da luteína em etanol) em espectrofotômetro de arranjo de diodos HP-8452A (Hewlett Packard, Palo Alto, EUA), dotado de software UV-visible ChemStation versão A.02.05 (Hewlett Packard, Palo Alto, EUA) para aquisição e gestão dos dados. A concentração de carotenoides totais na fração micelar foi calculada de acordo com a lei de Lambert-Beer, empregando o valor de 2550 como o coeficiente de absorvância da luteína em etanol. Os resultados foram expressos como % de micelarização da luteína. Após leitura espectrofotométrica, o extrato foi novamente seco em evaporador rotatório, redissolvido em 400  $\mu\text{L}$  de tetraidrofurano/acetona (1:1), e acondicionado em vials para posterior análise cromatográfica. Os extratos foram mantidos à  $-37\text{ }^{\circ}\text{C}$  até o momento das análises. Todas as análises foram realizadas sob luz verde.

## 2.6. Análise de carotenoides por HPLC

A análise dos carotenoides da formulação de luteína, e das amostras submetidas à digestão *in vitro* foi realizada em HPLC Jasco (Easton, EUA), equipado com bomba quaternária (modelo PU-2089-plus), injetor automático (modelo AS-2055-plus) e detector de arranjo de diodos (MD-2010-plus), e os

dados foram adquiridos e manipulados no software Jasco ChromPass Chromatography Data System (versão 1.8.6.1). Os carotenoides foram separados em coluna Kromasil C<sub>18</sub> (250 x 4 mm, tamanho de partícula de 5 µm), empregando como fase móvel um gradiente linear de acetona/água na proporção de 75:25 (v/v), modificando para 95:5 em 5 min, e alcançando a proporção de 100:0 em 17 min, a qual foi mantida até 30 min. O fluxo empregado foi de 1,5 mL/min e a temperatura da coluna mantida em 29 °C. Os espectros de absorção UV-visível foram adquiridos entre 200 e 600 nm e os cromatogramas foram processados a 454 nm. A identificação dos carotenoides foi realizada a partir da ordem de eluição na coluna C<sub>18</sub> e das características do espectro UV-visível ( $\lambda_{\max}$ , estrutura fina espectral (% III/II), e intensidade do pico *cis* (% A<sub>B</sub>/A<sub>II</sub>)), em comparação a padrões e a dados disponíveis na literatura.<sup>22</sup>

## 2.7. Análise estatística

Os valores de bioacessibilidade do leite e do iogurte foram submetidos à análise de variância (ANOVA), e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, utilizando nível de significância de 5 %. As análises foram realizadas no software Statistica 8.0.<sup>23</sup>

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1. Bioacessibilidade *in vitro*

A estrutura do alimento e o seu teor de gordura estão entre os principais fatores que influenciam a bioacessibilidade dos carotenoides. A localização dos carotenoides na matriz alimentar e as interações com os demais componentes do alimento determinam a sua liberação da matriz. A presença de lipídios facilita a solubilização dos carotenoides nas gotículas de gordura da emulsão gástrica, além de estimular a liberação das secreções biliares e da lipase pancreática, favorecendo a formação das micelas no lúmen intestinal.<sup>24</sup> Na Figura 2 estão apresentados os índices de micelarização da luteína da formulação à base de luteína, do leite desnatado, semidesnatado e integral adicionados desta formulação, e dos iogurtes produzidos a partir destes leites. Segundo o fabricante, os teores de gordura do leite desnatado, semidesnatado e integral são de 0,1, 1,55 e 3,25 % (m/v), respectivamente (os valores dos leites em pó referem-se ao pó diluído em água, segundo as instruções do fabricante).

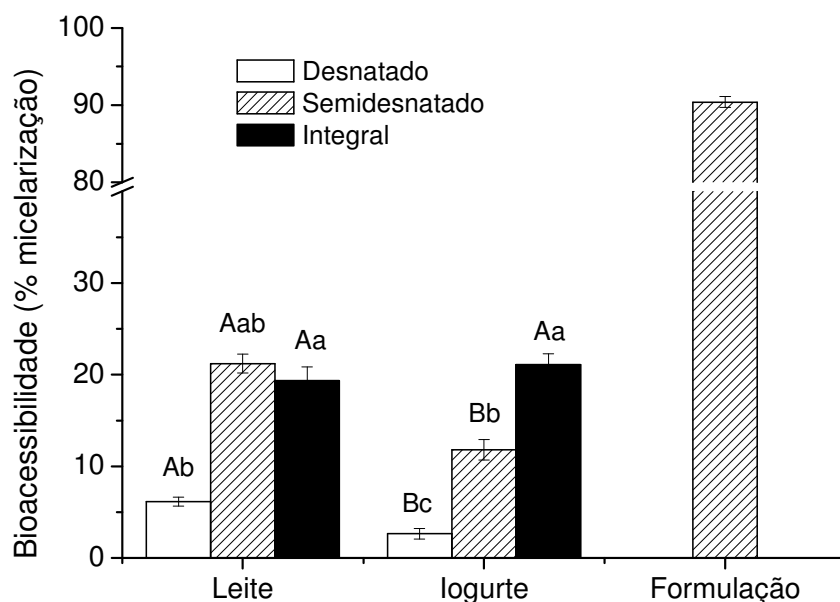


Figura 2. Bioacessibilidade de luteína (% micelarização) da formulação comercial de corante à base de luteína e de leite e iogurte com distintos teores de lipídios, adicionados com a formulação. Os dados são a média de 3 replicatas. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa ( $p=0,05$ ) entre os produtos com mesmo teor de gordura (desnatado, semidesnatado e integral). Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa ( $p=0,05$ ) dentro do mesmo produto, entre os diferentes teores de gordura.

Analisando separadamente cada produto, o leite desnatado mostrou um nível de micelarização significativamente inferior (6,2 %) que os demais, enquanto o leite semidesnatado e o integral não apresentaram diferença significativa entre si. Por estes resultados, supõe-se que existe uma concentração mínima requerida de lipídios para que ocorra a micelarização da luteína, e que, após atingida esta

concentração, um acréscimo no teor de lipídios não implicaria necessariamente no aumento da micelarização da luteína. De acordo com Colle e colaboradores,<sup>25</sup> pequenos teores de gordura são suficientes para assegurar a absorção dos carotenoides, mas a concentração necessária para que sejam alcançados níveis ótimos de bioacessibilidade ainda é desconhecida. Estes autores demonstraram que o tipo de lipídio presente no alimento é também um dos fatores que determina a quantidade de gordura necessária para a efetiva micelarização de licopeno de polpa de tomate. Os resultados revelaram que a adição de óleo de coco em concentrações de 0 a 10 % acarretou em um aumento progressivo na bioacessibilidade do licopeno. Em contrapartida, quando foram utilizados azeite de oliva e óleo de peixe, a fração de licopeno bioacessível atingiu seu valor máximo nos níveis de adição de 2 e 1 % respectivamente, e uma queda constante foi observada com o aumento do teor de lipídios até o nível de 10 %.<sup>25</sup> É provável que além do tipo de lipídio presente no alimento, a composição e a estrutura da matriz alimentícia também exerçam influência sobre a concentração de lipídios necessária para uma micelarização eficiente.

O iogurte não apresentou o mesmo comportamento que o leite, uma vez que os três iogurtes foram estatisticamente diferentes entre si quanto à bioacessibilidade. Para os iogurtes adicionados de luteína, quanto maior o teor de lipídios, maior foi a porcentagem de micelarização da luteína (2,6 % para iogurte desnatado, 11,8 % para semidesnatado e 21,1 % para o integral). Hornero-Méndez & Mínguez-Mosquera<sup>24</sup> também verificaram uma maior micelarização de carotenoides a partir de cenouras cruas e cozidas, quando adicionadas de 5 e 10

% de azeite de oliva, em comparação à cenoura sem adição de azeite. Em estudo realizado com salsichas tipo Frankfurt adicionadas de luteína em óleo de oliva, as salsichas com maior teor de gordura apresentaram taxas mais elevadas de micelarização da luteína.<sup>9</sup>

Avaliando os resultados de bioacessibilidade de acordo com o conteúdo de gordura do leite e do iogurte (desnatado, semidesnatado e integral), a bioacessibilidade da luteína a partir do iogurte foi significativamente menor que a do leite para as amostras desnatadas e semidesnatadas, e as amostras integrais não apresentaram diferenças. Isto leva a crer que, além do conteúdo lipídico da amostra, a complexidade da matriz, isto é, o modo como os componentes do alimento estão organizados e interagem entre si, também influenciou na bioacessibilidade da luteína. Este fato é evidenciado quando os níveis de micelarização da luteína do leite e do iogurte são comparados com o da formulação à base de luteína diluída em água na mesma concentração (10 µg/mL), que foi de cerca de 90 %. A formulação de luteína quando adicionada em uma matriz mais complexa (leite e iogurte) reduziu drasticamente o nível de micelarização da luteína. Ou seja, quanto maior a complexidade da matriz, menor a bioacessibilidade da luteína (ordem de micelarização: formulação > leite > iogurte). A influência da complexidade da matriz na bioacessibilidade de luteína já foi demonstrada pela comparação dos níveis de micelarização da luteína de um suplemento de luteína em cápsulas (luteína dispersa em óleo de milho), que foi próxima a 80 %, contrastando com 50 % de micelarização da luteína de purê de espinafre.<sup>26</sup>

Existem na literatura diversos estudos realizados a fim de determinar a bioacessibilidade de xantofilas presentes em alimentos, cujos resultados variam amplamente. Um valor de 37 % de micelarização de luteína foi verificado a partir de espinafre,<sup>16</sup> valor próximo ao encontrado para um preparado de vegetais cozidos contendo espinafre, cenoura e tomate (29 % de micelarização da luteína).<sup>21</sup> Em macarrão de trigo duro, a bioacessibilidade da luteína variou entre 63 e 78 %, enquanto que em macarrão com ovos variou entre 55 e 58 %.<sup>13</sup> Já para diferentes espécies de pimentas, a bioacessibilidade da luteína apresentou valores entre 36 e 106 %.<sup>27</sup> Apenas dois trabalhos avaliando a bioacessibilidade de luteína adicionada a um produto formulado foram encontrados na literatura até o presente momento.<sup>9,19</sup> Em um destes trabalhos a luteína extraída de microalgas e dispersa em óleo de oliva foi adicionada a salsichas do tipo Frankfurt, e valores entre 29 e 35 % de micelarização de luteína foram encontrados em salsichas com baixo teor de gordura (2,5 %) e entre 61 e 68 % para as salsichas com alto teor de gordura (15 %).<sup>9</sup> Os resultados de bioacessibilidade de luteína encontrados para os leites semidesnatado e integral e para o iogurte integral são próximos aos valores já relatados na literatura. O outro trabalho avaliou a bioacessibilidade *in vitro* de ésteres de luteína adicionados em leite fermentado, mas os autores não apresentaram os valores de micelarização da luteína após a digestão simulada, o que impossibilitou a comparação com os resultados obtidos no presente trabalho.<sup>19</sup>



### 3.2. Efeito da digestão no perfil de carotenoides.

O cromatograma dos carotenoides da formulação à base de luteína (Figura 3A) mostrou que esta xantofila encontra-se em sua forma esterificada. Este resultado era esperado, visto que a luteína presente na formulação é proveniente de flores de *Tagetes erecta* L., fonte onde mais de 90 % da luteína encontra-se em sua forma esterificada.<sup>28</sup> O perfil cromatográfico desta formulação de luteína já foi determinado em trabalho prévio de nosso grupo de pesquisa.<sup>29</sup>

A diferença de polaridade e consequente distinta organização de carotenos e xantofilas nas micelas mistas, confere às xantofilas maior bioacessibilidade do que aos carotenos. Enquanto as xantofilas situam-se de na superfície das micelas (na região de maior polaridade), os carotenos localizam-se no centro apolar, o que os torna menos acessíveis para absorção pelo epitélio intestinal. A esterificação das xantofilas diminui sua polaridade em comparação a sua forma livre, alterando sua localização na estrutura das micelas (da superfície para o interior), e consequentemente altera também sua bioacessibilidade. Entretanto, ésteres de carotenoides não são detectados no plasma humano e em tecidos periféricos, indicando que as xantofilas são provavelmente desesterificadas em alguma etapa da digestão.<sup>30,31</sup>

Após a digestão *in vitro* das amostras de leite e iogurte integral, houve uma diminuição na intensidade dos picos dos ésteres de luteína (de 90 % da área total para 14,5 %) e o aparecimento do pico da luteína livre (Figura 3B e 3C). Isto é, quase a totalidade dos ésteres de luteína presentes foram hidrolisados durante a digestão *in vitro*, e esta desesterificação deve ocorrer antes da absorção do

carotenoide pelo epitélio intestinal, já que o método aqui empregado avalia a bioacessibilidade somente até a etapa de micelarização. O mesmo perfil de carotenoides foi observado para leite e iogurte desnatados e semidesnatados após a digestão (dados não apresentados).

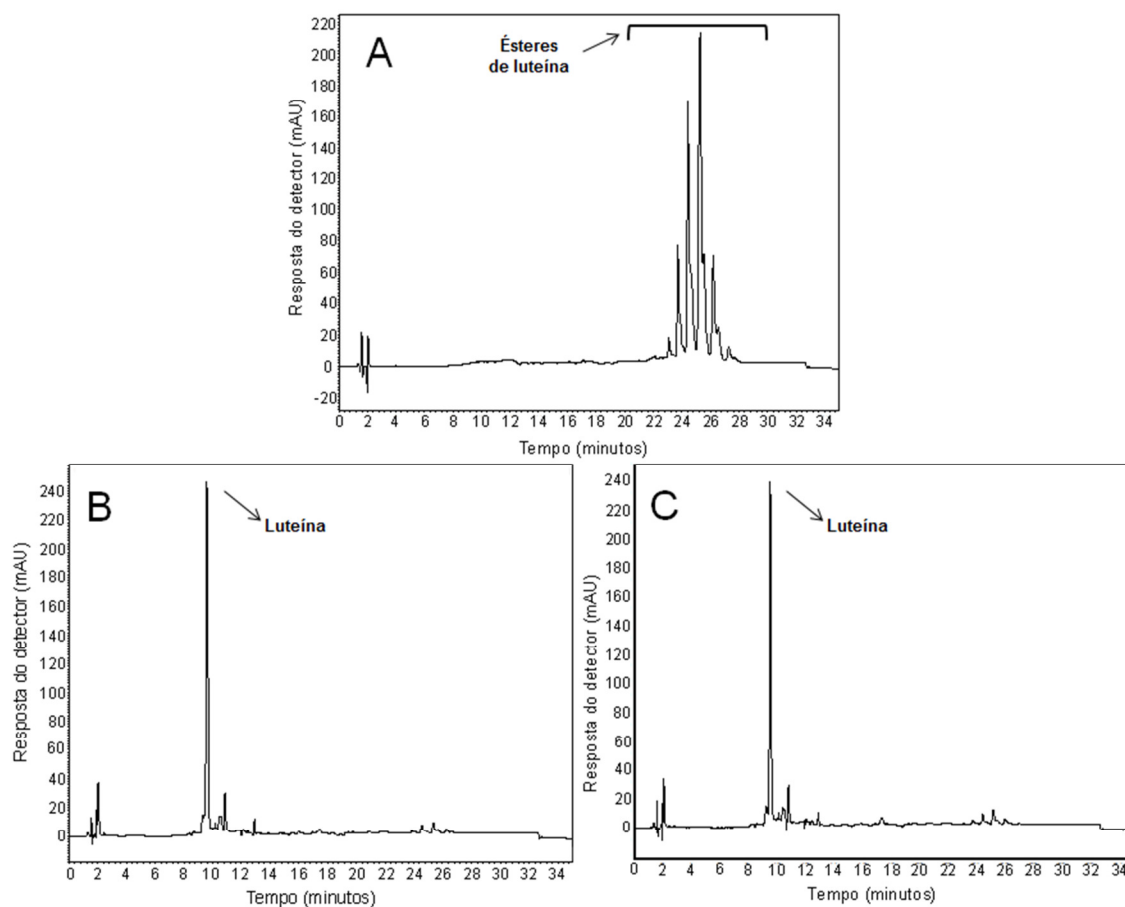


Figura 3. Perfil cromatográfico da formulação à base de luteína diluída em água (A), e das frações micelares obtidas após digestão *in vitro* de leite integral adicionado de formulação de luteína (B) e de iogurte integral adicionado de formulação de luteína (C).

A hidrólise de ésteres de xantofilas é geralmente atribuída à ação da enzima colesterol esterase (carboxil éster lipase), que é uma enzima lipolítica capaz de hidrolisar ésteres de colesterol, mono-, di- e tri-acilglicerois, fosfolipídios e lisofosfolipídios.<sup>32</sup> A taxa de hidrólise de di-ésteres de luteína de oleoresina de *Tagetes erecta* L. por lipase pancreática suína é inferior a 10 %, sendo que a enzima colesterol esterase foi considerada como principal responsável pela conversão dos ésteres de xantofilas a sua forma livre.<sup>33</sup> Não foram verificadas alterações significativas ( $p > 0,05$ ) nos níveis de zeaxantina livre e esterificada quando as enzimas pancreatina e lipase pancreática foram empregadas isoladamente para hidrólise do dipalmitato de zeaxantina.<sup>34</sup> Em contrapartida, a colesterol esterase, sozinha ou combinada com pancreatina e lipase pancreática, proporcionou um aumento progressivo de zeaxantina livre com o decorrer da incubação, alcançando valores de desesterificação próximos a 40 % após 3 h de incubação.<sup>34</sup>

Em contrapartida, os resultados obtidos no presente trabalho sugerem que a desesterificação dos ésteres de luteína foi realizada pela enzima lipase pancreática, que foi a principal enzima lipolítica utilizada no modelo de digestão *in vitro* empregado. A colesterol esterase é produzida pelo pâncreas e pelas glândulas mamárias de mamíferos superiores, e se estivesse presente no leite ou no iogurte poderia atuar na hidrólise dos ésteres.<sup>32</sup> Entretanto, é pouco provável que concentrações consideráveis desta enzima estivessem presentes no leite e no iogurte utilizados em nosso estudo, já que o processo de esterilização comercial do leite (UHT) inativaria a enzima.<sup>35</sup>

O método de digestão *in vitro* utilizado foi desenvolvido em sistema estático, sem a simulação dos movimentos gastrintestinais, e com concentrações fixas de enzimas e sais, o que não reproduz fielmente as condições fisiológicas encontradas *in vivo*. Desta forma, apesar dos resultados obtidos neste trabalho serem relevantes, devem ser interpretados como uma estimativa do que ocorre no organismo humano, já que existem diversos fatores que influenciam a bioacessibilidade de carotenoides e que não foram avaliados neste estudo.

O teor de gordura e a complexidade de matriz influenciaram a bioacessibilidade de luteína adicionada em leite e iogurte. Dos produtos adicionados de formulação de luteína, apenas aqueles com maior teor de gordura (leite semidesnatado e integral e iogurte integral) mostraram-se bons veículos para adição de luteína, de acordo com as condições empregadas para digestão *in vitro*. Estas matrizes apresentaram índices de bioacessibilidade semelhantes aos encontrados para alimentos que naturalmente são fontes de xantofilas.

As informações fornecidas por esta pesquisa poderão ser úteis no planejamento e desenvolvimento de novos produtos adicionados de luteína, a fim de garantir que, além de conferir cor ao alimento, a luteína também esteja disponível em concentrações razoáveis para utilização pelo organismo humano no ato de consumo do alimento.

## AGRADECIMENTOS

A autora Ana A. O. Xavier agradece à bolsa PDSE concedida pela CAPES.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) Holden, J.M.; Eldridge, A.L.; Beecher, G.R.; Buzzard, I.M.; Bhagwat, S.; Davis, C.S.; Douglass, L.W.; Gebhardt, S.; Haytowite, D.; Schakel, S. Carotenoid content of U.S. foods, an update of the database. *J. Food Comp. Anal.* **1999**, 12, 169-196.
- (2) Snodderly, D.M. Evidence for protection against age-related macular degeneration by carotenoids and antioxidant vitamins. *Am. J. Cli. Nutr.* **1995**, 62, 1448S-1461S
- (3) Alves-Rodrigues, A.; Shao, A. The Science behind lutein. *Toxicol. Lett.* **2004**, 150, 57-83.
- (4) Li, B.; Ahmed, F.; Bernstein, P.S. Studies on the singlet oxygen scavenging mechanism of human macular pigment. *Arch. Biochem. Biophys.* **2010**, 504, 56-60.
- (5) Landrum, J.T.; Bone, R.A.; Joa, H.; Kilburn, M.D.; Moore, L.L.; Sprague, K.E. A one year study of macular pigment: The effect of 140 days of a lutein supplement. *Exp. Eye Res.* **1997**, 65, 57-62.
- (6) Khachik, F.; Bernstein, P.S.; Garland, D.L. Identification of lutein and zeaxanthin oxidation products in human and monkey retinas. *Invest. Ophth. Vis. Sci.* **1997**, 38, 1802-1811.
- (7) Bhosale, P.; Serban, B.; Bernstein, P.S.; Retinal carotenoids can attenuate formation of A2E in the retinal pigment epithelium. *Arch. Biochem. Biophys.* **2009**, 483, 175-181.

- (8) Fernández-García, E.; Carvajal-Lérída, I.; Pérez-Gálvez, A. In vitro bioaccessibility assessment as a prediction tool of nutritional efficiency. *Nutr. Res.* **2009**, 29, 751-760.
- (9) Granado-Lorencio, F.; López-López, I.; Herrero-Barbudo, C.; Blanco-Navarro, I.; Cofrades, S.; Pérez-Sacristán, B.; Delgado-Pando, G.; Jiménez-Colmenero, F. Lutein-enriched frankfurter-type products: Physicochemical characteristics and lutein *in vitro* bioaccessibility. *Food Chem.* **2010**, 120, 741-748.
- (10) Herrero-Barbudo, C.; Olmedilla-Alonso, B.; Granado-Lorencio, F.; Blanco-Navarro, I. Bioavailability of vitamins A and E from whole and vitamin-fortified milks in control subjects. *Eur. J. Nutr.* **2006**, 45, 391–398.
- (11) Veda, S.; Kamath, A.; Platel, K.; Begum, K.; Srinivasan, K. Determination of bioaccessibility of  $\beta$ -carotene in vegetables by *in vitro* methods. *Mol. Nutr. Food Res.* **2006**, 50, 1047-1052.
- (12) Granado-Lorencio, F.; Olmedilla-Alonso, B.; Herrero-Barbudo, C.; Blanco-Navarro, I.; Pérez-Sacristán, B.; Blázquez-García, S. *In vitro* bioaccessibility of carotenoids and tocopherols from fruits and vegetables. *Food Chem.* **2007**, 102, 641-648.
- (13) Werner, S.; Böhm, V. Bioaccessibility of carotenoids and vitamin E from pasta: Evaluation of an *in vitro* digestion model. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, 59, 1163-1170.
- (14) Ekesa, B.; Poulaert, M.; Davey, M.W.; Kimiywe, J.; Van der Bergh, I.; Blomme, G.; Dhuique-Mayer, C. Bioaccessibility of provitamin A carotenoids in

bananas (*Musa* spp.) and derived dishes in African countries. *Food Chem.* **2012**, 133, 1471-1477.

(15) Stinco, C.M.; Fernández-Vázquez, R.; Escudero-Gilete, M.L.; Heredia F.J.; Meléndez-Martínez, A.J.; Vicario, I.M. Effect of orange juice's processing on the color, particle size, and bioaccessibility of carotenoids. *J. Agric. Food Chem.* **2012**, 60, 1447-1455.

(16) Reboul, E.; Richelle, M.; Perrot, E.; Desmoulins-Malezet, C.; Pirisi, V.; Borel, P. Bioaccessibility of carotenoids and vitamin E from their main dietary sources. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, 54, 8749-8755.

(17) Jones, S.T.; Aryana, K.J.; Losso, J.N. Storage stability of lutein during ripening of cheddar cheese. *J. Dairy Sci.* **2005**, 88, 1661-1670.

(18) Aryana, K. J.; Barnes, H. T.; Emmick, T. K.; McGrew, P.; Moser, B. Lutein is stable in strawberry yogurt and does not affect its characteristics. *J. Food Sci.* **2006**, 71, S467 –S472.

(19) Granado-Lorencio, F.; Herrero-Barbudo, C.; Olmedilla-Alonso, B.; Blanco-Navarro, I.; Pérez-Sacristán, B. Lutein bioavailability from lutein ester-fortified fermented milk: *in vivo* and *in vitro* study. *J. Nutr. Biochem.* **2010**, 21, 133-139.

(20) Fernández-García, E.; Rincón, F.; Pérez-Gálvez, A. Developing an emulsifier system to improve the bioaccessibility of carotenoids. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, 56, 10384-10390.

(21) Garrett, D.A.; Failla, M.L.; Sarama, R.J. Estimation of carotenoid bioavailability from fresh stir-fried vegetables using an *in vitro* digestion/caco-2 cell culture model. *J. Nutr. Biochem.* **2000**, 11, 574-580.

- (22) Davies, B.H. Carotenoids. In *Chemistry and biochemistry of plant pigments*, 2<sup>nd</sup> ed.; Goodwin, T.W., Ed.; Academic Press: London, England, **1976**; Vol. 2, pp. 38-165.
- (23) STATSOFT, Statistica (data analysis software system) version 8, 2007.
- (24) Hornero-Méndez, D.; Mínguez-Mosquera, I. Bioaccessibility of carotenes from carrots: Effect of cooking and addition of oil. *Innov. Food Sci. Emerg.* **2007**, *8*, 407-412.
- (25) Colle, I.J.P.; Van Buggenhout, S.; Lemmens, L.; Van Loey, A.M.; Hendrickx, M.E. The type and quantity of lipids present during digestion influence the *in vitro* bioaccessibility of lycopene from raw tomato pulp. *Food Res. Int.* **2012**, *45*, 250-255.
- (26) Chitchumroonchokchai, C.; Schwartz, S.J.; Failla, M.L. Assessment of lutein bioavailability from meals and a supplement using simulated digestion and caco-2 human intestinal cells. *J. Nutr.* **2004**, *134*, 2280-2286.
- (27) O'Sullivan, L.; Jiwan, M.A.; Daly, T.; O'Brien, N.M.; Aherne, S.A. Bioaccessibility, uptake, and transport of carotenoids from peppers (*Capsicum* spp.) using the coupled *in vitro* digestion and human intestinal caco-2 cell model. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 5374-5379.
- (28) Piccaglia, R.; Marotti, M.; Grandi, S. Lutein and lutein ester content in different types of *Tagetes patula* and *T. erecta*. *Ind. Crop Prod.* **1998**, *8*, 45-51.
- (29) Xavier, A.A.O.; Domingos, L.D.; Viotto, W.H.; Mercadante, A.Z. Desenvolvimento e validação de método espectrofotométrico para determinação



de corante à base de luteína adicionado em iogurte desnatado. Aceito para publicação, *Quim. Nova.* **2012**, QN 117/12.

(30) Wingerath, T.; Stahl, W.; Sies, H.  $\beta$ -cryptoxanthin selectively increases in human chylomicrons upon ingestion of tangerine concentrate rich in  $\beta$ -cryptoxanthin esters. *Arch. Biochem. Biophys.* **1995**, 324, 385-390.

(31) Pérez-Gálvez, A.; Mínguez-Mosquera, M.I. Esterification of xanthophylls and its effect on chemical behavior and bioavailability of carotenoid in the human. *Nutr. Res.* **2005**, 25, 631-640.

(32) Hui, D.Y.; Howles, P.N. Carboxylester lipase: structure-function relationship and physiological role in lipoprotein metabolism and atherosclerosis. *J. Lipid Res.* **2002**, 43, 2017-2030.

(33) Breithaupt, D.E.; Bamedi, A.; Wirt, U. Carotenol fatty acid esters: easy substrates for digestive enzymes? *Comp. Biochem. Phys. B.* **2002**, 132, 721-728.

(34) Chitchumroonchokchai, C. & Failla, M.L. Hydrolysis of zeaxanthin esters by carboxylester lipase during digestion facilitates micellarization and uptake of the xanthophyll by caco-2 human intestinal cells. *J. Nutr.* **2005**, 136, 588-594.

(35) Nilsson, J.; Bläckberg, L.; Carlsson, P.; Enerbäck, S.; Hernell, O.; Bjurssel. cDNA cloning of human-milk bile-salt stimulated lipase and evidence for its identity to pancreatic carboxylic ester hydrolase. *Eur. J. Biochem.* **1990**, 192, 543-550.



## CONCLUSÃO GERAL

Os novos métodos desenvolvidos para a extração e a quantificação de carotenoides totais de iogurte desnatado e de queijo Prato adicionados de corante à base de luteína foram validados com sucesso. Os métodos fornecem resultados confiáveis, são de baixo custo e de fácil execução, e constituem uma ferramenta útil para a avaliação da estabilidade de corante luteína adicionado ao iogurte e ao queijo Prato.

Neste estudo foi verificado que, nas concentrações adicionadas, a luteína mantém-se estável em iogurte desnatado (10 µg/g) e queijo Prato (0,7 mg/g), durante o tempo médio de vida de prateleira destes produtos, que é de 30 dias para o iogurte e 60 dias para o queijo. A presença de luz durante a estocagem refrigerada não afetou os níveis de luteína, atestando que não ocorreu fotodegradação do carotenoide em ambos os produtos. Além disso, o tipo de embalagem utilizada para o queijo Prato também não influenciou na estabilidade da luteína.

Os resultados da digestão *in vitro* do leite e do iogurte, ambos adicionados com corante luteína, permitem afirmar que há influência da matriz e do teor de lipídios na bioacessibilidade da luteína adicionada a estes alimentos. O leite semidesnatado e o integral, juntamente com o iogurte integral, todos adicionados com corante luteína apresentam índices de bioacessibilidade de luteína semelhantes aos encontrados para alimentos que naturalmente contém luteína em sua composição, ou para alimentos formulados com adição de luteína.

A luteína adicionada ao iogurte desnatado, apesar de se manter estável durante o armazenamento, não apresenta elevado índice de bioacessibilidade, o que do ponto de vista nutricional, não faz deste produto um bom veículo para adição de luteína. Por outro lado, os valores de bioacessibilidade encontrados para o iogurte integral indicam o potencial deste produto para adição deste carotenoide.

Devido à comprovada influência do teor de gordura na bioacessibilidade da luteína adicionada em produtos lácteos, é possível que o queijo Prato, por ser um queijo de elevado conteúdo lipídico (45 a 59,9 % de gordura no extrato seco), também possa ser um veículo eficiente para a adição de luteína. Neste caso, a luteína além de atuar como um ingrediente funcional devido às alegações a ela atribuídas, também poderia vir a substituir o corante urucum que é comumente usado para coloração deste tipo de queijo, haja vista sua estabilidade durante o armazenamento.