

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS

**ESTUDOS DE PURIFICAÇÃO, ESTABILIDADE OXIDATIVA,
ENCAPSULAMENTO E APLICAÇÃO DO LICOPENO COMO
PROTETOR DA DEGRADAÇÃO DE VITAMINAS EM LEITE**

Itaciara Larroza Nunes

Nutricionista

Mestre em Engenharia de Alimentos/ Sub-área Ciência de Alimentos

Profa. Dra. Adriana Zerlotti Mercadante

Orientadora

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de Doutor em Ciência de Alimentos.

2005

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA F.E.A. – UNICAMP

N922e Nunes, Itaciara Larroza
Estudos de purificação, estabilidade oxidativa,
encapsulamento e aplicação do licopeno como protetor da
degradação de vitaminas em leite / Itaciara Larroza Nunes. –
Campinas, SP: [s.n.], 2005.

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

1. Licopeno. 2. Purificação. 3. Encapsulamento. 4.
Foto-oxidação sensibilizada. 5. Foto-degradação. I.
Mercadante, Adriana Zerlotti. II. Universidade Estadual de
Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

(cars/fea)

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Adriana Zerlotti Mercadante
(Orientadora)

Prof. Dr. Carlos Raimundo Ferreira Grosso
(Membro)

Profa. Dra. Célia Maria de Sylos
(Membro)

Profa. Dra. Florinda Orsatti Bobbio
(Membro)

Profa. Dra. Neura Bragagnolo
(Membro)

Profa. Dra. Úrsula Maria Lanfer Marquez
(Membro)

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Adriana Z. Mercadante pela orientação incansável e dedicação a este trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Química de Alimentos pela amizade, apoio e companhia em todos os dias que passamos juntos no decorrer deste longo período.

Às professoras Florinda O. Bobbio e Neura Bragagnolo pelo apoio, convívio e amizade.

Ao Prof. Dr. Cláudio Borsarelli pelo auxílio na análise dos dados.

Ao Prof. Dr. Vivaldo Silveira Júnior por ceder a câmara de refrigeração para realização dos experimentos de estabilidade das vitaminas.

Aos funcionários do Departamento de Ciência de Alimentos pelo auxílio.

À FAPESP pela bolsa de doutorado e apoio financeiro em um projeto de pesquisa.

À DSM Nutritional Products (Basel, Suíça) pela doação dos padrões e suporte financeiro.

À banca examinadora, pelas correções e sugestões.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Índice

ÍNDICE DE TABELAS	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	xi
RESUMO GERAL	01
SUMMARY	04
INTRODUÇÃO GERAL	07
OBJETIVOS	10

CAPÍTULO 1

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. Obtenção de padrões de carotenóides	12
2. Encapsulamento de carotenóides	13
2.1. "Spray-dryer"	13
2.2. Ciclodextrinas	16
3. Separação de isômeros de carotenóides por CLAE	18
4. Efeito da luz na estabilidade de carotenóides	23
4.1. Foto-oxidação sensibilizada	23
4.2. Foto-degradação	27
4.3. Reações induzidas pela riboflavina em leite	30
5. Referências bibliográficas	33

CAPÍTULO 2

OBTENÇÃO DE CRISTAIS DE LICOPENO A PARTIR DE DESCARTE DE TOMATE

Resumo	40
Summary	40
1. Introdução	40
2. Material e Métodos	41
2.1. Amostras	41
2.2. Medidas físico-químicas	41
2.3. Obtenção do extrato rico em licopeno	41
2.3.1. Retirada de água	41
2.3.2. Extração de licopeno	41
2.4. Purificação do extrato rico em licopeno	42

2.5. Análise de carotenóides por CLAE	42
2.6. Análises microscópicas	42
2.6.1. Microscopia óptica	42
2.6.2. Microscopia eletrônica de varredura	42
2.7. Análise estatística	42
3. Resultados e Discussão	42
3.1. Condições otimizadas para obtenção do extrato rico em licopeno	42
3.2. Cristais de licopeno	44
3.3. Teores de licopeno em descarte de tomate	45
4. Conclusões	46
5. Referências Bibliográficas	46
6. Agradecimentos	47

CAPÍTULO 3

VANTAGENS E DESVANTAGENS DA SEPARAÇÃO DE CAROTENÓIDES POR CLAE EM COLUNAS C₁₈ E C₃₀

Resumo	49
Introdução	49
Material e Métodos	51
Reagentes	51
Preparação e isomerização do licopeno	51
Análise por CLAE	52
Resultados e Discussão	54
Isômeros de licopeno	54
Luteína e zeaxantina	57
Conclusão	58
Abstract	59
Agradecimentos	59
Referências Bibliográficas	60

CAPÍTULO 4

PHOTOSENSITIZED OXIDATION OF LYCOPENE

Abstract	64
Introduction	65

Materials and methods	66
Lycopene preparation	66
Photosensitized oxidation	66
Instrumentation	66
Results and Discussion	67
Literature Cited	78
Acknowledgments	80

CAPÍTULO 5

ENCAPSULAMENTO DE LICOPENO POR “SPRAY-DRYER” E INCLUSÃO MOLECULAR

Resumo	82
Introdução	83
Material e métodos	85
Obtenção dos cristais de licopeno	85
Encapsulamento do licopeno por “spray-dryer”	85
Complexação com β -ciclodextrina	86
Determinação do licopeno	86
Microscopia eletrônica de varredura.....	87
Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	87
Resultados e Discussão	88
Encapsulamento por “spray-dryer”	88
Formação do complexo licopeno- β -CD	89
Micrografias	90
Pureza do licopeno antes e após o encapsulamento e a inclusão.....	91
Agradecimentos	93
Referências Bibliográficas	94

CAPÍTULO 6

EFEITO PROTETOR DE LICOPENO ENCAPSULADO NA DEGRADAÇÃO DE VITAMINAS A E D EM LEITE

Resumo	98
Introdução	99

Material e métodos	100
Obtenção do licopeno	100
Encapsulamento do licopeno	100
Extração do licopeno	101
Preparo das amostras de leite	101
Extração das vitaminas do leite	101
Estabilidade	101
Cromatografia Líquida de alta eficiência (CLAE)	102
Análise dos dados	102
Resultados e Discussão	102
Referências Bibliográficas	109
Agradecimentos	111
CONCLUSÃO GERAL	112

Índice de Tabelas

CAPÍTULO 1

Tabela 1. Condições cromatográficas para separação de all- <i>trans</i> -licopeno e seus isômeros <i>cis</i>	20
Tabela 2. Condições cromatográficas para separação de luteína e zeaxantina	22
Tabela 3. Constantes de desativação química (k_r), física (k_q) e total (k_t) para licopeno...	25
Tabela 4. Constantes de desativação total (k_t) de $O_2(^1\Delta_g)$ por compostos biológicos, em diferentes solventes	32

CAPÍTULO 2

Tabela 1. Fatores e níveis estudados na etapa de extração de licopeno	41
Tabela 2. Condições experimentais do planejamento fatorial completo e respostas para a etapa de retirada de água	42
Tabela 3. Efeitos dos fatores na etapa de retirada de água do tomate.....	43
Tabela 4. Condições experimentais dos planejamentos fatoriais fracionários e respostas para a etapa de extração de carotenóides com etanol e acetato de etila	43
Tabela 5. Efeitos dos fatores para a etapa de avaliação das condições de extração de carotenóides utilizando acetato de etila ou etanol	43
Tabela 6. Condições experimentais do planejamento fatorial completo e respostas para a etapa de otimização da extração de carotenóides com acetato de etila	43
Tabela 7. Principais características, obtidas por CLAE, dos carotenóides presentes no extrato rico em licopeno e nos cristais de licopeno	44
Tabela 8. Teores de licopeno ($\mu\text{g/g}$) e parâmetros Cielab de cor dos tomates esterilizados coletados em diferentes épocas do ano	46

CAPÍTULO 3

Tabela 1. Condições testadas com coluna C_{30} em CLAE para separação de isômeros de licopeno	52
Tabela 2. Condições testadas com coluna C_{18} em CLAE para separação de isômeros de licopeno	53

CAPÍTULO 4

Tabela 1. Characteristics of the compounds formed upon photosensitized oxidation of lycopene 70

Tabela 2. Observed first-order rate constant, k_{obs} , for the degradation of all-*trans*-lycopene in DCM/MeOH solutions irradiated with light above 625 nm 75

CAPÍTULO 6

Tabela 1. Constantes de velocidade de pseudo-primeira ordem e energias de ativação para degradação foto-sensibilizada de vitaminas A e D₃ 105

Tabela 2. Constantes de velocidade de pseudo-primeira ordem para a degradação foto-sensibilizada das vitaminas A e D₃ a 8 °C, em presença e ausência de licopeno encapsulado 106

Índice de Figuras

CAPÍTULO 2

- Figura 1. Curva de nível para concentração de carotenóides totais ($\mu\text{g/g}$), em função do número de extrações e tempo de extração 44
- Figura 2. Cromatograma obtido por CLAE do extrato rico em licopeno 44
- Figura 3. Cromatograma obtido por CLAE dos cristais de licopeno após: a- 1^a cristalização, b- 2^a cristalização 44
- Figura 4. Microscopia óptica: a) cristais de licopeno natural sob luz polarizada, b) cristais de licopeno sintético sob luz polarizada. Microscopia eletrônica de varredura: c) cristais de licopeno natural, d) cristais de licopeno sintético 45

CAPÍTULO 3

- Figura 1. Espectros, obtidos por CLAE-DAD em MeOH (0,1%TEA)/TBME (50:50), dos padrões de 5-*cis*-, 9-*cis*-, 13-*cis*- e all-*trans*-licopeno 54
- Figura 2. Cromatogramas, obtidos por CLAE, de licopeno isomerizado, a- 1^a injeção, b- injeção após 20 min de acondicionamento, c- injeção após 30 min de acondicionamento..... 55
- Figura 3. Cromatogramas, obtidos por CLAE, da mistura dos padrões de 5-*cis*-, 9-*cis*-, 13-*cis*- e all-*trans*-licopeno 56
- Figura 4. Espectros, obtidos por CLAE-DAD em MeOH (0,1%TEA)/TBME (95:5), dos padrões de all-*trans*-luteína e all-*trans*-zeaxantina 57
- Figura 5. Cromatogramas, obtidos por CLAE, da mistura dos padrões de luteína e zeaxantina..... 58

CAPÍTULO 4

- Figura 1. HPLC-PDAD chromatogram of freshly prepared lycopene with MB in dichloromethane/methanol (1:1) solution 68
- Figura 2. HPLC-PDAD chromatograms of 30 $\mu\text{g/mL}$ lycopene crystals in DCM/MeOH (1:1) solutions at 20 °C, observed after different illumination times with filtered light above 625 nm..... 69
- Figura 3. UV-vis absorption spectra of some of the HPLC peaks obtained with PDA in linear gradient of MeOH (0.1% TEA)/EtOAc/H₂O from 80:10:10 to 70:30:0 in 20 min at 1 mL/min..... 69

Figura 4. Kinetic curves for the degradation of all- <i>trans</i> -lycopene in photosensitized DCM/MeOH (1:1) experiments under several experimental conditions: (●) 2 µg/mL MB + 18 µg/mL Lyc + air at 20°C; (○) 2 µg/mL MB + 30 µg/mL Lyc + air at 20 °C; (□) 2 µg/mL MB + 30 µg/mL Lyc + N ₂ at 20 °C; (■) No MB + 30 µg/mL Lyc + air at 20 °C; (▲) 2 µg/mL MB + 30 µg/mL Lyc + air at 15 °C; (△) 2 µg/mL MB + 30 µg/mL Lyc + air at 10 °C	74
Figura 5. Kinetics curves for the apo-6'-lycopenal and lycopene 1,2-epoxide in photosensitized experiment DCM/MeOH (1:1) with 2 µg/mL MB + 30 µg/mL Lyc + air at 20 °C	76

CAPÍTULO 5

Figura 1. Micrografia eletrônica: a - micro-cápsulas goma arábica + sacarose, b - micro-cápsulas goma arábica + sacarose + licopeno (aumento de 2500 x), c -β-CD livre, d - complexo licopeno-β-CD (aumento de 1400 x).....	90
Figura 2. Cromatogramas obtidos por CLAE: a - licopeno utilizado para encapsulamento por spray-dryer, b - licopeno após o encapsulamento	91
Figura 3. Cromatogramas obtidos por CLAE: a - licopeno utilizado para preparo do complexo, b - licopeno após a obtenção do complexo na forma de pó	92

CAPÍTULO 6

Figura 1. Cromatogramas, obtidos por CLAE, dos extratos de leite: (A) processamento a 265 nm, (B) processamento a 324 nm e (C) em diferentes tempos de exposição à luz a 8 °C	103
Figura 2. Espectros de absorção normalizados de riboflavina, vitaminas A e D ₃ em etanol, e espectro de emissão normalizado da lâmpada fluorescente	103
Figura 3. Curvas cinéticas a 8°C: (A) vitamina A, (B) vitamina D ₃ e (C) licopeno encapsulado.....	104
Figura 4. Perfis cinéticos obtidos através das áreas dos picos, por CLAE, para vitamina D ₃ , durante a iluminação das amostras de leite a 8 °C	106
Figura 5. Espectros de absorção em água de riboflavina e licopeno	108

RESUMO GERAL

Na primeira etapa deste trabalho foi desenvolvido e otimizado um método, através de planejamento experimental fatorial, para a obtenção de licopeno a partir de descarte de tomate. Foi necessária uma etapa preliminar para retirada de água do tomate, a qual consistiu de 4 extrações de 30 minutos cada uma com 30 mL de etanol comercial, seguido de descarte do solvente. Os carotenóides foram extraídos durante 120 minutos com acetato de etila (relação massa/volume 1:0,7) sob agitação a 150 rpm à temperatura ambiente, sendo necessário 4 extrações para obtenção de maior concentração de carotenóides totais.

Este método foi utilizado para obtenção de extrato rico em licopeno a partir de 6 lotes de descarte de tomate, coletados na CEASA-Campinas no período de junho de 2002 a março de 2003. O teor de carotenóides médio, calculado como licopeno, foi de $59,2 \pm 21,8$ $\mu\text{g/g}$ de descarte de tomate. Através da avaliação de cor (escala CIELAB) foi verificado que o parâmetro a^* foi o que mostrou melhor correlação (0,86) com a concentração de licopeno das amostras de descarte de tomate.

O extrato de carotenóides rico em licopeno foi submetido a duas cristalizações sucessivas com diclorometano/etanol (1:4). A morfologia dos cristais obtidos no presente estudo e dos cristais sintéticos da DSM Nutritional Products foi avaliada por microscopia óptica polarizada e microscopia eletrônica de varredura. Ambos cristais apresentaram formas irregulares, prismáticas e alongadas. Análise por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD) em coluna C_{30} polimérica ($3\mu\text{m}$, $250 \times 4,6$ mm) mostrou que a pureza do all-*trans*-licopeno dos cristais obtidos de tomate foi de 98%, devido à presença de 5-*cis*, 5,5'-*dicis* e 13-*cis*-licopeno.

Na etapa seguinte, foi avaliada a separação de isômeros geométricos de licopeno em cristais isomerizados termicamente e em cristais sintéticos, e de padrões sintéticos de luteína e zeaxantina, por (CLAE), utilizando colunas C_{18} (monomérica, $4\mu\text{m}$, $300 \times 3,9$ mm) e C_{30} (polimérica, $3\mu\text{m}$, $250 \times 4,6$ mm) e diferentes fases móveis com eluição isocrática e gradiente. As melhores condições cromatográficas foram obtidas em coluna C_{30} com temperatura de 33°C , eluição isocrática a 1 mL/min e fase móvel com metanol (0,1% trietilamina)/éter *tert*-metil butílico (1:1) para separar isômeros de licopeno e (95:5) para separar luteína e zeaxantina na linha de base.

A oxidação foto-sensitizada de licopeno natural com azul de metileno (MB) como sensibilizador foi avaliada em sistemas-modelo orgânicos, sob diferentes temperaturas (10,

15 e 20°C) e atmosferas (ar e nitrogênio). Através da análise por CLAE-DAD-espectrometria de massas (EM) foram identificados quatro tipos de produtos, todos derivados do licopeno: apo-carotenóides, compostos adicionados de uma ou duas moléculas com 32 unidades de massa, epóxidos e isômeros geométricos de licopeno. Em todos os sistemas o consumo do all-*trans*-licopeno seguiu um modelo cinético de primeira ordem. Na presença de MB e ar, o consumo de licopeno decaiu com o aumento da concentração inicial do pigmento. Na presença de antioxidante os produtos de degradação formados foram os mesmos, por outro lado, em soluções saturadas de N₂ com MB e sob condições de iluminação idênticas, foi observada menor degradação do all-*trans*-licopeno, e os produtos de oxidação apo-6'-licopenal e epóxidos foram formados apenas em quantidades traço. Na ausência de azul de metileno houve acréscimo apenas do 13-*cis*-licopeno.

Técnicas de encapsulamento de licopeno por “spray-dryer” utilizando goma arábica (GA)/sacarose como material de parede e inclusão com β-ciclodextrina (β-CD) também foram avaliadas. O processo de encapsulamento atingiu rendimento de $51 \pm 1\%$ e eficiência de $95 \pm 1\%$. As micro-cápsulas apresentaram superfícies indentedas e formas irregulares, típicas de cápsulas de GA, porém sem falhas ou aberturas na superfície. A pureza do licopeno (% área do all-*trans*-licopeno) obtida por CLAE-DAD em coluna C₃₀ foi de 96,4% antes e de 98,1% após o encapsulamento por “spray-dryer”, devido à redução das áreas do 9-*cis*-, 13-*cis* e 1,2-epóxi-licopeno.

A formação do complexo por inclusão de licopeno-β-CD ocorreu apenas quando utilizada razão molar de 1:4 e o pó obtido por liofilização apresentou coloração rósea. O licopeno não complexado ficou em torno de 50%. O pó de licopeno-β-CD apresentou estruturas volumosas, bem definidas e similares às observadas na β-CD livre liofilizada. O licopeno apresentou pureza de 97,7% antes e de 91,3% após a obtenção do pó, devido ao aumento na área do pico correspondente aos isômeros 13-*cis* + 15-*cis*-licopeno.

Na última etapa deste estudo foi avaliado o efeito da adição de licopeno encapsulado para prevenir a degradação das vitaminas A e D em leite exposto à luz. Amostras de leite desnatado comercialmente fortificadas com 4,3 µg/mL de vitamina D₃ e 0,6 µg/mL de vitamina A foram expostas à luz fluorescente ($\cong 8000$ lux) ou mantidas no escuro a $8 \pm 1^\circ\text{C}$ e $21 \pm 2^\circ\text{C}$, na presença de ar. Ambas vitaminas mostraram-se estáveis no escuro, enquanto sob luz a velocidade de degradação da vitamina A foi maior ($k_{\text{obs}} 8^\circ\text{C} = 0,24 \text{ h}^{-1}$) do que da vitamina D₃ ($k_{\text{obs}} 8^\circ\text{C} = 0,02 \text{ h}^{-1}$), sendo os dados ajustados a um modelo cinético de primeira ordem. Licopeno encapsulado (ca. 2µM), obtido como descrito

acima, disperso em solução aquosa contendo 0,5% de sorbato de potássio, e exposto à luz a 8°C apresentou $k_{obs} = 0,03 \text{ h}^{-1}$, também seguindo um modelo cinético de primeira ordem. A adição de licopeno encapsulado (ca. 2 μM) aumentou cerca de 1,8 vezes a estabilidade das vitaminas. Entretanto, devido ao fato de que a fração de moléculas de vitamina protegidas ($f_{vit} \approx 0,46$) foi maior do que o valor da fração de oxigênio singlete desativada pelo licopeno (f_{Δ}) e como o mesmo absorve luz na mesma região que a riboflavina, pode-se concluir que o licopeno atua combinadamente como antioxidante e filtro de luz, desativando oxigênio singlete e inibindo a formação de riboflavina no estado triplete excitado.

SUMMARY

In the first part of this thesis, a method to obtain lycopene from tomato waste was developed and optimized using a factorial experimental design. In order to remove water, a preliminary step was necessary and consisted of four 30-minute extractions, each with 30 mL commercial ethanol, followed by discard of the solvent. The carotenoids were extracted during 120 minutes with ethyl acetate (mass/volume ratio of 1:0.7) by stirring at 150 rpm at room temperature, being 4 extractions necessary to obtain high carotenoid concentration.

This method was applied to produce carotenoid extract rich in lycopene from 6 batches of tomato waste, collected at CEASA-Campinas during June 2002 to March 2003. The average carotenoid content found, calculated as lycopene, was $59.2 \pm 21.8 \mu\text{g/g}$ of tomato waste. Colour evaluation (CIELAB scale) was carried out and the parameter a^* showed the best correlation (0.86) with lycopene concentration in the tomato waste samples.

The carotenoid extract rich in lycopene was submitted to two consecutive crystallizations from dichloromethane/ethanol (1:4). The morphology of the lycopene crystals obtained in the present study and the synthetic crystals from DSM Nutritional Products was evaluated by polarized optical microscopy and scanning electronic microscopy. Both crystals showed irregular, elongated and prismatic forms. Analysis by high-performance liquid chromatography-diode array detector (HPLC-PDA) on a polymeric C_{30} column ($3\mu\text{m}$, $250 \times 4.6 \text{ mm}$) showed that the purity of the all-*trans*-lycopene crystals obtained from tomato was 98%, due to the presence of 5-*cis*, 5-,5'-*dicis* and 13-*cis*-lycopene.

In the next step, the separation of geometric isomers of lycopene crystals thermically isomerized and in synthetic crystals, and of synthetic standards of lutein and zeaxanthin, was evaluated by HPLC on C_{18} (monomeric, $4\mu\text{m}$, $300 \times 3.9\text{mm}$) and C_{30} (polymeric, $3\mu\text{m}$, $250 \times 4.6 \text{ mm}$) columns using different mobile phases in isocratic or gradient elution modes. The best chromatographic conditions were obtained with the C_{30} column operating at 33°C , isocratic elution at 1 mL/min of methanol (0.1% triethylamine)/*tert*-butyl methyl ether at 1:1 ratio to separate lycopene isomers and at 95:5 to achieve baseline separation of lutein and zeaxanthin.

The photosensitized oxidation of natural lycopene with methylene blue (MB) as sensitizer was evaluated in organic solvents, under different temperatures (10, 15 and 20°C) and atmosphere (air and nitrogen). The HPLC-PDA-mass spectrometric (MS)

analysis allowed the identification of four types of products, all derived from lycopene: apo-carotenals, compounds with one and two 32 mass units incorporated, epoxides and geometric isomers. In all systems the consumption of all-*trans*-lycopene followed a first-order reaction kinetic model. In the presence of the MB and air, the rate for the lycopene consumption decreased with the increased initial carotene concentration. In the presence of a radical scavenger identical degradation products were observed, on the other hand, in N₂-saturated solutions with MB and under identical illumination conditions, a slower photosensitized degradation of all-*trans*-lycopene was observed, and the oxidation products apo-6'-carotenal and epoxides were formed only in trace amounts. In the absence of MB solely 13-*cis*-lycopene increased.

Techniques of lycopene encapsulation by spray-dryer with gum arabic (GA)/sucrose as wall material and inclusion with β -cyclodextrin (β -CD) were carried out. The encapsulation process showed yield of $51 \pm 1\%$ and efficiency of $95 \pm 1\%$. The microcapsules presented superficial indentations and an irregular form, typical of GA capsules, as well as lack of cracks and breakages. The lycopene purity (% all-*trans*-lycopene area), obtained by HPLC-PDA on C₃₀ column, was found to be 96.4% before and 98.1% after the spray-drier encapsulation, due to reduction of the areas from 9-*cis*-, 13-*cis*- and 1,2-epoxy-lycopene.

The formation of the inclusion complex of lycopene- β -CD occurred only with the use of a 1:4 molar ratio, and the powder obtained by freeze-drying presented a light pink colour. The lycopene not included remained as 50%. The lycopene- β -CD powder presented well defined bulky structures similar to those observed for free freeze-dried β -CD. The lycopene purity (% all-*trans*-lycopene area) showed to be 97.7% before and 91.3% after the production of the powder, due to the increased peak area corresponded to 13-*cis* + 15-*cis* isomers of lycopene.

In the last part of this study, the effect of added encapsulated lycopene to prevent vitamins A and D degradation in milk exposed to light was evaluated. Samples of skimmed milk commercially fortified with 4.3 $\mu\text{g/mL}$ vitamin D₃ and 0.6 $\mu\text{g/mL}$ vitamin A were exposed to fluorescent light ($\cong 8000$ lux) or stored in the dark at $8 \pm 1^\circ\text{C}$ and $21 \pm 2^\circ\text{C}$, in the presence of air. Both vitamins were found to be stable in dark conditions, whereas under light the first-order degradation rate of vitamin A was higher ($k_{\text{obs}} 8^\circ\text{C} = 0.24 \text{ h}^{-1}$) than that of vitamin D₃ ($k_{\text{obs}} 8^\circ\text{C} = 0.02 \text{ h}^{-1}$). Encapsulated lycopene (ca. 2 μM), obtained as described above, dispersed in water containing 0.5% potassium sorbate and exposed to light at 8°C, showed $k_{\text{obs}} = 0.03 \text{ h}^{-1}$, also calculated by a first-order kinetic model. The addition of

encapsulated lycopene (ca. 2 μ M) increased the vitamins stability in 1.8 times. In fact, since the fraction of protected vitamin molecules ($f_{vit} \approx 0.46$) was higher than the fraction of singlet oxygen deactivated (f_{Δ}) by lycopene, and as lycopene absorbs light in the same region as riboflavin, the lycopene showed a combined action as antioxidant and light filter, with both inhibition the formation of the reactive triplet excited state of riboflavin and quenching singlet oxygen.

INTRODUÇÃO GERAL

Os carotenóides são um dos maiores grupos de pigmentos naturais encontrados em frutas, raízes, flores, peixes, crustáceos, invertebrados, pássaros e microrganismos, e apresentam cores que variam do amarelo ao vermelho. Até o momento mais de 600 carotenóides já foram encontrados na Natureza (Mercadante & Egeland, 2004). Os carotenóides têm sido largamente utilizados como corantes em alimentos, bebidas, cosméticos e rações animais, tanto na forma de extratos naturais como sintéticos idênticos ao natural. As indústrias de alimentos e farmacêutica vêm buscando substituir os corantes sintéticos por naturais devido ao maior apelo do produto natural.

Alguns carotenóides apresentam importante função nutricional na dieta de humanos como precursores da vitamina A, a qual é essencial para a visão, diferenciação das células, desenvolvimento embriológico e outros processos fisiológicos. O interesse por estes pigmentos tem aumentado muito nos últimos anos devido à descoberta de outras propriedades biológicas envolvendo sua atividade antioxidante, através do seqüestro e extinção de radicais livres, reduzindo o risco do desenvolvimento de doenças degenerativas como o câncer, doenças cardiovasculares, imunodeficiências, degeneração macular e formação de cataratas (Krinsky, 1994, Van den Berg *et al.*, 2000).

O consumo de alimentos ricos em licopeno, como tomate e seus produtos, bem como altas concentrações do mesmo no sangue têm sido associados ao menor risco de desenvolvimento de câncer de próstata (Giovanucci, 2002, Venkateswaran *et al.*, 2004). Um dos mecanismos propostos para esta ação é a desativação de oxigênio singlete, já que o licopeno é conhecido como o mais eficiente desativador do mesmo em estudos realizados *in vitro* (Di Mascio *et al.*, 1989, Edge *et al.*, 1997).

A interação entre a luz, oxigênio e compostos denominados sensibilizadores, tais como riboflavina presente em leite (Aurand *et al.*, 1977) e clorofila em óleos vegetais (Lee & Min, 1990), causa foto-oxidação em alimentos, através da produção de radicais livres e oxigênio singlete que podem oxidar os constituintes dos alimentos, tais como ácidos graxos insaturados, vitaminas, proteínas e aminoácidos. Além da perda nutricional e de qualidade, pode ocorrer formação de compostos tóxicos como óxidos de colesterol e alterações no sabor e na cor. Os carotenóides podem prevenir ou diminuir a perda destes nutrientes através do mecanismo de desativação de oxigênio singlete ou ainda agindo como filtro, prevenindo a formação do sensibilizador no estado triplete excitado (Mortensen *et al.*, 2004).

Porém, as propriedades, ações e funções dos carotenóides estão intimamente ligadas a sua estrutura, a qual apresenta um sistema de ligações duplas conjugadas que gera uma nuvem de elétrons π que se desloca sobre a cadeia poliênica, proporcionando a estas substâncias absorção de luz na região do visível e alta reatividade química. A grande maioria dos carotenóides existentes na natureza encontra-se na forma *trans*, devido a maior estabilidade desta conformação em relação à forma *cis*. Como consequência desta estrutura, os carotenóides podem sofrer isomerização geométrica e oxidação durante o processamento e armazenamento de alimentos, culminando na diminuição ou perda do poder corante e da atividade biológica.

A separação de isômeros geométricos é importante porque a forma *cis* apresenta menor atividade de vitamina A e a sua atividade em outras funções não está completamente estabelecida. Além disso, os isômeros *cis* apresentam menor comprimento de onda de absorção que a forma *trans*, acarretando ligeira perda de cor. Por estes motivos, a grande maioria dos trabalhos envolvendo a separação de isômeros geométricos de carotenóides por cromatografia líquida de alta eficiência tem empregado coluna de fase reversa C₃₀ (polimérica), tendo em vista que a mesma foi desenvolvida especificamente para este fim, possibilitando a separação de maior número de isômeros além de ser a única coluna capaz de separar isômeros de carotenóides não simétricos (Emenhiser *et al.*, 1996, Sander, 1994, Sander *et al.*, 2000).

Uma das alternativas para aumentar a estabilidade destes pigmentos bem como para possibilitar sua adição em sistemas hidrofílicos é o encapsulamento. O “spray-dryer”, tecnologia que consiste em um empacotamento do material com finas coberturas poliméricas, formando pequenas partículas denominadas micro-cápsulas que retardam a isomerização e oxidação destes compostos, tem sido uma das técnicas mais utilizadas na indústria de alimentos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AURAND, L. W., BOONE, N.H., GIDDINGS, G. G. Superoxide and singlet oxygen in milk lipid peroxidation. **J. Dairy Sci.** 60: 363-369, 1977.
- DI MASCIIO, P., KAISER, S., SIES, H. Lycopene as the most efficient biological carotenoid singlet oxygen quencher. **Arch. Biochem. Biophys.** 274: 532-538, 1989.
- EDGE, R., MCGARVEY, D. J., TRUSCOTT, T. G. The carotenoids as anti-oxidant- A review. **J. Photochem. Photobiol. B. Biol.** 41: 189-200, 1997.
- EMENHISER, C., ENGLERT, G., SANDER, L. C., LUDWIG, B., SCHWARTZ, S. J. Isolation and structural elucidation of the predominant geometrical isomers of α -carotene. **J. Chromatogr. A.** 719: 333-343, 1996.
- GIOVANNUCCI, E. Lycopene and prostate cancer risk. Methodological considerations in the epidemiologic literature. **Pure Appl. Chem.** 74: 1427-1434, 2002.
- KRINSKY, N. I. The biological properties of carotenoids. **Pure Appl. Chem.** 66: 1003-1010, 1994.
- LEE, S. H., MIN, D. B. Effects, quenching mechanism, and kinetics of carotenoids in chlorophyll-sensitized photooxidation of soybean oil. **J. Agric. Food. Chem.** 38: 1630-1634, 1990.
- MERCADANTE, A. Z., ENGELAND, E. S. Carotenoids - Handbook. G. Britton; S. Liaaen-Jensen and H. Pfander (eds). Birkhäuser, Basel. p. 1-33, 2004.
- MORTENSEN, G.; BERTELSEN, G., MORTENSEN, B. K., STAPELFELDT, H. Light-induced changes in packaged cheeses – a review. **Internat. Dairy J.** 14: 85-102, 2004.
- SANDER, L. C., SHARPLESS, K. E., CRAFT, N. E., WISE, S. A. Development of engineered stationary phases for the separation of carotenoid isomers. **Anal. Chem.** 66: 1667-1674, 1994.
- SANDER, L. C., SHARPLESS, K. E., PURSCH, M. C₃₀ stationary phases for the analysis of food by liquid chromatography. **J. Chromatogr. A.** 880: 189-202, 2000.
- VAN DEN BERG, H., FAULKS, R., GRANADO, H. F., HIRSCHBERG, J., OLMEDILLA, B., SOUTON, S., STHAL, W. The potential for the improvement of carotenoid levels in foods and the likely systemic effects. **J. Sci. Food. Agric.** 80: 880-912, 2000.
- VENKATESWARAN, V., FLESHNER, N. E., SUGAR, L. M., KLOTZ, L. H. Antioxidants block prostate cancer in lady transgenic mice. **Cancer Res.** 64: 5891-5896, 2004.

OBJETIVOS

Devido ao fato de que, dentre os carotenóides, o licopeno vem ganhando destaque nos últimos anos pela associação das suas propriedades antioxidantes com efeitos benéficos à saúde, mais especificamente com a diminuição da incidência de câncer de próstata, os objetivos deste trabalho foram:

1. Desenvolver e otimizar um método para extração de licopeno a partir de descarte de tomate.
2. Utilizar o método desenvolvido para obtenção de licopeno a partir de diferentes coletas de tomate.
3. Obter cristais de licopeno com alta pureza.
4. Avaliar a separação de isômeros de licopeno, e luteína e zeaxantina por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), utilizando colunas C₁₈ e C₃₀.
5. Avaliar a cinética de degradação do all-*trans*-licopeno por oxigênio singlete, separar e caracterizar os produtos formados.
6. Encapsular licopeno por “spray-dryer” utilizando goma arábica/sacarose como material de parede.
7. Preparar o complexo de inclusão licopeno- β -ciclodextrina e obter o mesmo na forma de pó por liofilização.
8. Avaliar o efeito da adição de licopeno na estabilidade das vitaminas A e D em leite.

CAPÍTULO 1

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. Obtenção de padrões de carotenóides

Padrões comerciais de carotenóides possuem um alto custo e vida útil reduzida, uma vez que após abertura da embalagem ocorre formação de isômeros e de produtos de oxidação devido ao longo sistema de ligações duplas conjugadas presente na estrutura destes pigmentos. Por estes motivos alguns estudos envolvem a obtenção de carotenóides puros.

Entretanto, na grande maioria dos trabalhos encontrados na literatura o enfoque é a análise quantitativa de carotenóides. Para tal, as principais etapas são: (1) extração exaustiva com solventes orgânicos, geralmente acetona, normalmente realizada em equipamentos de pequeno porte, (2) filtração em funil de Büchner, (3) transferência para éter de petróleo através de lavagens com água em funil de separação, (4) saponificação (opcional) e retirada do álcali por lavagem, (5) concentração, (6) separação cromatográfica e (7) quantificação.

Hakala & Heinonen (1994) testaram extração com éter de petróleo ou acetona, seguida de extração em fase sólida utilizando cartuchos de sílica e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com coluna C₁₈, como método de purificação de licopeno obtido a partir de purê de tomate, atingindo 97% de pureza somente após a terceira cromatografia semipreparativa.

Matioli & Rodriguez-Amaya (2002) obtiveram licopeno com 96% de pureza a partir de goiaba vermelha utilizando acetona como solvente de extração, partição para éter de petróleo e purificação em coluna aberta de MgO/hyflosupercel.

Metodologia similar foi empregada por Niizu & Rodriguez-Amaya (2003) para a obtenção de licopeno (95 a 98% de pureza) e β -caroteno (94 a 96% de pureza) a partir de polpa de melancia e por Kimura & Rodriguez-Amaya (2002) para isolar padrões de carotenóides de alface, sendo que a pureza variou de 91 a 97% para neoxantina, 95 a 98% para violaxantina, 97 a 100% para lactucaxantina, 92 a 96% para luteína e 90 a 97% para β -caroteno.

Extração de bixina a partir de sementes de urucum, e purificação por cristalização foram avaliadas por Rios & Mercadante (2004). Foram realizadas lavagens das sementes de urucum com hexano e metanol, para respectiva retirada de lipídeos e impurezas, e posteriormente realizadas duas extrações não quantitativas com acetato de etila. O extrato obtido foi concentrado e purificado por cristalização com diclorometano/etanol absoluto (1:4). A bixina apresentou grau de pureza de 94% após este procedimento e 98% após repetição da cristalização.

Para a obtenção de padrões de α - e β -caroteno a partir de cenoura, Zanatta *et al.* (2003) utilizaram extração com acetona, transferência para éter de petróleo e saponificação, seguida da separação dos mesmos por cromatografia em coluna de MgO/hyflosupercel. Os extratos obtidos foram cristalizados com éter de petróleo/metanol, apresentando após a primeira cristalização uma porcentagem de pureza de 80% para o β -caroteno e 92% para o α -caroteno, subindo para 98 e 99% de pureza, respectivamente, após a re-cristalização.

Scotter *et al.* (1994) purificaram padrão comercial de bixina através de três cristalizações sucessivas com acetato de etila seguidas de secagem sob ar, atingindo 97% de pureza. A partir deste padrão de bixina foi obtido padrão de *trans*-bixina na forma de cristais (95% de pureza) por reação de isomerização com iodo, duas cristalizações com acetona e secagem sob ar. Também a partir do padrão de bixina foi preparado padrão de *cis*-norbixina (92% de pureza) por hidrólise alcalina e cristalização com ácido acético glacial, sendo os cristais secos em dessecador na presença de pentóxido de fósforo e hidróxido de potássio sob atmosfera de nitrogênio. Utilizando padrão de *cis*-norbixina foi obtida *trans*-norbixina (94% de pureza) através de procedimento similar ao descrito para obtenção de *trans*-bixina seguido de cristalização com piridina, lavagem com acetona e secagem sob ar.

Extração seletiva de β -caroteno e de licopeno a partir de resíduo de pasta de tomate, com fluido supercrítico (CO₂), foi reportada por Baysal *et al.* (2000). Através de um planejamento fatorial foi otimizada temperatura do extrator (55°C para licopeno e 65°C para β -caroteno), pressão do fluido de extração (300 bar), adição de co-solvente (5 % de etanol), tempo de extração (2 h) e fluxo de CO₂ (4 Kg/h). O rendimento máximo obtido foi de 54 % para licopeno e de 50% para β -caroteno, não sendo mencionado o grau de pureza dos extratos.

Extração supercrítica seletiva a partir de tomate liofilizado foi reportada por Gómez-Prieto *et al.* (2003) que utilizaram CO₂, sem modificador, com fluxo de 4mL/min a 40°C. Não foi reportada a pureza do extrato obtido, mas além de licopeno (88 % *all-trans*-licopeno e 12 % *cis*-licopeno), foi verificada a presença de fitoeno, fitoflueno e β -caroteno.

2. Encapsulamento de carotenóides

2.1. “Spray-dryer”

O micro-encapsulamento é uma técnica para obtenção de carotenóides na forma de pó estável, dispersível em água e de fácil incorporação aos alimentos. Esta tecnologia

consiste de um empacotamento com finas coberturas poliméricas aplicáveis em sólidos, gotículas de líquido ou material gasoso, formando pequenas partículas denominadas micro-cápsulas. A cobertura é conhecida como parede e o material encapsulado como “core”. A parede tem como principal função, o aumento da vida útil do “core”, retardando a isomerização e oxidação desses compostos. Dentre as várias técnicas de encapsulamento disponíveis, “spray-drying” é uma das mais utilizadas na indústria de alimentos. Os materiais de parede mais utilizados são as gomas, maltodextrinas de diferentes equivalentes de dextroses (DE), proteínas e suas misturas.

Wagner & Warthesen (1995) utilizaram “spray-dryer” com a temperatura de entrada do ar de 200°C e temperatura de saída de 100°C para encapsulamento de suco de cenoura com maltodextrinas (4 DE, 15 DE, 25 DE e 36,5 DE), na proporção de 8:2, em base úmida. O suco de cenoura foi seco sozinho como controle. Maior eficiência no encapsulamento tanto para o α - (89%) como para o β -caroteno (87%) foi obtida quando utilizada maltodextrina 4 DE como material de parede. O percentual de sólidos utilizado na alimentação e o rendimento obtido no encapsulamento não foram mencionados.

Extrato de carotenóides obtido a partir de resíduos de polpa de cenoura foi revestido com uma mistura de sacarose/gelatina (3,5:2,5, p/p) e a emulsão resultante foi pulverizada em “spray-dryer” nas seguintes condições: 15% de sólidos na alimentação, temperatura do ar de entrada 135-145°C e temperatura de saída do ar 90-100°C, atingindo rendimento de 67%. Dos carotenóides presentes no resíduo de polpa de cenoura apenas o all-*trans*- β -caroteno apresentou perda (6%) durante a secagem (Chen & Tang, 1998). A eficiência do encapsulamento não foi relatada.

Oleoresina de rosa mosqueta contendo elevado teor de carotenóides foi encapsulada por “spray-dryer” com temperatura de entrada do ar de $150 \pm 5^\circ\text{C}$ ou $100 \pm 5^\circ\text{C}$ e temperatura de saída do ar de $70 \pm 5^\circ\text{C}$ ou $65 \pm 5^\circ\text{C}$, com amido ou gelatina como encapsulantes, respectivamente. As emulsões foram preparadas sob agitação constante e com as seguintes composições: a) amido (0,48%), sacarose (18,4%), lecitina (0,18%), água (79,3%) e oleoresina (1,63%) e b) gelatina (2,03%), sacarose (1,77%), lecitina (0,15%), água (94,28%) e oleoresina (1,77%). A perda de *trans*-rubixantina durante o processo de encapsulamento, tanto com matriz de amido quanto de gelatina, foi de 40%. As perdas de *trans*-licopeno e de *trans*- β -caroteno em gelatina foram de 28 e 1%, respectivamente, enquanto em matriz de amido foram maiores, de 46 e 29% (Robert *et al.*, 2003). A eficiência do encapsulamento não foi mencionada.

Para a obtenção da biomassa seca de *Dunalliella salina*, Leach *et al.* (1998) avaliaram os seguintes parâmetros do “spray-dryer”: percentual de sólidos contidos na

alimentação (4,5% e 8,75% sem encapsulante e 15,43% com maltodextrina 12 DE e goma arábica na proporção de 3,5:1), temperatura de entrada do ar de 200 e 265°C e temperatura do ar na saída de 110 e 120°C. Não houve perda de β -caroteno apenas quando utilizada concentração de 15,43% de sólidos, mesmo com a variação da temperatura de entrada e saída do ar. O maior rendimento do encapsulamento (98%) foi também obtido nestas condições, entretanto a eficiência não foi reportada.

Padrão cristalizado de *trans*- β -caroteno foi encapsulado por Desobry *et al.* (1997) com 40% de maltodextrina 25DE em “spray-dryer”, operado com temperaturas de entrada e saída de ar de $170 \pm 5^\circ\text{C}$ e $95 \pm 5^\circ\text{C}$, respectivamente. A perda de β -caroteno durante o processo foi de 11% e a eficiência do encapsulamento foi de $62 \pm 2\%$. Em outro estudo, Desobry *et al.* (1999), utilizando as mesmas condições para o “spray-dryer”, compararam o uso da maltodextrina 25 DE com as maltodextrinas 15 DE e 4 DE adicionadas de glicose (9 ou 18%), galactose (9 ou 18%) ou lactose (24 ou 40%) para encapsular β -caroteno, sendo obtida eficiência de 78% no encapsulamento com a mistura maltodextrina 4 DE e glicose (82:18).

Cristais de bixina foram encapsulados com diferentes soluções de polissacarídeos (40% de sólidos) em “spray-dryer” com temperatura de entrada e saída de ar de 180°C e 130°C, respectivamente. Quando utilizada solução de goma arábica e sacarose (95:5), o encapsulamento atingiu eficiência de 86%, sendo o pó obtido nestas condições o que apresentou maior solubilidade em água (Barbosa *et al.*, 2005). Cabe destacar que quando a solução não apresentou propriedades emulsificantes (somente maltodextrina) obteve-se a menor eficiência de encapsulamento (54%) que aumentou com a adição de um emulsificante à maltodextrina (75%). O rendimento do encapsulamento não foi relatado.

Matioli & Rodriguez-Amaya (2002) encapsularam licopeno, obtido de goiaba, por “spray-dryer” com goma arábica (20% de sólidos) e goma arábica/maltodextrina 20 DE (4:6) em solução com 40% de sólidos. As condições de temperatura de ar utilizadas foram de 120°C na entrada e 85°C na saída do equipamento, para os dois materiais de parede. O rendimento e a eficiência do processo não foram mencionados.

Cabe destacar que os parâmetros de encapsulamento não são reportados na maioria dos estudos. O rendimento obtido no encapsulamento não foi mencionado nos trabalhos de Wagner & Warthesen (1995); de Desobry *et al.* (1999) e de Barbosa *et al.* (2005). A eficiência do processo de encapsulamento não foi reportada por Chen & Tang (1998), Leach *et al.* (1998) e Robert *et al.* (2003). No trabalho de Matioli & Rodriguez-Amaya (2002) nenhum dos dois parâmetros foi citado.

2.2. Ciclodextrinas

Ciclodextrinas (CD) são oligossacarídeos cíclicos, obtidos a partir da degradação enzimática do amido, formados de seis (α -CD), sete (β -CD) e oito (γ -CD) unidades de glicose. Apresentam características hidrofílicas externamente e hidrofóbicas na parte interna, o que favorece a inclusão de compostos apolares no seu interior, isto é, encapsulação molecular. Pigmentos naturais hidrofóbicos, como carotenóides e flavonóides não glicosilados, podem ser estabilizados quando complexados com CD. Nos últimos anos, complexos de carotenóides com CD têm sido utilizados para viabilizar a adição de carotenóides a ambientes hidrofílicos, tais como células ou tecidos.

A preparação de complexos de óleo de canola rico em carotenóides com α - e β -CD, utilizando razão molar de 1:1 e 0,5:1 (p/p) foi avaliada por Basu & Del Vecchio (2001). Inicialmente, a CD foi dissolvida em água sob agitação, β -CD a 40-45°C e α -CD a 25°C, e após a solução atingir a temperatura ambiente o óleo de canola foi adicionado lentamente (sob N_2), sendo a mistura mantida por 16-24 h sob agitação. No caso do complexo óleo- α -CD a mistura resultante foi seca em evaporador rotatório a 55°C por 4h sob alto vácuo, enquanto que para obtenção do complexo óleo- β -CD, a mistura foi filtrada e o pó resultante seco em evaporador rotatório a 60-70°C por 4h. O óleo formou complexo com a α -CD nas duas razões molares testadas e com a β -CD somente quando utilizada razão molar de 0,5:1.

Matioli & Rodriguez-Amaya (2003) avaliaram o encapsulamento de licopeno obtido de goiaba vermelha com α -, β - e γ -CD, testando inicialmente razão molar de 1:50 (p/p). O licopeno foi dissolvido em éter de petróleo, o solvente foi eliminado com N_2 e o resíduo dissolvido em acetona, utilizando ultra-som para total solubilização. As CDs foram dissolvidas em água e adicionadas à solução de licopeno, sendo a acetona posteriormente eliminada com N_2 . Nestas condições, o licopeno formou complexo com a β - e γ -CD, mas não com a α -CD. Avaliando a melhor razão molar licopeno-CDs (1:100, 1:150, 1:200 e 1:250, p/p), a inclusão foi máxima quando utilizada γ -CD e razão molar de 1:200.

Formulações à base de carotenóides (padrões comerciais de β -caroteno, licopeno, luteína ou zeaxantina) e metil- β -CD (p/p) foram utilizadas para suplementação de culturas de células por Pfitzner *et al.* (2000). O carotenóide foi previamente dissolvido em diclorometano e adicionado a uma solução etanólica de CD, sendo a mistura agitada por 24h a 37°C e posteriormente seca em evaporador rotatório. O resíduo foi dissolvido em água e filtrado.

Lipossomas e β -CD foram utilizados como carreadores para incorporação de três carotenóides (padrões comerciais de β -caroteno e cantaxantina e luteína isolada de fonte natural) pelo plasma, mitocôndrias e frações de membrana microssomal e nuclear de células do fígado ou do epitélio da retina de porco. Os complexos carotenóide-CD foram preparados pela mistura do carotenóide na forma cristalina com β -CD comercial (razão molar 1:10, p/p), sendo a mistura mantida sob vácuo por 24 h a 10°C, posteriormente diluída com tampão (pH 7,4), levada ao ultra-som por 30 min a 40°C, filtrada com membrana Millipore (0,45 μ m) e centrifugada a 16000 rpm a 4°C, ficando o complexo carotenóide-CD no sobrenadante (Lacrajan *et al.*, 2001).

Em todos os trabalhos citados acima não foram utilizadas técnicas para confirmação da formação dos complexos carotenóide-CD.

Mele *et al.* (1998) reportaram a associação de β -caroteno comercial na forma de cristais com β - e γ -CD (razão molar 1:4, p/p). A preparação dos complexos consistiu na mistura do carotenóide e da CD até a obtenção de um pó homogêneo, seguido da adição de água destilada e homogeneização até a suspensão apresentar uma coloração vermelha escuro. A mistura foi mantida por uma noite sob atmosfera de nitrogênio, posteriormente ressuspensa em água destilada (40°C) e filtrada para remoção da opalescência, sendo submetida ao processo de liofilização para obtenção do complexo na forma sólida. A formação dos complexos foi confirmada através de “light scattering”, já que as soluções diluídas dos complexos apresentaram alto sinal e grande variação angular do “scattering” indicando a presença de agregados de grandes dimensões e por ressonância magnética nuclear (RMN) onde foi possível observar variação no deslocamento de sinais da glicose da γ -CD no complexo carotenóide- γ -CD quando comparado com a γ -CD nativa, não sendo observado variação de sinais em relação à α -CD na presença do carotenóide.

Utilizando técnicas semelhantes para preparo de complexos de licopeno com α - e β -CD (razão molar 1:4, p/p), bem como para confirmação de sua formação, Mele *et al.* (2002), reportaram que tanto α - como β -CD são capazes de formar associações estáveis com licopeno em água.

Dois métodos de preparação de complexos carotenóide-CD foram reportados por Polyakov *et al.* (2004). No primeiro método, β -caroteno comercial ou derivados sintéticos (7'-apo-7',7'-diciano- β -caroteno, 7'-apo-7'-(p-NO₂-C₆H₄)- β -caroteno ou ácido β -caroten-8'-óico) e β -CD (razão molar de 1:1 e 1:2, p/p) na forma sólida, foram misturados até a obtenção de um pó homogêneo. Foi, então, adicionada ao pó uma pequena quantidade

de água seguida de mistura até a formação de uma pasta que foi mantida por uma noite sob atmosfera de nitrogênio. A seguir, a pasta foi dissolvida em água até concentração de 1mM de carotenóide e agitada por algumas horas. No segundo método uma solução do carotenóide em metanol foi adicionada à solução aquosa da β -CD. Neste caso, o procedimento foi descrito em uma patente (Decolorized carotenoid-cyclodextrin complexes, Nº WO 9513047). Estudos de ^1H RMN mostraram deslocamento de sinal de prótons internos da cavidade da CD na presença de ácido β -caroten-8'-oico, enquanto que na presença dos demais carotenóides não houve modificações no espectro, quando utilizado o método de complexação na forma sólida.

A formação de um complexo de bixina com α -CD e determinação da estabilidade deste complexo foi descrita por Ling *et al.* (2005). Solução de bixina (5 mg) em clorofórmio/acetona (80:20) foi adicionada aos poucos sobre a α -CD em pó, colocada sobre lã de vidro em uma micro-coluna fechada de 1,5 mL. Depois da completa adição da solução de bixina à micro-coluna, esta foi centrifugada até completa remoção dos solventes, restando na mesma, apenas um pó de coloração vermelha. O pó foi provavelmente dissolvido com água destilada para análise no espectrofotômetro e com água deuterada para ^1H RMN, uma vez que os autores não relatam como o pó foi separado da lã. Através da comparação dos espectros de ^1H RMN, de bixina, α -CD e α -CD-bixina, observou-se que a molécula de α -CD sofreu forte deslocamento de sinais referentes aos seus hidrogênios H_3 e H_5 . Além disso, a relação $\Delta\delta \text{H}_5/\Delta\delta \text{H}_3$ obtida foi de 0,84, indicando boa associação entre as moléculas de α -CD e bixina.

3. Separação de isômeros de carotenóides por CLAE

As primeiras tentativas para a separação de isômeros por CLAE foram feitas empregando colunas de alumina (Vecchi *et al.*, 1981) ou de hidróxido de cálcio (Tsukida *et al.*, 1982; Chandler & Schwartz, 1987). A resolução obtida foi considerada muito boa, mas essas colunas não estão disponíveis comercialmente e requerem o controle estrito de uma série de condições.

Procurando uma alternativa mais prática para a separação das formas isoméricas *cis*, Quackenbush & Smallidge (1986) testaram mais de 20 colunas comerciais de fase reversa (C_8 e C_{18}), e somente em 3 colunas poliméricas (marca Vydac) foi obtida a separação dos isômeros de β -caroteno. Bushway (1985) já havia verificado a eficácia deste tipo de coluna na separação de isômeros. Mais tarde, Craft *et al.* (1990) também escolheram a coluna Vydac para a separação de isômeros de padrões comerciais de β -

caroteno. Em geral, melhores separações de carotenos e isômeros geométricos têm sido demonstradas com colunas C₁₈ poliméricas do que com monoméricas (Sander *et al.*, 2000).

Recentemente, foi desenvolvida uma coluna C₃₀ polimérica (marca YMC) especificamente para separação de isômeros *cis* e *trans* de carotenóides que além de proporcionar separação mais eficiente dos carotenóides na linha de base, possibilitou também a separação de isômeros de β-caroteno e de β-criptoxantina, não separados anteriormente (Sander *et al.*, 1994). Além disso, esta é a única coluna capaz de separar isômeros de carotenóides não simétricos, como 13-*cis*-, 13'-*cis*-, 9-*cis*- e 9'-*cis*-luteína (Emenhiser *et al.*, 1996). De acordo com a literatura, esta coluna tem sido a mais utilizada para separação de isômeros simétricos ou não simétricos.

Mais recentemente, trabalhos envolvendo separação de luteína, zeaxantina e seus isômeros geométricos, têm utilizado colunas de fase normal. Humphries & Khachik (2003) utilizaram coluna ciano para avaliar a distribuição de isômeros de luteína (all-*trans*-; 13,13'-*dicis*-; 9-*cis*- e 9'-*cis*-luteína) e de zeaxantina (all-*trans*-; 9-*cis*- e 13-*cis*-zeaxantina) em frutas, vegetais, trigo e massas. Panfili *et al.* (2004) usaram coluna de sílica para determinação de carotenóides em cereais e conseguiram separar all-*trans*-luteína dos seus isômeros 13,13'-*dicis*-; 9-*cis*- e 9'-*cis*-. Mendes-Pinto *et al.* (2004) compararam coluna de fase reversa polimérica C₁₈ e de fase normal ciano para separar carotenóides em uvas, obtendo separação dos picos de luteína e zeaxantina somente quando utilizada fase normal.

Foram selecionados alguns trabalhos envolvendo a separação por CLAE de carotenóides, sobretudo licopeno e seus isômeros geométricos (Tabela 1) e de luteína e zeaxantina (Tabela 2), utilizando coluna C₃₀ com comprimento de 250 mm e adsorvente com tamanho de partícula de 3 µm ou 5 µm.

Tabela 1. Condições cromatográficas para separação de all-*trans*-licopeno e seus isômeros *cis*.

Matriz e carotenóides separados	Fases móveis	Referências
Tomate desidratado: <i>Cis</i> e <i>trans</i> -licopeno	MeOH/ TBME (62:38), 1mL/min	Shi <i>et al.</i> (1999)
Dieta, tecidos e soro de ratos: <i>trans</i> -, 5- <i>cis</i> -licopeno e 4 isômeros <i>cis</i> - licopeno ^a	90% A (MeOH/TBME/ NH ₄ OAc 1,5% em água, 83:15:2) e 10% B (MeOH/TBME/NH ₄ OAc, 8:90:2) mantido 5 min, gradiente linear para 55% A/45% B em 12 min e para 5% A/95% B em 12 min, mantendo 5 min, 1mL/min	Boileau <i>et al.</i> (2000, 2001)
Padrão isomerizado: <i>trans</i> – e 4 isômeros <i>cis</i> - licopeno ^a	Gradiente linear de MeOH/TBME (60:40) para (50:50) em 20 min, permanecendo até 30 min e indo para (40:60) em 10 min, 1mL/min	Böhm (2001)
Tomate tangerina: <i>trans</i> -β-caroteno, <i>trans</i> -α-caroteno, <i>trans</i> - e 11 isômeros <i>cis</i> -licopeno ^a	Gradiente linear de 100% A (MeOH/TBME/H ₂ O/ NH ₄ OAc 1mol/L, 88:5:5:2) para 15% A e 85% B (MeOH/TBME /H ₂ O/ NH ₄ OAc 1mol/l, 28:70:0:2) em 40 min e para 100% B em 10 min, 1mL/min	Ferruzzi <i>et al.</i> (2001)
Padrão e purê de tomate incubado em suco gástrico humano: <i>trans</i> -, 5- <i>cis</i> -, 9- <i>cis</i> -, 13- <i>cis</i> - e 15- <i>cis</i> -licopeno	95% A (MeOH), 5% B (MeOH/H ₂ O 0,2% NH ₄ OAc, 80:20) 0% C (TBME) por 6 min, gradiente linear para 80% A/5%B/15%C em 1 min, por 5 min, para 30%A/5%B/65%C em 18 min, mantido por 18 min, 1mL/min	Re <i>et al.</i> (2001)
Tecidos humanos: <i>trans</i> - e 5- <i>cis</i> -licopeno	MeOH/TBME (50:50), 1mL/min	Fang <i>et al.</i> (2002)
Pasta de tomate: <i>trans</i> -, 9- <i>cis</i> , 9'- <i>cis</i> , 13- <i>cis</i> , 13'- <i>cis</i> -α-caroteno, <i>trans</i> -, 9- <i>cis</i> , 13- <i>cis</i> , 15- <i>cis</i> -β-caroteno, <i>trans</i> -, 4 isômeros <i>cis</i> -licopeno ^a , <i>trans</i> -, 9- <i>cis</i> , 13- <i>cis</i> - zeaxantina	α- e β-caroteno - MeOH/TBME (75:25), 1mL/min licopeno - MeOH/TBME (50:50), 1mL/min zeaxantina - MeOH/TBME (90:10), 1mL/min	Böhm <i>et al.</i> (2002)

Plasma: <i>trans</i> - e 5- <i>cis</i> -licopeno	Não disponível	Hadley <i>et al.</i> (2002)
Padrão isomerizado: <i>trans</i> - , 5- <i>cis</i> -, 9- <i>cis</i> -, 13- <i>cis</i> - , 15- <i>cis</i> e <i>di-cis</i> - licopeno	1-butanol/ACN/DCM (30:70:10), 2mL/min	Lee & Chen. (2002)
Padrão isomerizado e oleoresinas de tomate aquecidas: <i>trans</i> -, 5- <i>cis</i> -licopeno e 7 isômeros <i>cis</i> - licopeno ^a	MeOH e TBME (1:1) por 30 min, gradiente linear para 60% de MeOH em 5 min, mantido por 20 min, 1mL/min Gradiente linear de MeOH/TBME/H ₂ O (90:2,5:7,5) para 30:70:0 em 40 min, para 20:80:0 em 10 min e 95:5:0 em 10 min, 1mL/min (oleoresina de tomate tangerina)	Hackett <i>et al.</i> (2004)

^aIsômeros não foram identificados.

MeOH: metanol, TBME: éter *t*-metil butílico, NH₄OAc: acetato de amônio, TEA: trietilamina, ACN: acetonitrila, DCM: diclorometano, H₂O: água.

Tabela 2. Condições cromatográficas para separação de luteína e zeaxantina.

Matriz e carotenóides separados	Fases móveis	Referências
Milho e padrões: luteína, zeaxantina, β -criptoxantina	Gradiente linear de 100% de A (MeOH/TBME/H ₂ O, 81:15:4) para 50% A e 50% B (MeOH/TBME, 9:91) em 45 min e para 100% de B em 15 min, 1 mL/min	Moros <i>et al.</i> (2002)
Batata e padrões: violaxantina, anteraxantina, luteína, zeaxantina, neoxantina, β -criptoxantina, β -caroteno	99% de A (MeOH/H ₂ O/TEA, 90:10:0,1) e 1% de B (MeOH/TBME/H ₂ O/TEA, 6:90:4:0,1) mantido por 8 min, gradiente linear para 100% de B em 37 min e para 99% de A em 5 min, 1 mL/min	Breithaupt & Bamedi (2002)
Trigo e padrões: luteína, zeaxantina, β -apo-8'-carotenal	10% de A (TBME) e 90% de B (MeOH), gradiente linear para 45% de A em 35 min e para 60% de A em 10 min, mantido 15 min, 1,3 mL/min	Hentschel <i>et al.</i> (2002)
Brócoli, ervilha, espinafre e padrões isomerizados: <i>trans</i> -, 13- <i>cis</i> + 13'- <i>cis</i> e 9- <i>cis</i> + 9'- <i>cis</i> -luteína, <i>trans</i> -, 13- <i>cis</i> e 9- <i>cis</i> -zeaxantina	MeOH (2% NH ₄ OAc)/TBME (85:15), 1 mL/min	Updike & Schwartz (2003)
Manga, padrões e padrões isomerizados: <i>trans</i> e <i>cis</i> -neoxantina, neocromo, luteoxantina, <i>trans</i> - e 3 isômeros <i>cis</i> -violaxantina ^a , <i>trans</i> - e 3 isômeros <i>cis</i> -zeaxantina ^a , <i>trans</i> -, 9-ou 9'- <i>cis</i> , 13 ou 13'- <i>cis</i> e outros 5 isômeros <i>cis</i> -luteína ^a , <i>trans</i> -, 13- <i>cis</i> , 15 ou 15'- <i>cis</i> e outros 3 isômeros <i>cis</i> - β -caroteno, <i>trans</i> - α -caroteno	100% de A (MeOH/iso-propanol) mantido por 15 min e gradiente linear para 70% de A e 30% de B (DCM) em 45 min, mantido por 15 min, 1 mL/min	Chen <i>et al.</i> (2004)
Suplementos dietéticos comerciais e padrões: <i>trans</i> - α -caroteno, <i>trans</i> -, 9- <i>cis</i> e 13- <i>cis</i> - β -caroteno, <i>trans</i> -, 9- <i>cis</i> -, 9'- <i>cis</i> -, 13- <i>cis</i> -, 13'- <i>cis</i> -luteína, <i>trans</i> -, 9- <i>cis</i> -, 13- <i>cis</i> -zeaxantina	Gradiente linear de 100% de A (MeOH/TBME/H ₂ O, 81:15:4) para 60% de A e 44% de B (TBME/MeOH/H ₂ O, 90:6:4) em 50min, 1 mL/min (α - e β -caroteno) Gradiente linear de 100% de A (92:4:4) para 88% de A e 12% de B (90:6:4) em 80 min, 1 mL/min (luteína e zeaxantina)	Aman <i>et al.</i> (2004)

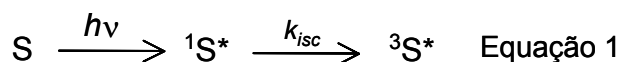
^aIsômeros não foram identificados. MeOH: metanol, TBME: éter *t*-metil butílico, NH₄OAc: acetato de amônio, TEA: trietilamina, DCM: diclorometano, H₂O: água.

4. Efeito da luz na estabilidade de carotenóides

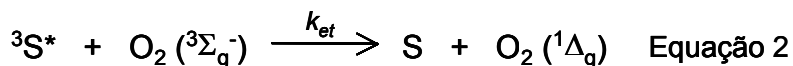
Os efeitos da luz na estabilidade de alimentos podem ser explicados por reações de auto-oxidação fotolítica ou de oxidação foto-sensitizada, sendo esta a reação preferencial, uma vez que os alimentos contêm sensibilizadores naturais tais como clorofila, hematoporfirinas e riboflavina (Bradley & Min, 1992).

4.1. Foto-oxidação sensitizada

Sensibilizadores (S) são substâncias capazes de captar luz ($h\nu$) e cujo estado fundamental é singlete (1S), como mostra a Equação 1. Vários corantes artificiais tais como rosa de bengala e azul de metileno são capazes de cumprir eficientemente a mesma função.

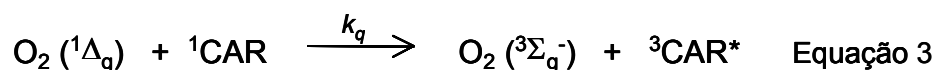


A foto-oxidação ocorre na presença de um sensibilizador (1S), oxigênio triplete (O_2 ($^3\Sigma_g^-$)) e luz na região do visível, formando o sensibilizador no estado triplete ($^3S^*$). Este sensibilizador ($^3S^*$) pode ser desativado através de dois mecanismos. O conhecido como Tipo I consiste na associação direta do sensibilizador com outra molécula formando radicais livres, enquanto que no Tipo II ocorre formação de oxigênio singlete (O_2 ($^1\Delta_g$)), pela transferência de energia do sensibilizador excitado para o O_2 ($^3\Sigma_g^-$) (Equação 2).

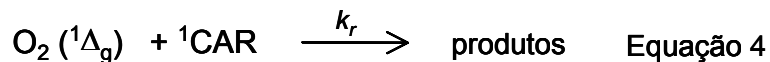


A desativação do oxigênio O_2 ($^1\Delta_g$) por compostos presentes nos alimentos, como carotenóides, pode ocorrer por um processo de transferência de energia ou através de reações químicas.

A desativação física (Equação 3) envolve a transferência de energia de excitação do O_2 ($^1\Delta_g$) para o carotenóide, resultando em formação de oxigênio no seu estado fundamental (O_2 ($^3\Sigma_g^-$)) e estado triplete excitado do carotenóide ($^3CAR^*$). A energia do $^3CAR^*$ é dissipada através de interações rotacionais e vibracionais entre o $^3CAR^*$ e o solvente para recuperar o estado fundamental do mesmo, sem ocorrer degradação (Stahl & Sies, 1993).



Em contraste com a desativação física (k_q), o processo químico (k_r) resulta em destruição do cromóforo e na formação de produtos de oxidação (Stratton *et al.*, 1993), como mostra a Equação 4.



Os carotenóides são conhecidos como excelentes desativadores de oxigênio singlete, sendo o número de ligações duplas conjugadas um eficiente parâmetro para avaliar sua habilidade em desativar oxigênio singlete (Hirayama *et al.*, 1994).

Segundo Di Mascio *et al.* (1989), a 37°C em etanol/clorofórmio/água (50:50:1), a bixina e β -caroteno apresentaram constante de desativação física (k_q) de $1,4 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, enquanto que para licopeno o valor foi de $3,1 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (Tabela 3). Nestas condições experimentais o licopeno foi 45% mais eficiente para desativar $\text{O}_2 (^1\Delta_g)$ que os carotenóides citados. Os autores não determinaram o processo de desativação química (k_r).

Conn *et al.* (1991) avaliaram a desativação de $\text{O}_2 (^1\Delta_g)$ por carotenóides em solventes orgânicos (benzeno e tolueno) utilizando fenazine como sensibilizador. Neste trabalho o licopeno também apresentou maior eficiência em relação ao β -caroteno (24%) e a bixina (46%) na desativação de $\text{O}_2 (^1\Delta_g)$. Também foi determinado o k_q para licopeno em etanol/clorofórmio/água (50:50:1) sob temperatura ambiente, sendo encontrando um valor substancialmente menor que o reportado por Di Mascio *et al.* (1989), neste mesmo solvente a 37°C, como mostra a Tabela 3. A temperatura não foi considerada como fator responsável por estas diferenças porque em estudo preliminar da desativação de $\text{O}_2 (^1\Delta_g)$ por licopeno e β -caroteno em função da temperatura (-90°C a +90°C em tolueno) não houve aumento no k_q com o aumento da temperatura. Possivelmente esta diferença seja decorrente da utilização de diferentes métodos de determinação do k_q , embora mesmo utilizando técnicas diferentes os autores não tenham encontrado diferença entre os valores de k_q para β -caroteno.

Montenegro *et al.* (2002) avaliaram o processo de desativação física e química (k_i) de $\text{O}_2 (^1\Delta_g)$ por vários carotenóides em sistema-modelo de micelas inversas (0,1 M AOT/hexano/água) em função da razão molar entre água e surfactante (W), utilizando rosa de bengala como sensibilizador. A degradação dos compostos seguiu modelo cinético de primeira ordem. O licopeno apresentou eficiência superior (46-60%) na desativação de

$O_2 (^1\Delta_g)$ em relação aos demais carotenóides avaliados. Foi observado que o k_r foi quatro ordens de magnitude menor do que o k_q ($k_{t,ex} \approx k_{q,ex}$) e que o valor de k_q foi independente de W e similar ao observado em soluções homogêneas de hexano (Tabela 3). Estes resultados indicam que o licopeno permanece na pseudofase e que a concentração de $O_2 (^1\Delta_g)$ na pseudofase externa ($[^1\Delta_{ex}]$) é constante, independente do tamanho e número de agregados micelares presentes na solução.

Tabela 3. Constantes de desativação química (k_r), física (k_q) e total (k_t) para licopeno.

Sistema-modelo	Constantes de reação ($M^{-1}.s^{-1}$)			Referência
	k_r	k_q	k_t	
Benzeno	-----	$1,7 \times 10^{10}$	-----	Conn <i>et al.</i> (1991)
Ciclohexano	-----	$1,9 \times 10^{10}$	-----	Conn <i>et al.</i> (1991)
CCl_4	-----	$1,4 \times 10^{10}$	-----	Conn <i>et al.</i> (1991)
$CHCl_3$	-----	$1,9 \times 10^{10}$	-----	Conn <i>et al.</i> (1991)
Tolueno	-----	$1,8 \times 10^{10}$	-----	Conn <i>et al.</i> (1991)
EtOH/ $CHCl_3/H_2O$ (50:50:1)	-----	$1,75 \times 10^{10}$	-----	Conn <i>et al.</i> (1991)
EtOH/ $CHCl_3/H_2O$ (50:50:1)	-----	$3,1 \times 10^{10}$	-----	Di Mascio <i>et al.</i> (1989)
Óleo de soja/DCM/clorofila	-----	-----	$6,93 \times 10^9$	Lee & Min (1990)
AOT/hexano/ H_2O $W = 5$	$2,1 \times 10^6$	-----	$2,0 \times 10^{10}$	Montenegro <i>et al.</i> (2002)
AOT/hexano/ H_2O $W = 10$	$2,1 \times 10^6$	-----	$2,2 \times 10^{10}$	Montenegro <i>et al.</i> (2002)
AOT/hexano/ H_2O $W = 20$	$2,0 \times 10^6$	-----	$2,6 \times 10^{10}$	Montenegro <i>et al.</i> (2002)
AOT/hexano/ H_2O $W = 50$	$2,3 \times 10^6$	-----	$2,5 \times 10^{10}$	Montenegro <i>et al.</i> (2002)

Entretanto existem poucos trabalhos que acompanharam a estabilidade da foto-oxidação sensibilizada de carotenóides e os produtos de degradação formados.

Degradação foto-sensibilizada de bixina em acetonitrila/metanol (1:1), com rosa de bengala como sensibilizador, foi avaliada por Montenegro *et al.* (2004) através de espectroscopia UV-vis, CLAE e “laser-flash photolysis”. Tanto em presença de N_2 como

O₂ o principal produto formado foi a *all-trans*-bixina. A constante de isomerização foi menor na presença de ar (k_{obs} : $3,7 \times 10^4 \text{ s}^{-1}$) do que sob N₂ (k_{obs} : $40,0 \times 10^4 \text{ s}^{-1}$) ou com o aumento da concentração de bixina (k_{obs} : $3,7 \times 10^4 \text{ s}^{-1}$ com [76μM] e $42,0 \times 10^4 \text{ s}^{-1}$ com [8μM]), sugerindo a participação do estado triplete da bixina também como precursor do processo. Em todos os casos a degradação de bixina se ajustou ao modelo cinético de primeira ordem. Na ausência de sensibilizador e/ou luz não ocorreu degradação, indicando a estabilidade do estado fundamental da bixina à temperatura ambiente. A formação de bixina triplete, sua desativação, bem como processos de desativação de oxigênio foram confirmados por “laser-flash photolysis”, enquanto que a presença de O₂ (¹Δ_g) foi verificada por fosforescência. Os produtos primários de isomerização degradaram somente em presença de ar e iluminação prolongada, provavelmente por reação com oxigênio singlete.

A isomerização do 15-*cis*-β-caroteno foi eficientemente induzida por O₂ (¹Δ_g) e pelo estado triplete excitado do azul de metileno (sensibilizador), uma vez que o maior produto formado foi o *all-trans*-β-caroteno, tanto na presença quanto na ausência de O₂. Entretanto não ocorreu isomerização da forma *cis* para a *trans* sem adição do sensibilizador na presença de O₂, e nas mesmas condições não ocorreu isomerização da forma *all-trans* para a *cis* (Foote *et al.*, 1970). Estes experimentos foram acompanhados através da medida espectrofotométrica do meio reacional.

A foto-oxidação de β-caroteno por oxigênio singlete foi estudada por Stratton *et al.* (1993) em sistema de tolueno/metanol (85:15) com rosa de bengala como sensibilizador. Os produtos da reação foram isolados e analisados por CLAE em fase reversa e normal com detector de arranjo de diodos e de massas. A mistura obtida na reação foi analisada diretamente por cromatografia gasosa e espectrometria de massas para detecção de produtos de oxidação voláteis. Ocorreu quebra da cadeia poliênica com entrada de oxigênio e formação de β-apo-8'-carotenal, β-apo-10'-carotenal, β-apo-14'-carotenal e 5,8-endoperóxido β-caroteno.

Ukai *et al.* (1994) reportaram a foto-sensitização de licopeno em diclorometano, na presença de ar e de azul de metileno como sensibilizador. A reação foi acompanhada por CLAE e o principal produto formado após 40 horas de reação foi o apo-6'-licopenal, o qual teve sua identidade confirmada por espectrometria de massas e RMN.

Nos trabalhos acima não foram avaliados parâmetros cinéticos da degradação foto-sensitizada dos carotenóides.

4.2. Foto-degradação

Minguez-Mosquera & Jaren-Galan (1995) estudaram a descoloração de β -caroteno e capsantina em diferentes solventes (ciclohexano, etanol absoluto e água), sob luz fluorescente (1000 lux) e no escuro, a temperaturas de 15, 25, 35 e 45° C. A degradação de ambos carotenóides seguiu reação de ordem zero quando dissolvido em solventes orgânicos, enquanto que em sistema aquoso, a degradação cinética foi de primeira ordem. A maior velocidade de degradação do β -caroteno ($k = 2,564 \text{ h}^{-1}$) foi atingida em sistema de etanol absoluto sob luz e temperatura de 45°C, enquanto que no escuro nas mesmas condições a degradação foi menor ($k = 1,362 \text{ h}^{-1}$). Não foram avaliados os produtos de degradação formados.

Estabilidade de bixina encapsulada com diferentes polissacarídeos por “spray-dryer” foi avaliada por Barbosa *et al.* (2005). Micro-cápsulas ou cristais (+ Tween 80) de bixina dispersos em solução aquosa foram distribuídos em tubos de ensaio e estocados sob luz fluorescente (700 lux) ou no escuro a $21 \pm 2^\circ\text{C}$, em presença de ar. Em todos os sistemas a estabilidade da bixina foi maior no escuro do que sob luz. Em presença de luz foi observada uma maior estabilidade da bixina encapsulada com goma arábica ($t_s=74 \text{ h}$) do que da bixina encapsulada somente com maltodextrina ($t_s=27 \text{ h}$) ou combinada com sacarose ($t_s=27 \text{ h}$).

Utilizando extrato de carotenóides obtido de resíduo de polpa de cenoura, na forma de pó micro-encapsulado com sacarose/gelatina (3,5:2,5) por “spray-dryer”, Chen & Tang (1998) avaliaram a estabilidade sob temperaturas de 4, 25 e 45°C no escuro e à 25°C sob luz fluorescente (1500 lux), todos em atmosfera de N_2 . Em todas as condições estudadas, o β -caroteno se mostrou o mais instável ($k_{4^\circ, \text{escuro}} = 0,018$; $k_{25^\circ, \text{escuro}} = 0,031$; $k_{45^\circ, \text{escuro}} = 0,050$ e $k_{25^\circ, \text{luz}} = 0,058 \text{ dia}^{-1}$), seguido do α -caroteno ($k_{4^\circ, \text{escuro}} = 0,014$; $k_{25^\circ, \text{escuro}} = 0,026$; $k_{45^\circ, \text{escuro}} = 0,043$ e $k_{25^\circ, \text{luz}} = 0,049 \text{ dia}^{-1}$) e da luteína ($k_{4^\circ, \text{escuro}} = 0,005$; $k_{25^\circ, \text{escuro}} = 0,008$; $k_{45^\circ, \text{escuro}} = 0,011$ e $k_{25^\circ, \text{luz}} = 0,015 \text{ dia}^{-1}$). Em geral, houve um acréscimo relativo nas concentrações dos isômeros 9-*cis*- e 13-*cis*-luteína; 9-*cis*-, 13-*cis*- e 15-*cis*- α -caroteno; 9-*cis*-, 13-*cis*-, 15-*cis*- e 13,15-*dicis*- β -caroteno com o aumento da temperatura ou presença de luz durante a estocagem. A cinética da reação de todos os carotenóides ajustou-se ao modelo de primeira ordem.

A mesma mistura de carotenóides com sacarose/gelatina, encapsulada por liofilização, para obtenção de pó, foi submetida às condições experimentais citadas acima (Tang & Chen, 2000). Novamente o β -caroteno foi o carotenóide que apresentou maior velocidade de degradação durante estocagem sob luz a 25°C ($k = 0,015 \text{ dia}^{-1}$), comparado

com o escuro a 4°C ($k = 0,024$), a 25°C ($k = 0,037$) e a 45°C ($k = 0,043 \text{ dia}^{-1}$). O ajuste cinético foi de primeira ordem.

Extrato seco de padrão de licopeno (40 µg) foi mantido durante 6 dias sob luz fluorescente (2000-3000 lux) a 25°C e atmosfera de N₂, ocorrendo neste período uma degradação de 94% do total de licopeno (cinética de degradação de primeira ordem). Monitoramento por CLAE mostrou que a composição do extrato inicial era 96,4% de *all-trans*-, 0,99% de 5-*cis*-, 0,71% de 13-*cis*- e 0,27% de 15-*cis*-licopeno, ocorrendo queda de 13,1% na área do *all-trans*-licopeno após 144 horas de iluminação e acréscimo de 1,47% de 5-*cis*-, 0,92% de 9-*cis*-, 5,28% de 13-*cis*- e 0,44% de 15-*cis*-licopeno. Cabe salientar que todos os isômeros *mono-cis* de licopeno voltaram a decair após 2 horas de exposição à luz. Este resultado indica que isomerização e degradação de licopeno e de seus isômeros *cis* podem ocorrer simultaneamente na presença de luz (Lee & Chen, 2002). Os autores não determinaram as velocidades de degradação.

Licopeno obtido a partir de goiaba vermelha, encapsulado com goma arábica ou goma arábica/maltodextrina 20 DE (4:6), por “spray-dryer” ou por liofilização foi estocado sob luz fluorescente e escuro à temperatura ambiente por um período de 40 dias. A degradação do licopeno encapsulado tanto por “spray-dryer” como por liofilização, para os dois tipos de encapsulantes, na ausência e presença de luz, seguiu uma cinética de primeira ordem, sendo que até o 15º dia de experimento (t_1) houve uma maior velocidade de degradação e após este período (t_2) a velocidade foi bem menor em todos os casos. O licopeno encapsulado com goma arábica/maltodextrina por liofilização foi o que apresentou maior estabilidade tanto no escuro ($k_1 = 0,0588 \text{ µg dia}^{-1}$; $k_2 = 0,0106 \text{ µg dia}^{-1}$) como sob luz ($k_1 = 0,0668 \text{ µg dia}^{-1}$; $k_2 = 0,0117 \text{ µg dia}^{-1}$) (Matioli & Rodriguez-Amaya, 2002). Neste trabalho os autores relataram a unidade de k como µg dia^{-1} .

Anguelova & Warthesen (2000) avaliaram a estabilidade do licopeno em dois pós de tomate comerciais obtidos por “spray-dryer” durante o armazenamento em presença de ar. Após seis semanas de exposição à luz fluorescente (38500 lux) sob temperatura ambiente ou estocagem a 6°C no escuro, 60% a 70% do *all-trans*-licopeno foi preservado em ambos os pós. Neste mesmo período, sob 45°C no escuro restou apenas 40% do *all-trans*-licopeno. A degradação do *all-trans*-licopeno foi acompanhada do aumento no conteúdo do isômero 5,5'-*di-cis*- e de 5,6-diidroxi-diidrolicopeno (produto de oxidação), principalmente nas amostras estocadas a 45°C no escuro. A ordem da reação bem como o tipo de ajuste e as constantes de degradação (k) não foram mencionados.

A estabilidade dos carotenóides da microalga *Dunalliella salina*, na forma de pó encapsulado (maltodextrina e goma arábica 3,5:1), obtido por “spray-dryer” foi avaliada

em estudo realizado por Leach *et al.* (1998). Após um período de estocagem de 36 dias sob luz solar, verificou-se que o pó encapsulado a 200°C foi mais estável ($k = 0,06 \text{ dia}^{-1}$) que o obtido a 265°C ($k = 0,10 \text{ dia}^{-1}$). Provavelmente a diferença na permeabilidade ao oxigênio da camada de polímero formada a diferentes temperaturas seja a causa deste efeito. Foi observado um decréscimo de 90% na concentração de β -caroteno depois de 7 dias de estocagem no pó não encapsulado. A micro-encapsulação e estocagem praticamente não alteraram as proporções entre os isômeros *all-trans* e 9-*cis*- β -caroteno.

A estabilidade de licopeno presente em polpa de tomate armazenada na ausência e presença de luz fluorescente e de oxigênio, nas temperaturas de - 20, 5 e 25°C por 60 dias foi avaliada por Sharma & Le Maguer (1996). A cinética de degradação reportada em todos os casos foi de pseudo-primeira ordem. Como esperado, a velocidade de degradação do licopeno exposto ao oxigênio e à luz foi maior ($k_1 = 0,0057$, $k_2 = 0,0092$, $k_3 = 0,0250 \text{ dia}^{-1}$) que no escuro e ar ($k_1 = 0,0048$, $k_2 = 0,0078$, $k_3 = 0,0220 \text{ dia}^{-1}$) e que no escuro e sob vácuo ($k_1 = 0,0024$, $k_2 = 0,0067$, $k_3 = 0,0180 \text{ dia}^{-1}$), para as temperaturas de - 20, 5 e 25°C, respectivamente. Estes dados indicam que o oxigênio foi o responsável pela maior degradação do licopeno. Neste estudo não foram avaliados os produtos de degradação formados.

Lin & Chen (2005) verificaram a estabilidade de carotenóides em suco de tomate durante estocagem sob luz fluorescente (2500 lux) ou no escuro a 4, 25 e 35°C, durante 12 semanas. A presença de luz acarretou degradação e isomerização da luteína, sendo formado principalmente 13-*cis*-luteína. A exposição à luz promoveu a formação de di-*cis*, 9-*cis* e 13-*cis*- β -caroteno. No escuro, o 15-*cis*-licopeno foi o principal isômero formado durante a estocagem a 4°C, enquanto 9-*cis* e 13-*cis* prevaleceram a 25°C e 5-*cis*- e 13-*cis*-licopeno a 35°C. Sob luz, ambos 9-*cis* e 13-*cis*-, foram os principais produtos, enquanto 13-*cis*- e 15-*cis*- foram os mais abundantes a 4 e 25°C. A ordem da reação, o tipo de ajuste utilizado e as constantes de degradação (k) não foram mencionadas.

Resultados sobre degradação de carotenóides são muitas vezes difíceis de serem avaliados e comparados, tendo em vista que muitos estudos são realizados em sistemas-modelo com carotenóides isolados ou sintéticos e outros são realizados em matrizes alimentares, onde há uma série de fatores envolvidos, tais como: tipo do alimento, estrutura do carotenóide, concentração inicial do pigmento, grau de destruição da integridade celular no alimento, presença ou não de enzimas, pró-oxidantes e antioxidantes.

Além disso, luminosidades de diferentes intensidades são utilizadas e em alguns trabalhos a mesma não é relatada (Matioli & Rodriguez-Amaya, 2002; Sharma & Le

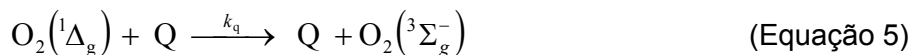
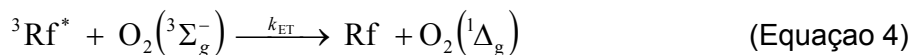
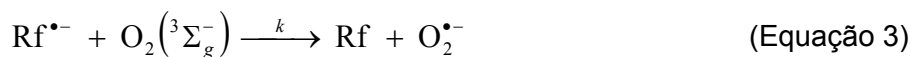
Maguer, 1996) assim como outras condições como, por exemplo, a atmosfera em que o experimento foi realizado (Minguez-Mosquera & Jaren-Galan, 1995; Mاتيoli & Rodriguez-Amaya, 2002; Leach *et al.*, 1998; Lin & Chen, 2005). Por esses motivos, a comparação entre os estudos torna-se bastante difícil.

4.3. Reações induzidas pela riboflavina em leite

A interação entre a luz, oxigênio e compostos denominados sensibilizadores, tais como riboflavina (Rf) presente em leite (Aurand *et al.*, 1977) e clorofila em óleos vegetais (Lee & Min, 1990), causa foto-oxidação em alimentos, através da produção de radicais livres e oxigênio molecular singlete ($O_2(^1\Delta_g)$) que podem oxidar os constituintes dos alimentos, tais como ácidos graxos insaturados, vitaminas, proteínas e aminoácidos. O grau de alteração no leite depende de fatores tais como comprimento de onda e intensidade da luz, tempo de exposição, tipo de embalagem, área superficial exposta e temperatura (Dunkley *et al.*, 1962; Maniere & Dimick, 1976).

A luz fluorescente ($\lambda_{\text{emissão}} > 350 \text{ nm}$) usada nas gôndolas exppositoras proporciona condições ótimas para a promoção de reações deteriorantes iniciadas pela riboflavina (Rf), nas quais por absorção de luz o estado singlete fundamental da riboflavina (^1Rf) passa para o estado singlete excitado ($^1\text{Rf}^*$), que é convertido no estado triplete excitado ($^3\text{Rf}^*$), pelo cruzamento entre sistemas (Equação 1).

O estado $^3\text{Rf}^*$ pode seguir dois mecanismos de reação, Tipo I ou Tipo II (Foote, 1968). No mecanismo **Tipo I**, $^3\text{Rf}^*$ reage com um substrato (Q), como proteínas ou ácidos graxos para produzir radicais livres e íons radicais (Equações 2 e 3). No mecanismo **Tipo II** o $^3\text{Rf}^*$ reage com oxigênio molecular fundamental triplete, $O_2(^3\Sigma_g^-)$, para produzir $O_2(^1\Delta_g)$ excitado (Equação 4). O $O_2(^1\Delta_g)$ pode ser desativado por um mecanismo de transferência de energia conhecido como desativação física (Equação 5) ou por desativação química que corresponde à reação com compostos ricos em elétrons (Q) tais como ácidos graxos, vitaminas lipossolúveis, aminoácidos, etc, conduzindo à degradação destes compostos (Equação 6)



Antioxidantes naturais presentes nos alimentos podem exercer efeito protetor contra estas oxidações, entretanto o leite contém baixas concentrações destes compostos, tais como carotenóides e tocoferóis, que normalmente são perdidos durante o processamento e armazenamento (Jensen & Nielsen, 1996).

A ação protetora dos carotenóides sobre a degradação por foto-oxidação de compostos de interesse biológico se deve ao fato da constante de desativação física (k_q) dos carotenóides ser de várias ordens de magnitude maior que a química (k_r), exercendo uma ação catalítica nos processos de desativação de $\text{O}_2({}^1\Delta_g)$, uma vez que o estado triplete excitado do carotenóide (${}^3\text{Car}^*$) pode regressar a seu estado fundamental por liberação de calor. A Tabela 4 apresenta os valores de constante de desativação total ($k_t = k_q + k_r$) de $\text{O}_2({}^1\Delta_g)$ por alguns compostos naturais de interesse biológico (Wilkinson, 1995). Apesar destes experimentos terem sido realizados em diferentes sistemas, estes valores indicam que os carotenóides podem ser considerados os mais eficientes desativadores de $\text{O}_2({}^1\Delta_g)$ dentre os compostos naturais.

A maioria os estudos sobre foto-oxidações das vitaminas A e D foram realizados em solventes orgânicos.

Renken & Warthesen (1993) estudaram a estabilidade de vitamina D em acetonitrila e em leite, em atmosfera saturada com ar, nitrogênio, e submetidas a temperaturas de 4 e 21°C e expostas à luz fluorescente. Em sistema modelo de acetonitrila, a estabilidade de vitamina D₃ não foi influenciada pela luz, enquanto que em leite desnatado ocorreu degradação de vitamina D₃. Estes fatos indicaram que a perda de vitamina D₃ foi devido a reações de foto-oxidação nas quais a riboflavina e luz atuam como catalisadores.

O efeito da adição de carotenóides (β -caroteno e fucoxantina), de retinol e de acetato de retinol, sobre a oxidação foto-sensitizada de vitamina D₂ em um sistema-modelo de água/acetonitrila e riboflavina, através da medida de formação de O_2 no

“headspace” foi verificado por Li *et al.* (2000). Dos carotenóides avaliados, o β -caroteno foi mais eficiente na proteção da vitamina.

Whited *et al.* (2002) estudaram o efeito da exposição à luz fluorescente (intensidade de 1000-2000 lux) a 6°C, sobre a degradação de vitamina A e o desenvolvimento de aroma induzido por luz em amostras de leite, integral, parcialmente e totalmente desnatada. Os resultados mostraram que a degradação da vitamina A foi diretamente influenciada pela intensidade e duração da exposição à luz e inversamente proporcional ao conteúdo de gordura no leite. A vitamina A em leite desnatado degradou a uma velocidade três vezes maior do que em leite parcialmente desnatado e 3,5 vezes maior comparado com leite integral.

Tabela 4. Constantes de desativação total (k_t) de $O_2(^1\Delta_g)$ por compostos biológicos, em diferentes solventes.

Composto	Solvente	k_t ($M^{-1} s^{-1}$)
Ácido ascórbico	H ₂ O	$8,3 \times 10^6$
Ácido linoleico	ACN	$2,8 \times 10^5$
Ácido linolênico	ACN	$6,4 \times 10^5$
Albumina	D ₂ O	5×10^8
β -caroteno	EtOH/H ₂ O (95:5)	2×10^9
Clorofila a	EtOH	2×10^7
Clorofila b	C ₆ H ₆	$4,2 \times 10^8$
Colesterol	MeOH/H ₂ O (95:5)	$2,5 \times 10^8$
Glucose	D ₂ O	$1,4 \times 10^4$
Histidina	H ₂ O pH= 7	9×10^7
Licopeno	CHCl ₃ / EtOH (1:1)	$1,8 \times 10^{10}$
Lisosima	H ₂ O	$4,4 \times 10^8$
Luteína	CHCl ₃ / EtOH (1:1)	2×10^9
Quercitina	CD ₃ OD	$8,9 \times 10^5$
Retinol	ACN	$2,6 \times 10^7$
Riboflavina	CH ₃ OH	6×10^7
Rutina	CD ₃ OD	$1,6 \times 10^6$
Tirosina	H ₂ O	$3,8 \times 10^7$
β -tocoferol	EtOH	$1,5 \times 10^8$
Triptofano	H ₂ O	$2,6 \times 10^7$
Vitamina D ₃	C ₆ H ₆	4×10^5

Fonte: Wilkinson, 1995.

5. Referências bibliográficas

- AMAN, R., BAYHA, S., CARLE, R., SCHIEBER, A. Determination of carotenoid stereoisomers in comercial dietary supplements by high-performance liquid chromatography. **J. Agric. Food Chem.** 52: 6086-6090, 2004.
- ANGUELOVA, T. & WARTHESEN, J. Lycopene stability in tomato powders. **J. Food Sci.** 65: 67-70, 2000.
- AURAND, L. W., BOONE, N.H., GIDDINGS, G. G. Superoxide and singlet oxygen in milk lipid peroxidation. **J. Dairy Sci.** 60: 363-369, 1977.
- BARBOSA, M. I. M. J., BORSARELLI, C. D., MERCADANTE, A. Z. Light stability of spray-dried bixin encapsulated with different edible polysaccharide preparations. **Food Res. Int.** 38: 989-994, 2005.
- BASU, H. N., DEL VECCHIO, A. Encapsulated carotenoid preparations from high-carotenoid canola oil and cyclodextrins and their stability. **JAOCs.** 78: 375-380, 2001.
- BAYSAL, T., ERSUS, S., STARMANS, D. A. J. Supercritical CO₂ extration of β -carotene and lycopene from tomato paste waste. **J. Agric. Food Chem.** 48: 5507-5511, 2000.
- BÖHM, V. Use of column temperature to optimize carotenoid isomer separation by C₃₀ high performance liquid chromatography. **J. Sep. Sci.** 24: 955-959, 2001.
- BÖHM, V., PUSPITASARI-NIENABER, N. L., FERRUZZI, M. G. & SCHWARTZ, S. J. Trolox equivalent antioxidant capacity of different geometrical isomers of α -carotene, β -carotene, lycopene and zeaxanthin. **J. Agric. Food Chem.** 50: 221-226, 2002.
- BOILEAU, A.C., CLINTON, S. K., ERDMAN, J. W. JR. Tissue lycopene concentrations and isomer patterns are affected by androgen status and dietary lycopene concentration in male F344 rats. **J. Nutr.** 130:1613-1618, 2000.
- BOILEAU, A.C., CLINTON, S. K., ZARIPHEH, S., MONACO, M. H., DONOVAN, S. M., ERDMAN, J. W. JR. Testosterone and food restriction modulated hepatic lycopene isomer concentrations in male F344 rats. **J. Nutr.** 131: 1746-1752, 2001.
- BRADLEY, D. G., MIN, D. B. Singlet oxygen oxidation of foods. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.** 31: 211-236, 1992.
- BREITHAUPT, D. E., BAMEDI, A. Carotenoids and carotenoids esters in potatoes (*Solanum tuberosum* L): new insights into an ancient vegetable. **J. Agric. Food Chem.** 50: 7175-7181, 2002.
- BUSHWAY, R. J. Separation of carotenoids in fruits and vegetables by high performance liquid chromatography. **J. Liq. Chromatogr.** 8: 1527-1547, 1985.
- CHANDLER, L. A., SCHWARTZ, S. J. HPLC separation of *cis-trans* carotene isomers in fresh and processed fruits and vegetables. **J. Food Sci.** 52: 669-672, 1987.

- CHEN, B. H., TANG, Y. C. Processing and stability of carotenoid powder from carrot pulp waste. **J. Agric. Food. Chem.** 46: 2312-2318, 1998.
- CHEN, J. P., TAI, C. Y., CHEN, B. H. Improved liquid chromatographic method for determination of carotenoids in Taiwanese mango (*Mangifera indica* L.). **J. Chromatogr. A.** 1054: 261-268, 2004.
- CRAFT, N. E., SANDER, L. C., PIERSON, H. F. Separations and relative distribution of all-trans- β -carotene and *cis* isomers in β -carotene preparations. **J. Micronutr. Anal.** 8: 209-221, 1990.
- CONN, P. F., SCHALCH, W., TRUSCOTT, T. G. The singlet oxygen and carotenoid interaction. **J. Photochem. Photobiol. B: Biol.** 11:41-47, 1991.
- DESOBRY, S. A., NETTO, F. M., LABUZA, T. P. Comparison of spray-drying, drum-drying and freeze-drying for β -carotene encapsulation and preservation. **J. Food Sci.** 62: 1158-1162, 1997.
- DESOBRY, S. A., NETTO, F. M., LABUZA, T. P. Influence of maltodextrin systems at an equivalente 25 DE on encapsulated β -carotene loss during storage **J. Food Processing Preservation.** 23: 39-55, 1999.
- DI MASCIIO, P., KAISER, S., SIES, H. Lycopene as the most efficient biological carotenoid singlet oxygen quencher. **Arch. Biochem. Biophys.** 274: 532-538, 1989.
- DUNKLEY, W. L., FRANKLIN, J. D., PANGBORN, R. M. Effects of fluorescent light on flavor, ascorbic acid, and riboflavin in milk. **Food Technol.** 16: 112-118, 1962.
- EMENHISER, C., ENGLERT, G., SANDER, L. C., LUDWIG, B., SCHWARTZ, S. J. Isolation and structural elucidation of the predominant geometrical isomers of α -carotene. **J. Chromatogr. A.** 719: 333-343, 1996.
- FANG, L., PAJKOVIC, N., WANG, Y., GU, C., VAN BREEMEN, R. B. Quantitative analysis de lycopene isomers using HPLC-Tandem Mass Spectrometry. Apresentado no **13th International Carotenoid Symposium**, Estados Unidos. 2002. p.143.
- FERRUZZI, M. G., NGUYEN, M. L., SANDER, L. C., ROCK, C. L., SCHWARTZ, S. J. Analysis of lycopene geometrical isomers in biological microsamples by liquid chromatography with coulometric array detection. **J. Chromatogr. B.** 760: 289-299, 2001.
- FOOTE, C. S. Photosensitized oxygenation and the role of singlet oxygen. **ACC. Chem. Res.** 1: 104-110, 1968.
- FOOTE, C. S., CHANG, Y. C., DENNY, R. W. Chemistry of singlet oxygen. XI. *Cis-trans* isomerization of carotenoids by singlet oxygen and a probable quenching mechanism. **J. Am. Chem. Soc.** 92: 5218-5219, 1970.

- GÓMEZ-PRIETO, M. S., CAJA, M. M., HERRAIZ, M., SANTA-MARIA, G. Supercritical fluid extration of all-*trans*-lycopene from tomato. **J. Agric. Food Chem.** 51: 3-7, 2003.
- HACKETT, M. M., LEE, J. H., FRANCIS, D., SCHWARTZ, S. J. Thermal stability and isomerization of lycopene in tomato oleoresins from different varieties. **J. Food. Sci.** 69: 536-541, 2004.
- HADLEY, C. W., CLINTON, S. K., SCHWARTZ, S. J. Lycopene-free diets and tomato product consumption significantly alter plasma lycopene-isomers profiles. Apresentado no **13th International Carotenoid Symposium**, Estados Unidos. 2002. p. 140.
- HAKALA, S. H., HEINONEN, I. M. Chromatographic purification of natural lycopene. **J. Agric. Food Chem.** 42: 1314-1316, 1994.
- HENTSCHEL, V., KRANI, K., HOLLMANN, J., LINDHAUER, M. G., BÖHM, V., BITSCH, R. Spectrophotometric determination of yellow pigment content and evaluation of carotenoids by High-Performance Liquid Chromatography in durum wheat grain. **J. Agric. Food Chem.** 50: 6663-6668, 2002.
- HIRAYAMA, O., NAKAMURA, K., HAMADA, S., KOBAYASI, Y. Singlet oxygen quenchig ability of natural occuring carotenoids. **Lipids.** 29: 149-150, 1994.
- HUMPHRIES, J. M., KHACHIK, F. Distribution of lutein, zeaxanthin, and related geometrical isomers in fruit, vegetables, wheat, and pasta products. **J. Agric. Food Chem.** 51: 1322-1327, 2003.
- JENSEN, S. K., NIELSEN, K. N. Tocopherols, retinol, β -carotene and fatty acids in fat globule core in cows' milk. **J. Dairy Res.** 63: 565-574, 1996.
- KIMURA, M., RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. A scheme for obtaining standards and HPLC quantification of leafy vegetable carotenoids. **Food Chem.** 78: 389-398, 2002.
- LACRAJAN, I., DICHL, H. A., SOCACIU, C., ENGELKE, M., ZORN-KRUPPA, M. Carotenoid incorporation into natural membranes from artificial carriers: liposomes and β -cyclodextrins. **Chem. Phys. Lipids.** 112: 1-10, 2001.
- LEACH, G., OLIVEIRA, G., MORAIS, R. Spray-drying of *Dunaliella salina* to produce a β -caroteno rich powder. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.** 20: 82-85, 1998.
- LEE, M. T., CHEN, B. H. Stability of lycopene during heating and illumination in a model system. **Food Chem.** 78: 425-432, 2002.
- LEE, S. H., MIN, D. B. Effects, quenching mechanism, and kinectics of carotenoids in chlorophyll-sensitized photooxidation of soybean oil. **J. Agric. Food. Chem.** 38: 1630-1634, 1990.

- LI, T.-L., KING, J. M., MIN, D. B. Quenching mechanisms and kinetics of carotenoids in riboflavin photosensitized singlet oxygen oxidation of vitamin D₂. **J. Food. Biotechnol.** 24: 477-492, 2000.
- LIN, C.H., CHEN, B. H. Stability of carotenoids in tomato juice during storage. **Food Chem.** 90: 837-846, 2005.
- LING, S. M. O., PASSOS, M., FONTANA, J. D. Bixin and α -cyclodextrin inclusion complex and stability tests. **Proc. Biochem.** 40: 865-872, 2005.
- MANIERE, F. Y., DIMICK, P. S. Effect of fluorescent light on repartition of riboflavin in homogenized milk. **J. Dairy Sci.** 59: 2019-2023, 1976.
- MATIOLI, G., RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Licopeno Encapsulado em Goma Arábica e Maltodextrina: Estudo da Estabilidade. **Braz. J. Food Technol.**, 5: 197-203, 2002.
- MATIOLI, G., RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Microencapsulação do licopeno com ciclodextrinas. **Ciênc. Tecnol. Aliment. (supl.)**. 23: 102-105, 2003.
- MELE, A., MENDICHI, R., SELVA, A. Non-covalent associations of cyclomaltooligosaccharides (cyclodextrins) with *trans*- β -caroteno in water: evidence for the formation of large aggregates by light scattering and NMR spectroscopy. **Carbohydr. Res.** 310: 261-267, 1998.
- MELE, A., MENDICHI, R., SELVA, A., MOLNAR, P., TOTH, G. Non-covalent associations of cyclomaltooligosaccharides (cyclodextrins) with carotenoids in water. A study on the α - and β - cyclodextrin/ ψ , ψ -caotene (lycopene) systems by light scattering, ionspray ionization and tandem mass spectrometry. **Carbohydr. Res.** 337: 1129-1136, 2002.
- MENDES-PINTO, M. M., FERREIRA, A. C. S., OLIVEIRA, M. B. P. P., PINHO, P. G. Evaluation of some carotenoids in grapes by reversed and normal phase liquid chromatography: a qualitative analysis. **J. Agric. Food Chem.** 52: 3182-3188, 2004.
- MINGUEZ-MOSQUERA, M.I., JAREN-GALAN, M. Kinetics of the decolouring of carotenoid pigments. **J. Sci. Food Agric.** 67: 153 -161, 1995.
- MONTENEGRO, M. A., NAZARENO, M. A., DURANTINI, E. N., BORSARELLI, C. D. Singlet molecular oxygen quenching ability of carotenoids in a reverse-micelle membrane mimetic system. **Photochem. Photobiol.** 75: 353-361, 2002.
- MONTENEGRO, M. A., RIOS, A. O., MERCADANTE, A. Z., NAZARENO, M. A., BORSARELLI, C. D. Model studies on the photosensitized isomerization of bixin. **J. Agric. Food Chem.** 52: 367-373, 2004.
- MOROS, E. E., DARNOKO, D., CHERYAN, M., PERKINS, E. G., JERREL, J. Analysis of xanthophylls in corn by HPLC. **J. Agric. Food Chem.** 50: 5787-5790, 2002.

- NIIZU, P. Y., RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. A melancia como fonte de licopeno. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**. 62: 195-199, 2003.
- PANFILI, G., FRATIANNI, A., IRANO, M. Improved normal-phase high-performance liquid chromatography procedure for the determination of carotenoids in cereals. **J. Agric. Food Chem.** 52: 6373-6377, 2004.
- PFITZNER, I., FRAN CZ, P. I., BIESALSKI, H. K. Carotenoid:methyl- β -cyclodextrin formulations: an improved method for supplementation of cultured cells. **Biochim. Biophys. Acta**. 1474: 163-168, 2000.
- POLYAKOV, N. E., LESHINA, T.V., KONOVALOVA, T. A., HAND, E. O., KISPERT, L. D. Inclusion complexes of carotenoids with cyclodextrins: ^1H NMR, EPR, and optical studies. **Free Radic. Biol. Med.** 36: 872-880, 2004.
- QUACKENBUSH, F. W., SMALLIGGE, R. L. Nonaqueous reverse phase liquid chromatography system for separation and quantification of provitamin A. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.** 69: 767-772, 1986.
- RE, R., FRASER, P. D., LONG, M., BRAMLEY, P. M. & RICE-EVANS, C. Isomerization of lycopene in the gastric milieu. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 281: 576-581, 2001.
- RENKEN, S. A., WARTHESEN, J. J. Vitamin D stability in milk. **J. Food Sci.** 58: 552-556, 1993.
- RIOS, A. O., MERCADANTE, A. Z. Otimização das condições para obtenção de padrão de bixina e das etapas de extração e saponificação para quantificação de bixina em "snacks" extrusados por CLAE. **Alimentos e Nutrição**. 15: 203-213, 2004.
- ROBERT, P., CARLSSON, R. M., ROMERO, N., MASSON, L. Stability of spray-dried encapsulated carotenoid pigments from Rosa Mosqueta (*Rosa rubiginosa*) oleoresin. **JAACS**. 80: 1115-1120, 2003.
- SANDER, L. C., SHARPLESS, K. E., CRAFT, N. E., WISE, S. A. Development of engineered stationary phases for the separation of carotenoid isomers. **Anal. Chem.** 66: 1667-1674, 1994.
- SANDER, L. C., SHARPLESS, K. E. & PURSCH, M. C_{30} stationary phases for the analysis of food by liquid chromatography. **J. Chromatogr. A**. 880: 189-202, 2000.
- SCOTTER, M. J., THORPE, S. A., REYNOLDS, S. L., WILSON, L. A., STRUTT, P. R. Characterization of the principal colouring components of annatto using high performance liquid chromatography with photodiode-array detection. **Food Addit. Contamin.** 11: 301-315, 1994.

- SHARMA, S. K., LE MAGUER, M. Kinetics of lycopene degradation in tomato pulp solids under different processing and storage conditions. **Food Res. Int.** 29: 309-315, 1996.
- SHI, J., LE MAGUER, M., KAKUDA, Y., LIPTAY, A., NIEKAMP, F. Lycopene degradation and isomerization in tomato dehydration. **Food Res. Int.** 32: 15-21, 1999.
- STAHL, W., SIES, H. Physical quenching of singlet oxygen and *cis-trans* isomerization of carotenoids. **Ann. New York Acad. Sci.** 691: 10-19, 1993.
- STRATTON, S. P., SCHAEFER, W. H., LIEBLER, D. C. Isolation and identification of singlet oxygen oxidation products of β -caroten. **Chem. Res. Toxicol.** 6: 542-547, 1993.
- TANG, Y. C., CHEN, B. H. Pigment change of freeze-dried carotenoid powder during storage. **Food Chem.** 69: 11-17, 2000.
- TSUKIDA, K., SAIKI, K., TAKII, T., KOYAMA, Y. Separation and determination of *cis/trans*- β -carotenes by high-performance liquid chromatography. **J. Chromatogr.** 245: 359-364, 1982.
- UKAI, N., LU, Y., ETOH, H., YAGI, A., INA, K., OSHIMA, S., OJIMA, F., SAKAMOTO, H., ISHIGURO, Y. Photosensitized oxygenation of lycopene. **Biosci. Biotech. Biochem.** 58:1718-1719, 1994.
- UPDIKE, A. A., SCHWARTZ, S. J. Thermal processing of vegetables increases *cis* isomers of lutein and zeaxanthin. **J. Agric. Food Chem.** 51: 6184-6190, 2003.
- VECCHI, M., ENGLERT, G., MAURER, R., MEDUNA, V. Trennung und charakterisierung von β -carotin-isomeren. **Helv. Chim. Acta.** 64: 2746-2758, 1981.
- WAGNER, L. A., WARTHESEN, J. J. Stability of spray-dried encapsulated carrot carotenes. **J. Food Sci.** 60: 1048-1053, 1995.
- WHITED, L. J., HAMMOND, B.H., CHAPMEN, K. W., BOOR, K. J. Vitamin A degradation and light-oxidized flavor defects in milk. **J. Dairy Sci.** 85: 351-354, 2002.
- WILKINSON, F. Rate constants for the decay and reactions of the lowest electronically excited singlet state of molecular oxygen in solution. An expanded and revised compilation. **J. Phys. Chem.** 24: 663-1021, 1995.
- ZANATTA, C. F., DE ROSSO, V. V., MERCADANTE, A. Z. Obtenção de cristais de alta pureza de alfa- e beta-caroteno. **V Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos**, Campinas. 2003.

CAPÍTULO 2

OBTENÇÃO DE CRISTAIS DE LICOPENO A PARTIR DE DESCARTE DE TOMATE

**TRABALHO PUBLICADO NA REVISTA “CIÊNCIA E TECNOLOGIA
DE ALIMENTOS”**

OBTENÇÃO DE CRISTAIS DE LICOPENO A PARTIR DE DESCARTE DE TOMATE¹

Itaciara L. NUNES², Adriana Z. MERCADANTE^{2,*}

RESUMO

As pesquisas com licopeno têm sido intensificadas uma vez que o consumo de alimentos ricos neste caroteno, como tomate e seus produtos, tem sido associado com o menor risco de desenvolvimento de câncer de próstata. Os objetivos deste trabalho foram (1) desenvolver e otimizar um método para extração de licopeno a partir de descarte de tomate, (2) utilizar este método na obtenção de licopeno a partir de diferentes coletas de tomate, (3) obter cristais de licopeno puro e (4) acompanhar o processo de purificação de licopeno por cromatografia líquida de alta eficiência em coluna C₃₀. O método desenvolvido e otimizado através de planejamento experimental fatorial para a obtenção de licopeno consistiu de uma etapa preliminar para retirada de água do tomate, com 4 extrações de 30 minutos, cada uma com 30mL de etanol, seguido por 4 extrações de 120 minutos com acetato de etila e relação massa/volume de 1:0,7. O teor de carotenóides médio (calculado como licopeno) obtido de 6 lotes de tomate foi de 59,2 ± 21,8µg/g. Através de duas cristalizações sucessivas obteve-se licopeno com 98% de pureza. A análise por CLAE mostrou a presença de traços dos isômeros 5-*cis*, 5'-*cis*- e 13-*cis*-licopeno no cristal de licopeno.

Palavras-chave: licopeno; descarte de tomate; extração; cristalização; microscopia; cromatografia líquida de alta eficiência.

SUMMARY

PRODUCTION OF LYCOPENE CRYSTALS FROM TOMATO WASTE. Over the past few years, research regarding lycopene has intensified since the consumption of lycopene rich foods such as tomato and tomato products has been associated with reduced risks of developing prostate cancer. Thus the objectives of this research were (1) develop and optimise methodology for the extraction of lycopene from tomato waste, (2) use the methodology to obtain lycopene from different tomato batches, (3) produce high purity lycopene crystals and (4) follow the purification process of lycopene using high performance liquid chromatography on a C₃₀ column. The method developed to obtain lycopene from tomato residue, and optimised using a factorial experimental design, consisted of a preliminary water removal step with four 30-minute extractions, each with 30mL ethanol, followed by four 120-minute extractions with ethyl acetate, each extraction with a mass/volume ratio of 1:0.7. The mean carotenoid content (calculated as lycopene), obtained from 6 tomato pickings, was 59.2 ± 21.8µg/g. Lycopene with 98% purity was obtained from two successive crystallisation processes. HPLC analysis showed the presence of traces of the 5-*cis*, 5'-*cis*- and 13-*cis*-lycopene isomers in the lycopene crystal.

Keywords: lycopene; tomato waste; extraction; microscopy; high performance liquid chromatography.

1 – INTRODUÇÃO

Os carotenóides são pigmentos naturais, com coloração variando do amarelo ao vermelho, que têm sido largamente utilizados como corantes em alimentos, bebidas, cosméticos e rações animais. Além disso, estes pigmentos possuem comprovada atividade de vitamina A e existem evidências de outras propriedades biológicas, terapêuticas e preventivas de vários tipos de distúrbios e enfermidades em humanos [20, 33]. Nos últimos anos, o interesse por licopeno tem aumentado, uma vez que o consumo de alimentos ricos neste caroteno, como tomate e seus produtos, bem como altas concentrações de licopeno no sangue foram associadas ao menor risco de desenvolvimento de câncer de próstata [12, 14, 15, 24].

As principais fontes industriais de carotenóides são a síntese química e a extração a partir de plantas, como urucum (*Bixa orellana*), e da microalga *Dunaliella salina*.

Várias empresas comercializam alguns padrões de carotenóides para fins analíticos. Entretanto, estes padrões possuem um alto custo e vida-útil reduzida, uma vez que após abertura da embalagem ocorre formação de isômeros e produtos de oxidação devido ao longo sistema de ligações duplas conjugadas presente nos carotenóides [6].

Os trabalhos encontrados na literatura, em sua maioria, enfocam a extração e análise quantitativa de carotenóides, geralmente realizada em equipamentos de pequeno porte, como liquidificador, homogeneizador e agitador para ruptura mecânica, utilizando pequena quantidade de amostra e acetona como solvente para extração de licopeno [17, 18, 28, 29].

CEREZAL & PIÑERA [8] relataram diferentes métodos de obtenção de carotenóides a partir de resíduos de frutas cítricas, utilizando solventes orgânicos (acetona ou hexano) ou d-limoneno, seguida ou não de saponificação, neutralização com fosfato ácido de potássio e precipitação com iso-propanol ou cromatografia de coluna aberta de permeação em gel. Dependendo do resíduo utilizado, o rendimento variou de 23 a 100%.

Extração seletiva em duas etapas, a 50°C em "shaker", de carotenóides e compostos de pungência (capsaicinóides) a partir de pimenta seca moída foi avaliada por SANTAMARÍA et al. [26]. Na primeira etapa, com 30% de etanol aquoso, foram extraídos 62% de

¹ Recebido para publicação em 06/08/2003. Aceito para publicação em 21/06/2004 (001185). (Parte da tese de Doutorado da 1ª autora, junto ao curso de Pós-graduação em Ciência de Alimentos da FEA/UNICAMP).

² Departamento de Ciência de Alimentos – Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP. Cx. Postal 6121, CEP: 13083-970, Campinas-SP. E-mail: azm@fea.unicamp.br.

* A quem a correspondência deve ser enviada.

capsaicinóides e houve pequena remoção de carotenóides (1,4%). Na extração subsequente com etanol comercial foram recuperados 26% de capsaicinóides e 70% de carotenóides. Quando foi realizado um pré-tratamento com enzimas celulolíticas e pectinolíticas houve um aumento para 83% na recuperação de carotenóides.

Extração de licopeno com óleo de girassol a partir de resíduos do processamento de pasta e de suco de tomate previamente submetidos a tratamento térmico (100-125°C) e saponificação com hidróxido de potássio etanólico, foi descrita em uma patente russa [13].

Diante dos fatos expostos acima e considerando que o descarte de vegetais e frutas na CEASA – Campinas (Centrais de Abastecimento de Campinas S/A) atinge em média 7,8 mil toneladas/ano, este trabalho teve como objetivos (1) desenvolver e otimizar um método simples para extração de licopeno a partir de descarte de tomate, (2) utilizar este método na obtenção de licopeno a partir de diferentes coletas de tomate, (3) obter cristais de licopeno com alto grau de pureza através de procedimento de baixo custo e (4) acompanhar o processo de purificação de licopeno por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em coluna C₃₀.

2 – MATERIAL E MÉTODOS

2.1 – Amostras

As amostras de descarte de tomate (≈5 Kg) foram coletadas na CEASA-Campinas, Brasil, após uma pré-separação manual de jornais, caixas, outros materiais recicláveis e orgânicos, durante o período de junho de 2002 a março de 2003, totalizando 6 lotes.

2.2 – Medidas físico-químicas

Após a esterilização dos tomates (121°C/15min) a amostra foi homogeneizada, colocada em cubeta (2cm) e realizada avaliação de cor em colorímetro Hunter (modelo ColorQuest II) com calibração RSIN (Reflectância Especular Incluída), iluminante D65 e ângulo de observação de 10°, utilizando-se a escala CIELAB. Foram realizadas seis leituras de cor de cada amostra e calculada a média e o desvio padrão dos parâmetros luminosidade (L*), índice de saturação vermelho (a*) e índice de saturação amarelo (b*). Os valores de Chroma e hue foram calculados segundo ARIAS et al. [2].

As medidas de pH foram realizadas em pHmetro Tecnal (modelo Tec-2); os valores de °Brix foram obtidos em refratômetro Atago (modelo 8572) e corrigidos utilizando-se a tabela de correção de temperatura para 20°C. Todas as análises foram realizadas em triplicata, de acordo com a AOAC [1].

2.3 – Obtenção do extrato rico em licopeno

2.3.1 – Retirada de água

Testes preliminares mostraram a necessidade de um pré-tratamento para retirada da água presente no

tomate antes da extração dos carotenóides. Através de um planejamento fatorial completo 2⁴, com pontos centrais, testou-se tipo de solvente (metanol e etanol), volume de solvente (30 e 60mL), bem como tempo (30 e 60min) e número de extrações (2 e 4) para que o extrato final ficasse livre de água. Esta etapa foi realizada em mesa agitadora (Tecnal, TE-140) à temperatura ambiente, utilizando 30g de amostra. O álcool contendo água foi descartado.

A retirada de água foi seguida de extração com acetato de etila e concentração em evaporador rotatório (T < 35°C), verificando-se a presença ou não de água residual no extrato. A resposta, percentual de água no extrato, foi determinada por diferença de peso, antes e após secagem do extrato (110°C em estufa até peso constante).

Todos os experimentos foram conduzidos em duplicata.

2.3.2 – Extração de licopeno

Após testes preliminares, verificou-se que os solventes com maior potencial de extração de licopeno foram diclorometano, acetona e acetato de etila. Porém, para verificar as variáveis significativas na extração de licopeno foram utilizados como solventes o acetato de etila e etanol comercial, tendo em vista que o diclorometano é um solvente clorado, e, assim como a acetona, controlado pela Polícia Federal no Brasil. Na época do desenvolvimento deste trabalho, o acetato de etila não era controlado. A escolha do etanol se deve ao seu baixo custo no Brasil.

Foram realizados dois planejamentos fatoriais fracionários 2⁴⁻¹, um utilizando acetato de etila como solvente de extração e outro etanol, para verificar os efeitos de alguns fatores na concentração do extrato rico em licopeno (Tabela 1). Todos os experimentos foram conduzidos em duplicata em mesa agitadora (150rpm) à temperatura ambiente.

TABELA 1. Fatores e níveis estudados na etapa de extração de licopeno.

Fatores	Níveis	
	-1	+1
Número de extrações	2	4
Esterilização	com	sem
Relação massa de tomate/volume de solvente	1: 0,7	1:2
Tempo de extração	30 min*/20h**	120 min*/24h**

*tempo de extração com acetato de etila

**tempo de extração com etanol

Para otimização das condições de extração foi, posteriormente, realizado um planejamento 2² completo com pontos centrais e axiais somente com os fatores significativos.

A quantificação dos extratos foi realizada em espectrofotômetro Beckman (modelo DU-70) através da leitura no comprimento de onda de máximo de absor-

ção em éter de petróleo e a concentração de licopeno foi calculada utilizando absorvividade de 3450 [9].

2.4 - Purificação do extrato rico em licopeno

Devido ao alto custo das fases estacionárias para cromatografia, escolheu-se a cristalização como método para purificação de licopeno.

O extrato foi dissolvido em diclorometano/etanol (1:4) a temperatura de 50-60°C, colocado em banho de gelo para abaixamento gradual da temperatura e em seguida levado ao freezer por uma noite para a formação dos cristais. Os cristais foram filtrados em papel Whatman Chr 3mm, lavados com etanol gelado, e secos em estufa a vácuo à temperatura ambiente. O procedimento de cristalização foi novamente realizado para obtenção de cristais com maior teor de pureza.

2.5 - Análise de carotenóides por CLAE

Foi utilizado um cromatógrafo líquido de alta eficiência com sistema quaternário de bombeamento de solventes (Waters, modelo controller 600), detector de arranjo de diodos (Waters, modelo 996), injetor "Rheodyne" com alça de amostra de 20µL, forno externo com controle de temperatura, degasificador "on line" e sistema de aquisição e processamento de dados Millentium (Waters, versão 3.05.01). Os espectros foram adquiridos entre 250 e 600nm e os cromatogramas processados no comprimento de onda máximo (λ_{max}) de cada carotenóide.

Os carotenóides foram separados em coluna C₃₀ polimérica da marca YMC (3µm, 250 x 4,6mm) com MeOH (0,1% trietilamina (TEA))/éter *t*-metil butílico (TBME) (50:50) em modo isocrático a 1mL/min como fase móvel e temperatura da coluna mantida a 33°C.

Todos os solventes utilizados foram grau cromatográfico e previamente filtrados em sistema Millipore de filtração a vácuo, com membrana para solvente orgânico de 0,45µm. Todas as amostras foram filtradas em membrana de polietileno com 0,22µm de poro.

A caracterização dos carotenóides foi baseada nos seguintes parâmetros: (1) ordem de eluição na coluna C₃₀, (2) comparação das características dos espectros no UV-visível (λ_{max} , grau de estrutura fina (%III/II) e intensidade do pico *cts* (% A_B/A_U)) com dados da literatura [7, 19, 23] e (3) comparação com padrões de all-*trans*- γ -caroteno, all-*trans*- β -caroteno, 5-*cis*-, 9-*cis*-, 13-*cis*- e all-*trans*-licopeno cedidos pela Roche Vitamins (Suíça).

2.6 - Análises microscópicas

2.6.1 - Microscopia óptica

Amostras de cristais de licopeno natural e licopeno sintético (Roche Vitamins) foram montadas individualmente sobre lâminas, em óleo de silicone, óleo de imersão ou a seco e cobertas com laminula e observadas ao microscópio óptico (Carlzeiss, modelo Jenaval), sob luz normal ou polarizada.

As imagens geradas no microscópio óptico foram capturadas por câmera utilizando-se o Software Global Lab Image 3.0.

2.6.2 - Microscopia eletrônica de varredura

As amostras mencionadas acima foram aspergidas sobre fita metálica adesiva de dupla face, colocadas sobre suportes metálicos e recobertas com ouro (240s/40mA) em metalizador a vácuo (Balzers). As micrografias foram obtidas no microscópio Jeol, modelo T-300, sob aceleração de 15KV através de captura de imagem.

2.7 - Análise estatística

Os planejamentos experimentais foram analisados pelo programa Statistica 5.0 [31].

3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 - Condições otimizadas para obtenção do extrato rico em licopeno

Os resultados do planejamento experimental fatorial, apresentados na Tabela 2, mostraram uma eficiência de 1 a 75% na retirada de água do tomate.

Dos fatores avaliados, o volume de solvente e tempo de extração não tiveram efeito significativo na resposta (Tabela 3), e conseqüentemente foram fixados nos seus níveis inferiores. Por outro lado, o efeito do tipo de solvente e número de extrações foi significativo, sendo o etanol e 4 extrações as melhores condições para retirada de água, como pode ser verificado nos ensaios 6, 8 e 14 (Tabela 2).

TABELA 2. Condições experimentais do planejamento fatorial completo e respostas para a etapa de retirada de água.

Ensaios	Fatores				Respostas	
	Solvente	Volume de solvente (mL)	Número de extrações	Tempo de extração (min)	R1	R2
1	MeOH	30	2	30	94,5	94,4
2	EtOH	30	2	30	96,3	95,0
3	MeOH	60	2	30	94,2	94,9
4	EtOH	60	2	30	91,4	88,3
5	MeOH	30	4	30	84,0	81,7
6	EtOH	30	4	30	25,5	26,3
7	MeOH	60	4	30	39,6	43,5
8	EtOH	60	4	30	35,7	32,8
9	MeOH	30	2	60	97,4	95,9
10	EtOH	30	2	60	98,5	99,0
11	MeOH	60	2	60	96,1	97,2
12	EtOH	60	2	60	94,6	97,7
13	MeOH	30	4	60	41,6	43,3
14	EtOH	30	4	60	27,0	24,8
15	MeOH	60	4	60	29,1	28,6
16	EtOH	60	4	60	44,5	44,0
17	MeOH	45	3	45	85,4	84,9
18	MeOH	45	3	4	81,5	82,8
19	MeOH	45	3	45	84,3	83,3
20	EtOH	45	3	45	56,1	55,9
21	EtOH	45	3	45	54,3	55,3
22	EtOH	45	3	45	57,5	56,8

Resposta: % de água remanescente no extrato.

TABELA 3. Efeitos dos fatores na etapa de retirada de água do tomate.

	Efeitos	p
Solvente	-13,65*	0,00
Volume de solvente (mL)	-4,56	0,15
Número de extrações	-54,60*	0,00
Tempo de extração (min)	-3,66	0,25

*p<0,05 (estatisticamente significativo a 95% de confiança)

Portanto, nos níveis estudados, as melhores condições de retirada de água do tomate foram obtidas quando foram realizadas 4 extrações de 30 minutos cada, utilizando 30mL de etanol por extração.

HAKALA & HEINONEN [17] adicionaram Na₂SO₄ como dessecante junto com os solventes testados, éter de petróleo e acetona, para extrair licopeno de purê de tomate. Entretanto, os autores não mencionaram a quantidade de dessecante acrescentada.

Quanto à extração de licopeno, através dos resultados obtidos a partir dos planejamentos experimentais fracionários 2⁴⁻¹ (Tabela 4), foi possível verificar que a concentração de licopeno variou de 30,4 a 114,4µg/g, quando acetato de etila foi utilizado como solvente e de 2,6 a 14,6µg/g com etanol, mostrando que a extração com acetato de etila foi significativamente mais eficiente.

TABELA 4. Condições experimentais dos planejamentos fatoriais fracionários e respostas para a etapa de extração de carotenóides com etanol e acetato de etila.

Ensaios	Fatores				Respostas ^a		Respostas ^b	
	Nº de extrações	Esterilização	Relação massa/volume	Tempo de extração min ^a ou horas ^b	R1	R2	R1	R2
1	2	Sim	1:0,7	30 ^a ou 20 ^b	30,4	31,3	2,6	2,7
2	4	Sim	1:0,7	120 ^a ou 24 ^b	114,4	102,5	8,2	7,4
3	2	Não	1:0,7	120 ^a ou 24 ^b	46,5	47,2	5,00	4,8
4	4	Não	1:0,7	30 ^a ou 20 ^b	53,7	50,1	6,0	5,7
5	2	Sim	1:2	120 ^a ou 24 ^b	85,2	83,8	8,0	7,9
6	4	Sim	1:2	30 ^a ou 20 ^b	52,9	55,1	10,8	10,3
7	2	Não	1:2	30 ^a ou 20 ^b	44,1	45,7	7,1	6,8
8	4	Não	1:2	120 ^a ou 24 ^b	58,9	56,8	14,3	14,6

^aExtração com acetato de etila.^bExtração com etanol.

Resposta: concentração (µg/g) de carotenóides totais, calculada como licopeno.

Quando etanol foi utilizado para a extração, todos os fatores no nível superior acarretaram aumento significativo na concentração de licopeno (Tabela 5), como mostram os ensaios 2, 6 e 8 da Tabela 4.

Para a extração com acetato de etila, o tempo e o número de extrações foram também significativos (Tabela 5) levando a um aumento na concentração de licopeno quando em seu nível superior (ensaios 2 e 8 da Tabela 4). A relação massa/volume não apresentou efeito significativo.

O uso de esterilização também teve um efeito significativo implicando em maior extração de licopeno,

tanto com acetato de etila como com etanol (Tabela 5). Este fato já era esperado uma vez que o processamento térmico pode ocasionar a ruptura da parede celular e conseqüente redução das forças de interação entre o licopeno e a matriz tecidual, tornando o pigmento mais acessível à extração [30].

TABELA 5. Efeitos dos fatores para a etapa de avaliação das condições de extração de carotenóides utilizando acetato de etila ou etanol.

	Etanol		Acetato de etila	
	Efeitos	p	Efeitos	p
Nº extrações	4,05*	0,00	16,28	0,07
Esterilização	0,81	0,06	-19,07*	0,04
Relação massa/volume	4,68*	0,00	0,79	0,92
Tempo (min)	2,28*	0,00	28,99*	0,00

* p<0,05 (estatisticamente significativo a 95% de confiança)

A extração foi otimizada através de um novo planejamento fatorial completo 2² aumentando o número de extrações e o tempo de cada extração (Tabela 6), sendo fixados os fatores não significativos em seus níveis inferiores (relação massa/volume de 1:0,7 e uso de esterilização) e acetato de etila como solvente de extração.

TABELA 6. Condições experimentais do planejamento fatorial completo e respostas para a etapa de otimização da extração de carotenóides com acetato de etila.

Ensaios	Fatores		Respostas	
	Tempo de extração (min)	Número de extrações	R1	R2
1	60	2	48,55	52,03
2	180	2	84,93	81,59
3	60	6	83,77	83,04
4	180	6	100,43	92,80
5	50	4	47,75	49,56
6	205	4	80,87	87,39
7	120	1	27,93	26,99
8	120	7	110,4	108,12
9	120	4	100,43	95,51
10	120	4	104,06	104,93

Resposta: concentração (µg/g) de carotenóides totais, calculada como licopeno.

Na curva de nível, apresentada na Figura 1, pode-se verificar três pontos na região ótima de extração de licopeno. Estes pontos ótimos apresentam diferentes condições: 4 extrações de 120 minutos, 7 extrações de 120 minutos e 6 extrações de 180 minutos, obtendo-se cerca de 100µg de licopeno/g de tomate esterilizado.

Consequentemente, foi escolhido, como a melhor condição, o uso de 4 extrações de 120 minutos, tendo em vista o menor tempo total de análise e o menor gasto de solvente.

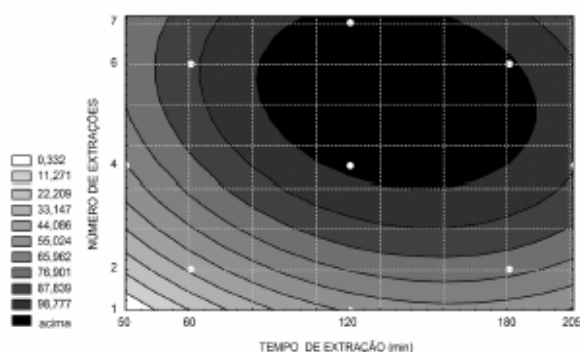


FIGURA 1. Curva de nível para a concentração de carotenóides totais ($\mu\text{g/g}$), em função do número de extrações e tempo de extração.

Não foi possível comparar a eficiência do método desenvolvido no presente estudo com a literatura, pois nenhum dos métodos disponíveis para obtenção de licopeno foi desenvolvido através de planejamentos fatoriais. Cabe esclarecer que o objetivo deste trabalho foi obter maior quantidade de licopeno com o menor gasto de solvente. Deste modo, em nenhum momento foi feita extração exaustiva de carotenóides, e a maior parte das xantofilas foi descartada com o etanol na etapa de retirada de água.

3.2 - Cristais de licopeno

As Figuras 2 e 3 apresentam, respectivamente, os cromatogramas do extrato rico em licopeno e dos cristais obtidos após a 1ª e 2ª cristalização. A Tabela 7 mostra a identidade dos picos presentes nestas figuras.

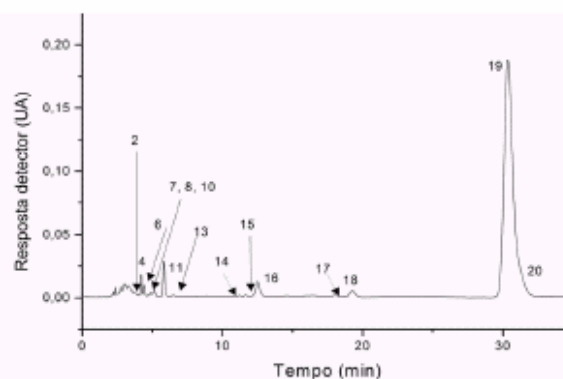


FIGURA 2. Cromatograma obtido por CLAE do extrato rico em licopeno. Condições: coluna C_{30} YMC, fase móvel MeOH (0,1% TEA)/TBME (50:50), fluxo de 1mL/min e temperatura da coluna de 33°C. Processamento no λ_{max} . A identidade dos picos está apresentada na Tabela 7.

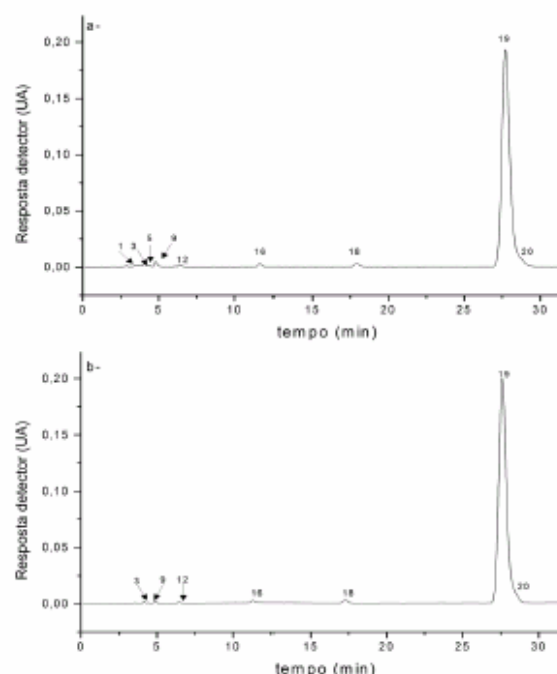


FIGURA 3. Cromatograma, obtido por CLAE, dos cristais de licopeno após: a- 1ª cristalização, b- 2ª cristalização. Condições: coluna C_{30} , fase móvel MeOH (0,1% TEA)/TBME (50:50), fluxo de 1mL/min e temperatura da coluna de 33°C. Processamento no λ_{max} . A identidade dos picos está apresentada na Tabela 7.

TABELA 7. Principais características, obtidas por CLAE, dos carotenóides presentes no extrato rico em licopeno e nos cristais de licopeno.

Nº pico ^a	Carotenóides	t _R (min)	λ_{max} (nm) ^b	%III/II	% Aa/Ai
1	mistura	3,5	385, 405, 429	-	-
2	mistura	4,0	431, 454, 485	-	-
3	não identificado	4,1	404, 424, 448	20	0
4	mistura	4,2	403, 428, 452	-	-
5	não identificado	4,3	411, 433, 460	57	0
6	cis-fitoflueno	4,4	332, 347, 365	58	-
7	fitoflueno	4,7	332, 347, 365	71	-
8	não identificado	4,9	277, 344, 434, 456	25	20
9	não identificado	5,0	343, 412, 435, 463	61	15
10	não identificado	5,1	339, (423), 449, (471)	0	39
11	all-trans- β -caroteno	5,8	(423), 452, 479	27	0
12	all-trans- δ -caroteno	6,4	345, 433, 457, 487	70	0
13	mistura	6,5	337, (416), 447, 474	-	-
14	15-cis-licopeno	11,2	359, 443, 468, 500	50	75
15	all-trans- γ -caroteno	11,5	349, 435, 460, 489	50	0
16	13-cis-licopeno	12,5	359, 440, 465, 496	48	52
17	9-cis-licopeno	18,1	361, 440, 466, 498	69	13
18	5-cis,5'-cis-licopeno	19,3	361, 445, 471, 503	65	8
19	all-trans-licopeno	30,4	362, 446, 472, 503	74	6
20	5-cis-licopeno	31,2	362, 446, 472, 503	74	6

^a Numeração de acordo com os cromatogramas das Figuras 2 e 3.

^b Solvente: metanol (0,1% trietilamina)/éter tert-butílico (50:50).

Os isômeros 15-*cis*- (pico 14), 13-*cis*- (pico 16), 9-*cis*- (pico 17) e 5-*cis*-licopeno (pico 20) foram identificados por comparação da ordem de eluição em coluna C_{30} com a literatura [10, 21, 25], e dos $\lambda_{\max}$ e forma do espectro com dados previamente relatados [19, 23, 27]. A identidade destes isômeros foi confirmada com padrões.

Comparando as informações do espectro de absorção com a literatura [27] e considerando que a intensidade do pico *cis* é menor para os isômeros em posição próxima dos grupos terminais, o pico 18 foi tentativamente identificado como 5-*cis*,5'-*cis*-licopeno. À medida que a intensidade do pico *cis* vai aumentando (Tabela 7), a isomeria está provavelmente localizada mais ao centro da cadeia poliénica, como nos isômeros 9-*cis*- (pico 17), 13-*cis*- (pico 16) e 15-*cis*-licopeno (pico 14).

O all-*trans*- β -caroteno (pico 11) e all-*trans*- γ -caroteno (pico 15) apresentaram características espectrais similares às relatadas na literatura [7, 23] e às dos padrões autênticos, inclusive o mesmo tempo de retenção. As propriedades dos espectros do all-*trans*- δ -caroteno (pico 12) e do all-*trans*-fitoflueno (pico 7) foram similares às encontradas por BRITTON [7]. Como esperado para carotenóides com 5 ligações duplas conjugadas, o *cis*-fitoflueno (pico 6) apresentou $\lambda_{\max}$ igual ao isômero *trans* e menor grau de estrutura fina.

Utilizando coluna C_{30} , de 4 a 10 isômeros *cis* de licopeno foram separados em vários trabalhos [4, 5, 11], entretanto, com exceção do all-*trans*-licopeno [4, 5, 11] e do prolicopeno [11], os demais isômeros não foram identificados nestes estudos.

No extrato rico em licopeno obtido no presente estudo, o all-*trans*-licopeno perfaz 71% da área dos carotenóides. Após a 1ª cristalização, a porcentagem de pureza ficou em torno de 96% e com a 2ª cristalização atingiu 98% de pureza, semelhante à pureza do padrão de licopeno sintético (Roche Vitamins) que foi de 99%.

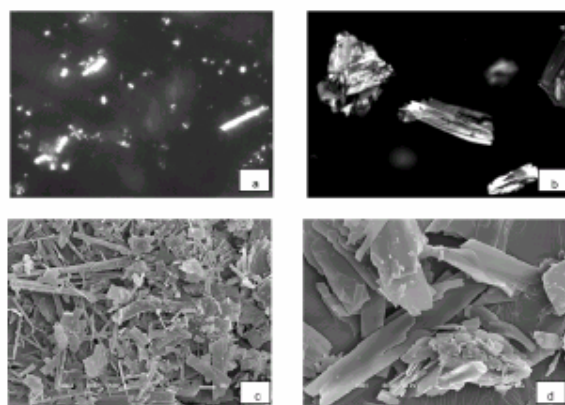


FIGURA 4. Microscopia óptica: a) cristais de licopeno natural sob luz polarizada, b) cristais de licopeno sintético sob luz polarizada. Microscopia eletrônica de varredura: c) cristais de licopeno natural, d) cristais de licopeno sintético. Aumento 800x.

HAKALA & HEINONEN [17], utilizando Sep-pak de sílica e CLAE com coluna C_{18} como método de purificação de licopeno, atingiram 97% de pureza somente após a terceira cromatografia semi-preparativa.

Como alternativa à extração com solventes e purificação, GÓMEZ-PRÍETO et al. [16] utilizaram CO_2 com fluxo de 4 mL/min a 40°C sem modificador, obtendo um extrato com 88% de all-*trans*-licopeno e 12% de *cis*-licopeno a partir de tomate liofilizado.

Tanto os cristais de licopeno natural obtidos neste trabalho, como os sintéticos, apresentaram formas cristalinas irregulares, predominando as formas prismáticas alongadas. Os cristais sintéticos atingiram cerca de 3,25 μm (Figuras 4b e 4d) e os naturais chegaram a medir 1,75 μm (Figura 4c), mas nestes predominaram cristais com tamanho abaixo de 1 μm (Figura 4a).

3.3 – Teores de licopeno em descarte de tomate

Nas amostras de descarte de tomate cru os valores médios de pH variaram de 4,41 a 4,61 e entre 4,32 e 4,50 para as amostras esterilizadas. Os valores de °Brix ficaram entre 3,8 e 4,0 para ambas as amostras. Estes valores se encontram dentro da faixa de pH (4,4 a 4,6) e °Brix (3,8 a 4,6) reportada para tomate cru [32].

Através dos valores apresentados na Tabela 8 pode-se verificar uma variação de 28,4 a 93,5 $\mu g/g$ na concentração de carotenóides totais (calculado como licopeno) entre os 6 lotes de amostras coletados no período de 10 meses. O teor muito menor de licopeno da amostra coletada em março pode estar relacionado à alta precipitação pluviométrica ocorrida nos 3 meses anteriores (CEPAGRI, comunicação pessoal). Embora seja comprovado que a concentração de carotenóides varia em função da variedade/cultivar, época do ano e localização geográfica [3, 18, 22], não é possível fazer esta relação no presente estudo uma vez que foi utilizado descarte de tomate onde não há qualquer controle destas variáveis.

O teor médio de carotenóides, obtido no presente estudo, 59,2 $\pm$ 21,8 $\mu g/g$, foi maior do que o encontrado em tomate (41,4 $\pm$ 20,1 $\mu g/g$) cultivar Santa Cruz comercializado em Campinas, Brasil [32]. YANG et al. [34] encontraram teor de 26,1 $\mu g/g$ em tomate vermelho. A concentração de licopeno em tomate analisado na Finlândia variou de 38 a 66 $\mu g/g$ no período de verão, enquanto no período de outubro a março (outono) os teores encontrados foram de 26 a 31 $\mu g/g$ [18]. Cabe lembrar que nestes três trabalhos a extração foi quantitativa, enquanto que em nosso estudo a extração não foi exaustiva.

Os valores de parâmetros de cor dos tomates esterilizados estão apresentados na Tabela 8. No presente estudo, o parâmetro a^* foi o que apresentou as mais altas correlações com a concentração de licopeno (0,84), quando utilizada regressão linear e 0,86, quando utilizada regressão exponencial. A correlação entre teor de licopeno e os valores dos demais parâmetros foi menor que 0,80, tanto para regressão linear como exponencial.

TABELA 8. Teores de licopeno ($\mu\text{g/g}$) e parâmetros Cielab de cor dos tomates esterilizados coletados em diferentes épocas do ano.

Período de coleta das amostras	licopeno ($\mu\text{g/g}$) ^a	L*	a*	b*	a*/b*	(a*/b*) ²	Chroma	hue
Junho	67,0 $\pm$ 2,8	37,1 $\pm$ 0,4	20,3 $\pm$ 0,4	16,1 $\pm$ 0,7	1,3 $\pm$ 0,1	1,6 $\pm$ 0,2	25,9 $\pm$ 0,5	1,0 $\pm$ 0,1
Agosto	61,0 $\pm$ 2,3	36,9 $\pm$ 0,4	19,8 $\pm$ 0,7	17,3 $\pm$ 0,8	1,1 $\pm$ 0,1	1,3 $\pm$ 0,2	26,3 $\pm$ 0,5	0,8 $\pm$ 0,1
Outubro	59,6 $\pm$ 1,1	37,1 $\pm$ 0,5	18,6 $\pm$ 1,0	16,7 $\pm$ 0,8	1,1 $\pm$ 0,1	1,2 $\pm$ 0,0	25,0 $\pm$ 1,1	0,8 $\pm$ 0,1
Dezembro	45,7 $\pm$ 1,4	38,0 $\pm$ 0,5	17,4 $\pm$ 0,9	16,3 $\pm$ 0,8	1,1 $\pm$ 0,1	1,1 $\pm$ 0,0	23,8 $\pm$ 0,2	0,7 $\pm$ 0,1
Janeiro	93,5 $\pm$ 0,3	39,0 $\pm$ 0,3	20,7 $\pm$ 0,6	17,7 $\pm$ 0,6	1,2 $\pm$ 0,1	1,4 $\pm$ 0,2	27,2 $\pm$ 0,3	0,9 $\pm$ 0,1
Março	28,4 $\pm$ 9,5	41,1 $\pm$ 0,4	16,6 $\pm$ 0,7	19,1 $\pm$ 0,7	0,9 $\pm$ 0,1	0,8 $\pm$ 0,0	25,3 $\pm$ 0,5	0,5 $\pm$ 0,1

^aMédia e desvio padrão de duplicatas.

Em estudos com tomate *in natura*, foi obtida uma alta correlação (0,92) entre os valores de cor razão a/b e conteúdo de licopeno em tomate [34]. Correlações semelhantes foram encontradas para L* (0,93), a* (0,96), a*/b* (0,96) e conteúdo de licopeno (medido por CLAE), utilizando regressão exponencial, em tomate hidropônico [2].

4 – CONCLUSÕES

No presente estudo, um método simples foi desenvolvido e otimizado através de planejamento experimental fatorial para extração de licopeno a partir de tomate, consistindo de uma etapa prévia para retirada de água com 4 extrações de 30 minutos cada com 30mL de etanol, seguido por 4 extrações com acetato de etila de 120 minutos cada e relação massa/volume de 1:0,7. O teor médio de carotenóides (calculado como licopeno) obtido foi de $59,2 \pm 21,8 \mu\text{g/g}$ de descarte tomate. Dos parâmetros de cor, o índice de saturação vermelho (a*) foi o que mostrou melhor correlação com a concentração de licopeno.

Utilizando etapa de baixo custo, foi obtido padrão de licopeno com pureza de 98% através de cristalização e os cristais formados apresentaram formas irregulares alongadas e prismáticas. A análise por CLAE mostrou a presença de traços dos isômeros 5-*cis*-, 5-*cis*,5'-*cis*- e 13-*cis*-licopeno no cristal.

5 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). **Official methods of analysis**. 15 ed. Washington, 1990. p 915-988.
- [2] ARIAS, R.; LEE, T. C.; LOGENDRA, L.; JANES, H. Correlation of lycopene measured by HPLC with the L*, a*, b* color readings of a hydroponic tomato and the relationship or maturity with color and lycopene content. *J. Agric. Food Chem.*, v. 48, n. 5, p. 1697-1702. 2000.
- [3] ASSUNÇÃO, R. B.; MERCADANTE A. Z. Carotenoids and ascorbic acid from cashew apple (*Anacardium occidentale* L.): variety and geographic effects. *Food Chem.*, v. 81, n. 4, p. 495-502. 2003.
- [4] BÖHM, V. Use of column temperature to optimize carotenoid isomer separation by C_{30} high performance liquid chromatography. *J. Sep. Sci.*, v. 24, n. 12, p. 955-959. 2001.
- [5] BÖHM, V.; PUSPITASARI-NIENABER, N. L.; FERRUZZI, M. G.; SCHWARTZ, S. J. Trolox equivalent antioxidant capacity of different geometrical isomers of α -carotene, β -carotene, lycopene, and zeaxanthin. *J. Agric. Food Chem.*, v. 50, n. 1, p. 221-226. 2002.
- [6] BRITTON, G.; LIAAEN-JENSEN, S.; PFANDER, H. Carotenoids today and challenges for the future. In: BRITTON G., LIAAEN-JENSEN S., PFANDER H. (Ed) **Carotenoids: Isolation and Analysis**. Basel: Birkhäuser, 1995. V. 1A. Cap. 2, p. 13-26.
- [7] BRITTON, G. UV/visible Spectroscopy. In: BRITTON G., LIAAEN-JENSEN S., PFANDER H. (Ed) **Carotenoids: Spectroscopy**. Basel: Birkhäuser, 1995. V. 1B. Cap. 2, p. 13-62.
- [8] CEREZAL, P.; PIÑERA, R. M. Carotenoides en las frutas cítricas. Generalidades, obtención a partir de desechos del procesamiento e aplicaciones. *Alimentaria*, v. 33, n. 277, p. 19-32. 1996.
- [9] DAVIES, B. H. Carotenoids. In: Goodwin T. W. (Ed.) **Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments**. London: Academic Press, 1976. V. 2. Cap. 19. p. 38-165.
- [10] EMENHISER, C.; SANDER, L. C.; SCHWARTZ, S. J. Capability of a polymeric C_{30} stationary phase to resolve *cis-trans* carotenoids isomers in reverse-phase liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, v. 707, n. 2, p. 205-216. 1995.
- [11] FERRUZZI, M. G.; NGUYEN, M. L.; SANDER, L. C.; ROCK, C. L.; SCHWARTZ, S. J. Analysis of lycopene geometrical isomers in biological microsamples by liquid chromatography with coulometric array detection. *J. Chromatogr. B*, v. 760, n. 2, p. 289-299. 2001.
- [12] GANN, P. H.; GIOVANNUCCI, E.; WILLET, W.; SACKS, F. M.; HENNEKENS, C. H.; STAMPFER, M. J. Lower prostate cancer risk in men with elevated plasma lycopene levels: results of a prospective analysis. *Cancer Res.*, v. 59, n. 6, p. 1225-1230. 1999.
- [13] GAZIEV, A. I. Method of lycopene preparation. Russ Pat. RU 2172608 C1. 2000.
- [14] GIOVANNUCCI, E.; ASCHERIO, A.; RIMM, E. B.; STAMPFER, M. J.; COLDITZ, G. A.; WILLET, W. C. Intake of carotenoids and retinal in relation to prostate cancer risk. *J. Natl. Cancer Inst.*, v. 87, n. 23, p. 1767-1776. 1995.
- [15] GIOVANNUCCI, E. Tomatoes, tomato-based products, lycopene, and cancer: review of the epidemiologic literature. *J. Natl. Cancer Inst.*, v. 91, n. 4, p. 317-331. 1999.
- [16] GÓMEZ-PIRIETO, M. S.; CAJA, M. M.; HERRAIZ, M. E.; SANTA-MARIA, G. Supercritical fluid extraction of

- all-*trans*-lycopene from tomato. *J. Agric. Food Chem.*, v. 51, n. 1, p. 3-7. 2003.
- [17] HAKALA, S. H.; HEINONEN, I. M. Chromatographic purification of natural lycopene. *J. Agric. Food Chem.*, v. 42, n. 6, p. 1314-1316. 1994.
- [18] HEINONEN, M. I.; OLLILAINEN, V.; LINKOLA, E. K.; VARO, P. T.; KOIVISTOINEN, P. E. Carotenoids in Finnish foods: vegetables, fruits, and berries. *J. Agric. Food Chem.*, v. 37, n. 3, p. 655-659. 1989.
- [19] HENGARTNER, U.; BERNHARD, K.; MEYER, K.; ENGLERT, G.; GLINZ, E. Synthesis, isolation, and NMR-Spectroscopic characterization of fourteen (Z)-isomers of lycopene and of some acetylenic dihydro- and tetrahydrolycopenes. *Helv. Chim. Acta*, v. 75, n. 6, p. 1849-1865. 1992.
- [20] KRINSKY, N. I. The biological properties of carotenoids. *Pure Appl. Chem.*, v. 66, n. 5, p. 1003-1010. 1994.
- [21] LEE, M.T.; CHEN, B.H. Separation of lycopene and its *cis* isomers by liquid chromatography. *Chromatographia*, v. 54, n. 9/10, p. 613-617. 2001.
- [22] MERCADANTE, A. Z.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Carotenoid composition of a leafy vegetable in relation to some agricultural variables. *J. Agric. Food Chem.*, v. 39, n. 6, p. 1094-1097. 1991.
- [23] MERCADANTE, A. Z.; STECK, A.; PFANDER, H. Carotenoids from guava (*Psidium guajava* L.): isolation and structure elucidation. *J. Agric. Food Chem.*, v. 47, n. 1, p. 145-151. 1999.
- [24] MILLER, E. C.; HADLEY, C. W.; SCHWARTZ, S. J.; ERDMAN, J. W.; BOILEAU, T. W. M.; CLINTON, S. K. Lycopene, tomato products, and prostate cancer prevention. Have we established causality? *Pure Appl. Chem.*, v. 74, n. 8, p. 1435-1441. 2002.
- [25] RE, R.; FRASER, P. D.; LONG, M.; BRAMLEY, P. M.; RICE-EVANS, C. Isomerization of lycopene in the gastric milieu. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 281, n. 2, p. 576-581. 2001.
- [26] SANTAMARIA, R. I.; REYES-DUARTE, M. D.; BÂRZANA, E.; FERNANDO, D.; GAMA, F. M.; MOTA, M.; LÓPEZ-MUNGUÍA, A. Selective enzyme-mediated extraction of capsateinoids and carotenoids from chili guajillo puya (*Capsicum annuum* L.) using ethanol as solvent. *J. Agric. Food Chem.*, v. 48, n. 7, p. 3063-3067. 2000.
- [27] SCHIERLE, J.; BRETZEL, W.; BUHLER, I.; FACCIN, N.; HESS, H.; STEINER, K.; SCHUEP, W. Content and isomeric ratio of lycopene in food and human blood plasma. *Food Chem.*, v. 59, n. 3, p. 459-465. 1997.
- [28] SHARMA, S. K.; MAGUER, M. L. Kinetics of lycopene degradation in tomato pulp solids under different processing and storage conditions. *Food Res. Int.*, v. 29, n. 3/4, p. 309-315. 1996.
- [29] SHI, J.; MAGUER, M. L.; KAKUDA, Y.; LIPTAY, A.; NIEKAMP, F. Lycopene degradation and isomerization in tomato dehydration. *Food Res. Int.*, v. 32, n. 1, p. 15-21. 1999.
- [30] SHI, J.; MAGUER, M. L. Lycopene in tomatoes: chemical and physical properties affected by food processing. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, v. 40, n. 1, p. 1-42. 2000.
- [31] Statsoft Inc. *STATISTICA* for Windows [Computer program manual]. Statsoft, Inc.: Tulsa, USA. 1995.
- [32] TAVARES, C. A.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Carotenoid composition of Brazilian tomatoes and tomato products. *Lebensm-Wiss u-Technol.*, v. 27, n. 3, p. 219-224. 1994.
- [33] VAN DEN BERG, H.; FAULKS, R.; GRANADO, H. F.; HIRSCHBERG, J.; OLMEDILLA, B.; SANDMANN, G.; SOUTON, S.; STAHL, W. The potential for the improvement of carotenoid levels in foods and the likely systemic effects. *J. Sci. Food Agric.*, v. 80, n.7, p. 880-912. 2000.
- [34] YANG, C. C.; BRENNAN, P.; CHINNAN, M. S.; SHEWFEELT, R. L. Characterization of tomato ripening process as influenced by individual seal-packaging and temperature. *J. Food Quality*, v.10, n. 1, p. 21-23. 1987.

6 - AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à FAPESP pela bolsa da primeira autora e auxílio financeiro, e à Roche Vitamins (Basel, Suíça) pela doação dos padrões.

CAPÍTULO 3

VANTAGENS E DESVANTAGENS DA SEPARAÇÃO DE CAROTENÓIDES POR CLAE EM COLUNAS C₁₈ E C₃₀

**EM PREPARAÇÃO PARA SER ENVIADO À “REVISTA
BRASILEIRA DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS”**

RESUMO

Estudos têm demonstrado uma alta associação entre ingestão ou nível plasmático de carotenóides e a diminuição do risco ou proteção contra algumas doenças. Estes fatos, bem como a elevada suscetibilidade destes compostos à luz e calor, com formação de isômeros *cis* com atividade biológica reduzida torna importante o desenvolvimento de sistemas que permitam a separação destes carotenóides em alimentos. Neste trabalho foi avaliada a separação de isômeros geométricos de licopeno, e dos isômeros de posição luteína e zeaxantina por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), utilizando colunas C_{18} (monomérica, 4 μm , 300 x 3,9 mm) e C_{30} (polimérica, 3 μm , 250 x 4,6 mm) e diferentes fases móveis com eluição isocrática e gradiente. Os carotenóides foram identificados através das características espectrais e co-cromatografia com padrões. As melhores condições cromatográficas foram obtidas em coluna C_{30} com temperatura de 33°C, eluição isocrática a 1 mL/min e fase móvel com metanol (0,1% trietilamina)/éter *tert*-metil butílico (1:1) para separar isômeros de licopeno e (95:5) para luteína e zeaxantina. Entretanto, para análise quantitativa, é necessário verificar a repetibilidade da área dos picos na coluna C_{30} .

UNITERMOS

licopeno, luteína, zeaxantina, CLAE, coluna C_{30} , coluna C_{18}

INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, o licopeno vem ganhando destaque devido ao seu elevado potencial antioxidante e associação ao menor risco de desenvolvimento de câncer de próstata (Van den Berg *et al.*, 2000; Giovanucci, 2002; Venkateswaran *et al.*, 2004). Estudos têm demonstrado que o elevado consumo de luteína e zeaxantina está relacionado à significativa redução da catarata e da degeneração macular (Junghans *et al.*, 2001; Stringham, Hammond, 2005).

Colunas de fase reversa C_{18} e C_{30} vêm sendo amplamente utilizadas para separação de carotenóides. Em geral, melhores separações de carotenos e isômeros têm sido demonstradas com C_{18} poliméricas do que com monoméricas (Sander *et al.*, 2000). A vantagem da coluna C_{30} (polimérica) em relação à coluna C_{18} é a possibilidade de separar maior número de isômeros além de ser a única coluna capaz de separar isômeros de carotenóides não simétricos, como 13-*cis*-, 13'-*cis*-, 9-*cis*- e 9'-*cis*-luteína (Emenhiser *et al.*, 1996).

A utilização de fases estacionárias C_{18} e C_{30} para a separação de xantofilas e carotenos em misturas de padrões, extratos de alimentos e outras matrizes foi avaliada por Sander *et al.* (1994). Em coluna C_{18} monomérica não houve uma boa separação de isômeros geométricos (ou *cis-trans*) de carotenóides apolares e entre luteína e zeaxantina. Uma melhor separação de carotenos foi obtida com coluna C_{18} polimérica, entretanto os isômeros *cis*- e *trans*- de β -caroteno não foram separados. Todos estes compostos foram separados quando se utilizou coluna C_{30} polimérica (Sander *et al.*, 1994).

Utilizando coluna C_{30} e metanol (MeOH)/éter *tert*-metil butílico (TBME) (50:50) como fase móvel, foram separados *trans*- e 5-*cis*-licopeno em tecidos humanos (Fang *et al.*, 2002) enquanto que foram separados *trans*- e 4 isômeros *cis* de licopeno em pasta de tomate (Böhm *et al.*, 2002).

O uso de gradiente linear e fases móveis contendo misturas de MeOH/TBME/ H_2O para separar *trans*- e *cis*-licopeno em coluna C_{30} tem sido reportado em diversos estudos. Com estas condições, foram separados *trans*- e 5-*cis*-licopeno e outros 4 isômeros *cis* de licopeno em dieta, tecidos e soro de ratos (Boileau *et al.*, 2000, 2001), *trans*- e 4 isômeros *cis* de licopeno em padrão isomerizado (Böhm *et al.*, 2001), enquanto Re *et al.* (2001) reportaram a separação de *trans*-, 5-*cis*-, 9-*cis*-, 13-*cis*- e 15-*cis*-licopeno em padrão e purê de tomate incubado em suco gástrico humano e Ferruzzi *et al.* (2001) a separação de *trans*- e 11 isômeros *cis* de licopeno em tomate tangerina. Hackett *et al.* (2004), demonstraram a separação de *trans*-, 5-*cis*-licopeno e 7 isômeros *cis* de licopeno em padrão isomerizado e oleoresinas de tomate. Cabe destacar que a maioria dos isômeros *cis* não foram identificados nestes trabalhos.

Separação por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), de luteína e zeaxantina em alimentos, utilizando condições cromatográficas semelhantes às citadas para licopeno tem sido utilizadas por diversos autores. Coluna C_{30} e fases móveis contendo diferentes concentrações de MeOH/TBME/ H_2O em sistema de gradiente foram utilizadas para separação desses carotenóides em amostras de milho (Moros *et al.*, 2002), trigo (Hentschel *et al.*, 2002) e batata branca e amarela (Breithaupt, Bamedi, 2002), sendo que em todos os casos foi relatada uma boa separação dos picos de luteína e zeaxantina na linha de base.

Mais recentemente, trabalhos envolvendo separação de luteína, zeaxantina e seus isômeros geométricos, têm utilizado colunas de fase normal. Humphries, Khachik (2003) empregaram coluna ciano para avaliar a distribuição de isômeros de luteína (all-*trans*-; 13,13'-*dicis*-; 9-*cis*- e 9'-*cis*-luteína) e de zeaxantina (all-*trans*-; 9-*cis*- e 13-*cis*-zeaxantina)

em frutas, vegetais, trigo e massas. Panfili *et al.* (2004) usaram coluna de sílica para separação de all-*trans*-luteína e dos seus isômeros 13,13'-*dicis*-; 9-*cis*- e 9'-*cis*- em cereais. Mendes-Pinto *et al.* (2004) compararam coluna de fase reversa polimérica C₁₈ e de fase normal ciano para separar carotenóides em uvas, obtendo separação dos picos de luteína e zeaxantina somente quando utilizada fase normal.

Devido à presença de um grande número de ligações duplas conjugadas na estrutura, os carotenóides são suscetíveis a alterações químicas quando expostos à luz e calor, formando isômeros *cis* com reduzida atividade biológica. Desta forma, é importante desenvolver sistemas que permitam a separação destes carotenóides em alimentos. Assim, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a separação de isômeros de licopeno, e luteína e zeaxantina por CLAE, utilizando colunas C₁₈ e C₃₀.

MATERIAL E MÉTODOS

Reagentes

Foram utilizados padrões de all-*trans*-licopeno, 5-*cis*, 9-*cis*, 13-*cis*-licopeno, luteína e zeaxantina provenientes da DSM Nutritional Products (Suíça) e cristal de all-*trans*-licopeno obtido a partir de tomate fresco (Nunes, Mercadante, 2004), previamente filtrados em membrana de polietileno com 0,22 µm de poro para análise por CLAE.

Os reagentes utilizados para obtenção de licopeno foram de grau p.a. enquanto que para análise cromatográfica todos os solventes foram de grau cromatográfico e, previamente filtrados em sistema millipore de filtração a vácuo, com membrana para solvente orgânico de 0,45 µm.

Preparação e isomerização do licopeno

Cristais de licopeno foram obtidos de tomate fresco de acordo com Nunes, Mercadante (2004) excluindo-se a etapa de esterilização do tomate. A metodologia consistiu de (1) etapa preliminar para remoção de água com quatro extrações de 30 minutos, cada uma com 30 mL de etanol comercial e posterior descarte do solvente, (2) quatro extrações de 120 minutos com acetato de etila, cada extração com razão massa/solvente de 10:7, (3) eliminação do solvente em evaporador rotatório e (4) duas cristalizações com diclorometano/etanol (1:4).

Para promover a isomerização, os cristais foram dissolvidos em diclorometano/metanol (2:8) e aquecidos no escuro em banho-maria a $90 \pm 5^\circ\text{C}$ durante 2 horas.

Análise por CLAE

Foi utilizado um cromatógrafo líquido de alta eficiência, com detector de arranjo de diodos (DAD) (Waters, modelo 996), sistema quaternário de bombeamento de solventes (Waters, modelo controller 600), injetor “Rheodyne” com válvula de injeção de 20 μ L, forno externo com controle de temperatura, desgaseificador “on line” e sistema de aquisição e processamento de dados Millenium (Waters). Os espectros foram adquiridos entre 250 e 600 nm e os cromatogramas processados no comprimento de onda máximo.

Em coluna de fase reversa C₃₀ polimérica da marca YMC (3 μ m, 250 x 4,6 mm), foram testadas separações de isômeros de licopeno nas condições cromatográficas descritas na TABELA I, sempre com vazão de 1mL/min.

Tabela I - Condições testadas com coluna C₃₀ em CLAE para separação de isômeros de licopeno.

Fases Móveis	Temperatura (°C)	Solvente injeção	Tempo de corrida (min) ^a
MeOH (0,1% TEA)/TBME (62:38)	29	EtOAc	70
MeOH (0,1% TEA)/TBME/DCM (52:38:10)	29	EtOAc	40
MeOH (0,1% TEA)/TBME (50:50)	29 e 33	EtOAc MeOH/TBME (1:1)	35 e 33
MeOH (0,1% TEA)/TBME/DCM (50:25:25)	29	EtOAc MeOH/TBME (1:1)	30
gradiente linear de MeOH (0,1% TEA)/TBME 90:10 para 55:45 em 35 min, para 40:60 em 10 min	29	MeOH/TBME (1:1)	56
gradiente linear de MeOH (0,1% TEA)/TBME de 60:40 para 50:50 em 15 min	29	MeOH/TBME (1:1)	42
gradiente linear de MeOH (0,1% TEA)/TBME de 80:20 para 50:50 em 20 min	29	MeOH/TBME (1:1)	50
MeOH (0,1% TEA)/TBME 50:50 isocrático de 0 a 20 min, gradiente linear para 20:80 em 1 min	29	MeOH/TBME (1:1)	30
gradiente linear de MeOH (0,1% TEA)/TBME de 60:40 para 50:50 em 20 min	29 e 33	MeOH/TBME (1:1)	40 e 38

^aTempo de eluição do all-*trans*-licopeno com 5 minutos adicionais.

MeOH: metanol, TEA: trietilamina, TBME: éter *tert*- metil butílico, EtOAc: acetato de etila.

As condições de fases móveis avaliadas, para separação de isômeros de licopeno, em coluna de fase reversa C₁₈ monomérica Nova-Pak (4 μ m, 300 x 3,9 mm), mantida a

29°C e vazão de 1 mL/min, sempre utilizando MeOH/EtOAc (1:1) como solvente de injeção, estão apresentadas na TABELA II.

Tabela II - Condições testadas com coluna C₁₈ em CLAE para separação de isômeros de licopeno.

Fase Móvel	Tempo de corrida (min) ^a
ACN/MeOH (0,1%TEA)/ EtOAc (75:15:10)	18
MeOH (0,1% TEA)/ EtOAc (90:10)	21
MeOH (0,1% TEA)/ EtOAc/H ₂ O (70:25:5)	40
MeOH (0,1% TEA)/THF/H ₂ O (70:25:5)	22
MeOH (0,1% TEA)/DCM/ H ₂ O (70:25:5)	26
MeOH (0,1% TEA)/DCM/H ₂ O (55:35:10)	25
Gradiente linear de MeOH (0,1% TEA)/EtOAc/H ₂ O de 85:5:10 para 70:30:0 em 15 min	26
Gradiente linear de MeOH (0,1% TEA)/DCM/H ₂ O de 85:5:10 para 70:30:0 em 15 min	24
Gradiente linear de MeOH (0,1% TEA)/EtOAc/H ₂ O de 80:10:10 para 70:30:0 em 20 min	30

^aTempo de eluição do all-*trans*-licopeno com 2 minutos adicionais.

ACN: acetonitrila, MeOH: metanol, TEA: trietilamina, EtOAc: acetato de etila, THF: tetrahydrofurano, DCM: diclorometano, H₂O: água.

Para separação de luteína e zeaxantina em coluna C₃₀ foram testadas fases móveis com eluição isocrática contendo MEOH/TBME (50:50 ou 95:5) e temperatura da coluna de 33°C. Em coluna C₁₈ foram avaliadas fases móveis com eluição isocrática contendo misturas de ACN/EtOAc/H₂O (88:6:6, 88:8:4, 88:10:2 ou 92:2:6) e gradiente linear de ACN/EtOAc/H₂O 88:2:10 para 85:15:0 em 20 minutos com temperatura da coluna mantida a 29°C. Para as duas colunas, a vazão de todas as fases móveis foi de 1 mL/min, sempre utilizando MeOH como solvente de injeção.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Isômeros de licopeno

Os padrões de isômeros 5-*cis*-, 9-*cis*-, 13-*cis*- e all-*trans*-licopeno utilizados neste trabalho apresentaram λ_{max} e forma do espectro similares aos previamente relatados na literatura (Hengartner *et al.*, 1992; Schierle *et al.*, 1997; Mercadante *et al.*, 1999; Nunes, Mercadante, 2004), como mostra a FIGURA 1. Como a ligação dupla na posição 5 não está em conjugação com a cadeia poliênica, o espectro do 5-*cis*-licopeno é idêntico ao do all-*trans*-, enquanto que os espectros dos demais isômeros *cis* apresentaram deslocamento hipsocrômico de 6 a 7 nm. Além disso, verifica-se que a intensidade do pico *cis* vai aumentando à medida que a isomeria está localizada mais ao centro da cadeia como no 9-*cis* e 13-*cis*-licopeno.

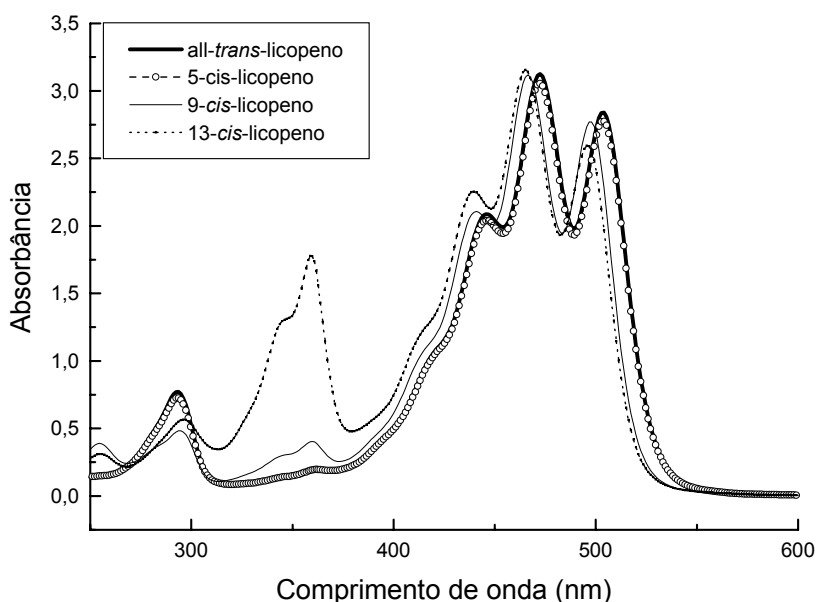


FIGURA 1 - Espectros, obtidos por CLAE-DAD em MeOH (0,1% TEA)/TBME (50:50), dos padrões de 5-*cis*-, 9-*cis*-, 13-*cis*- e all-*trans*-licopeno.

Dentre as fases móveis testadas em coluna C_{30} , as que promoveram a melhor separação dos isômeros de licopeno no padrão termicamente isomerizado e dos padrões da DSM foram: MeOH (0,1% TEA)/TBME (50:50) em modo isocrático e gradiente linear MeOH (0,1% TEA)/TBME de 60:40 para 50:50 em 20 minutos, ambas com vazão de 1 mL/min, temperatura da coluna de 33°C e utilizando como solvente de injeção MeOH/TBME (1:1).

Optou-se por trabalhar com a fase móvel no modo isocrático devido às dificuldades encontradas no condicionamento da coluna com a utilização de gradiente.

Mesmo após 30 minutos de acondicionamento, a repetibilidade da área do pico do *all-trans*-licopeno foi baixa (CV% 5,0 para 8 injeções seguidas) e o número de picos minoritários separados foi diferente em cada corrida, o que pode ser constatado na FIGURA 2.

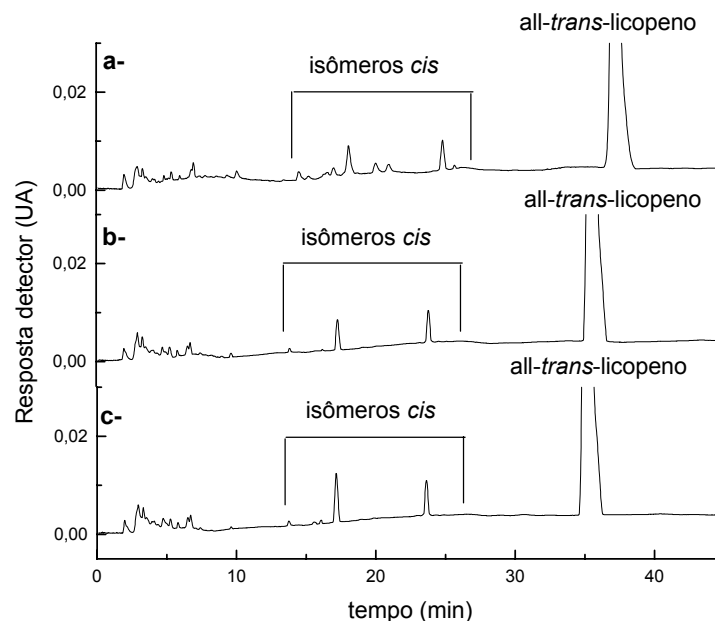


FIGURA 2- Cromatogramas, obtidos por CLAE, de licopeno isomerizado, a- 1ª injeção, b- injeção após 20 min de acondicionamento, c- injeção após 30 min de acondicionamento. Condições cromatográficas: coluna C₃₀, gradiente linear MeOH (0,1% TEA)/TBME de 60:40 para 50:50 em 20 minutos, vazão de 1 mL/min, temperatura da coluna de 33°C e solvente de injeção MeOH/TBME (1:1).

A utilização de gradiente em coluna C₃₀ para separação de isômeros de licopeno, em diversas matrizes tem sido utilizada por muitos autores (Boileau *et al.*, 2000, 2001; Böhm *et al.*, 2001; Re *et al.*, 2001; Ferruzzi *et al.*, 2001; Hackett *et al.*, 2004) sendo que, em nenhum destes trabalhos foram mencionados problemas com o acondicionamento da coluna ou co-eluição de picos.

Mouly *et al.* (1999) ao estudarem a determinação da origem geográfica de suco de laranja da variedade valencia através do perfil cromatográfico de carotenóides obtido por CLAE em coluna C₃₀, utilizando como fase móvel gradiente linear de MeOH/TBME/H₂O observaram que após aproximadamente 100 injeções realizadas nesta coluna, os picos de isoluteína e zeaxantina passaram a co-eluir. Não foi citado o tempo de acondicionamento da coluna entre as injeções.

Quando utilizada fase móvel no modo isocrático (Figura 3a), o valor do CV de 3 injeções da área do pico do *all-trans*-licopeno foi de 0,7% e o número de picos minoritários foi sempre o mesmo. Neste caso somente após aproximadamente 250 injeções passou a ocorrer falta de repetibilidade da área dos picos e dos tempos de retenção.

A FIGURA 3a apresenta a melhor condição cromatográfica para separação dos padrões de 13-*cis*-, 9-*cis*-, 5-*cis*- e *all-trans*-licopeno, utilizando a coluna C₃₀ em modo isocrático, sendo que a ordem de eluição dos picos foi a mesma da encontrada no gradiente empregado neste estudo, e da reportada por Re *et al.* (2001), embora neste trabalho tenha sido utilizada fase móvel contendo H₂O, além de MeOH e TBME, e sistema de gradiente. Embora não tenha ocorrido separação entre *all-trans*- e 5-*cis*-licopeno na linha de base em nenhuma das fases móveis e colunas testadas, estes dois compostos foram melhor resolvidos quando utilizada coluna C₃₀, com o 5-*cis*- eluindo logo após o *all-trans*-licopeno. Este fato foi verificado também por Boileau *et al.* (2000, 2001) e Re *et al.* (2001), ambos utilizando coluna C₃₀ e fases móveis em sistema gradiente.

Utilizando a coluna C₁₈ (FIGURA 3b), o 9-*cis*-licopeno eluiu junto com o *all-trans*-licopeno, com separação parcial do 13-*cis*-licopeno em todas as condições avaliadas.

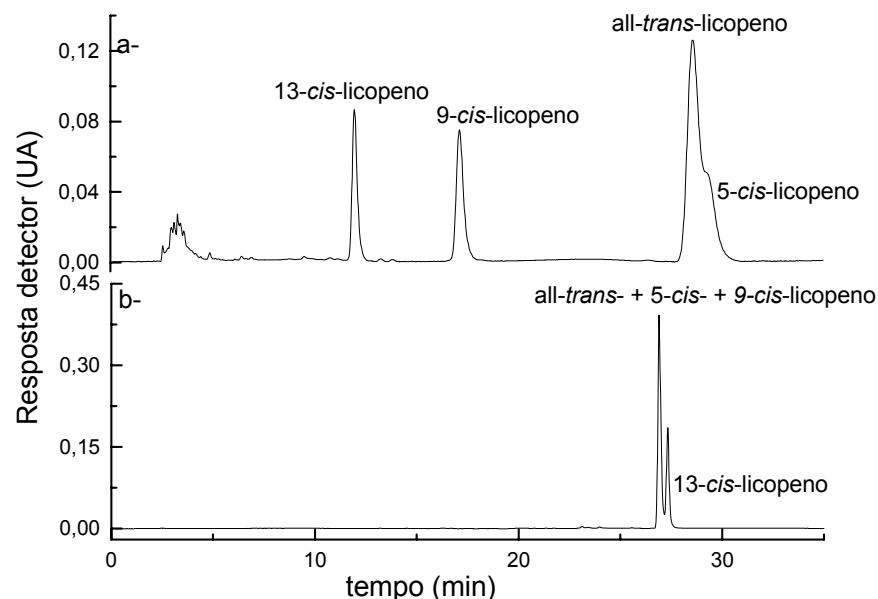


FIGURA 3 - Cromatogramas, obtidos por CLAE, da mistura dos padrões de 5-*cis*-, 9-*cis*-, 13-*cis*- e *all-trans*-licopeno. Condições **a**- coluna C₃₀YMC, fase móvel MeOH (0,1% TEA)/TBME (50:50), 1 mL/min e temperatura da coluna de 33°C, **b**- coluna C₁₈ Nova-Pak, fase móvel gradiente linear de MeOH (0,1% TEA)/EtOAc/H₂O de 80:10:10 para 70:30:0 em 20 min, 1 mL/min e temperatura da coluna de 29°C. Processamento em λ_{max} .

Luteína e zeaxantina

Os padrões de *all-trans*-luteína e *all-trans*-zeaxantina apresentaram $\lambda_{\max}$ e forma do espectro similares aos previamente relatados na literatura (Britton, 1995; Zanatta, 2004) (FIGURA 4). A *all-trans*-zeaxantina apresenta uma ligação dupla conjugada (l.d.c) a mais na estrutura do que a *all-trans*-luteína e conseqüentemente um $\lambda_{\max}$ de absorção maior (5 nm). Entretanto, o fato desta l.d.c estar localizada no anel β , explica a estrutura fina (%III/II) reduzida da mesma, quando comparada a *all-trans*-luteína (Britton, 1995).

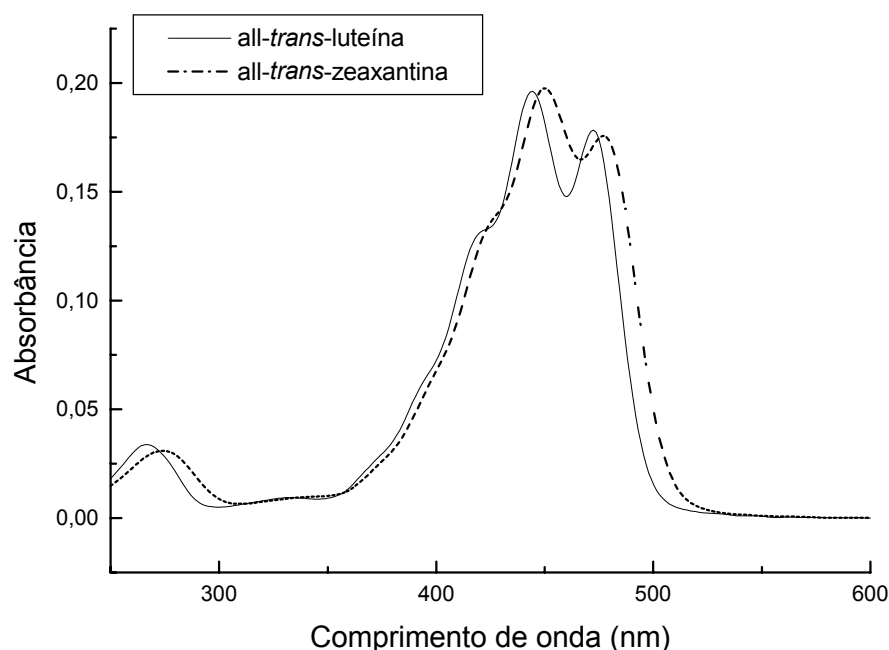


FIGURA 4 - Espectros, obtidos por CLAE-DAD em MeOH (0,1%TEA)/TBME (95:5), dos padrões de *all-trans*-luteína e *all-trans*-zeaxantina.

Pode ser observado nas FIGURAS 5a e 5b que a separação mais eficiente dos padrões de luteína e zeaxantina foi também obtida em coluna C_{30} . Resultados semelhantes foram apresentados por Sander *et al.* (1994) em estudo comparativo de fases estacionárias C_{18} (monomérica e polimérica) e C_{30} na separação de padrões de diversos carotenóides.

Zanatta (2004) obteve resoluções similares dos picos de luteína e zeaxantina em extrato de camu-camu utilizando as mesmas colunas C_{18} monomérica (gradiente linear de ACN/ H_2O /EtOAc, partindo de 88:10:2, atingindo 85:0:15 em 15 min, e 70:0:30 em 35 min, mantendo até o final) e C_{30} polimérica (gradiente de H_2O /MeOH/TBME de 5:80:5 atingindo

0:95:5 em 12 min, 0:89:11 em 25 min, 0:75:25 em 40 min e 0:50:50 em 60 min) usadas no presente estudo.

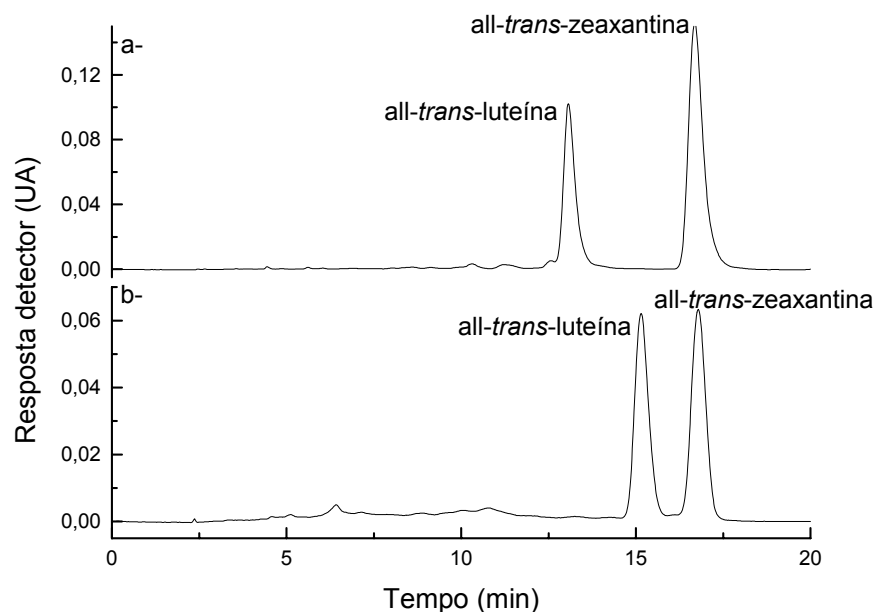


FIGURA 5 - Cromatogramas, obtidos por CLAE, da mistura dos padrões de luteína e zeaxantina. Condições **a**- coluna C_{30} YMC, fase móvel MeOH (0,1% TEA)/TBME (95:5), 1 mL/min e temperatura da coluna de 33°C, **b**- coluna C_{18} Nova-Pak, fase móvel ACN/EtOAc/H₂O (92:2:6), 1 mL/min e temperatura da coluna de 29°C. Processamento em $\lambda_{\max}$.

CONCLUSÃO

No presente trabalho a coluna C_{30} mostrou maior eficiência tanto na separação dos isômeros 5-*cis*, 9-*cis*- e 13-*cis*-licopeno quanto de luteína e zeaxantina. Pelo fato destes isômeros serem os mais encontrados em alimentos processados, o uso da coluna C_{30} é recomendado apesar do éter *tert*-metil butílico, utilizado na fase móvel e da própria coluna apresentarem elevado custo no Brasil. Entretanto, se o objetivo for acompanhar mudanças quantitativas é necessário verificar a ocorrência de problemas com a repetibilidade das áreas dos picos, e se esse for o caso, não é recomendado utilizar a coluna C_{30} .

ABSTRACT

Several studies have demonstrated a high association between dietary intake or plasma levels of carotenoids and the decrease of risk or the protection against some diseases. Taking in consideration the high susceptibility of these compounds to light and heat, leading to the formation of *cis* isomers with lower biological activity, it is important to develop systems that allow the separation of such compounds in foods. This work evaluated the separation of the geometric isomers of lycopene and of the position isomers, lutein and zeaxanthin, by high performance liquid chromatography (HPLC) using C₁₈ (monomeric, 4 µm, 300 x 3.9 mm) and C₃₀ (polymeric 3 µm, 250 x 4.6 mm) columns and many different mobile phases, either as isocratic or gradient elution. The carotenoids were identified by their spectral characteristics and co-chromatography with standards. The best chromatographic conditions were C₃₀ column, temperature set at 33°C and as mobile phase an isocratic elution of methanol (0.1% triethylamine)/*tert*-butyl methyl ether (1:1) to separate lycopene isomers and (95:5) for lutein and zeaxanthin, both at 1 mL/min. However, for quantitative analysis, it is necessary to evaluate the peak area repeatability on the C₃₀ column.

UNITERMS

lycopene, isomers, lutein, zeaxanthin, HPLC, C₃₀ column, C₁₈ column.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a FAPESP pela bolsa do primeiro autor e auxílio financeiro e a DSM Nutritional Products (Suíça) pela doação dos padrões.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BÖHM, V. Use of column temperature to optimize carotenoid isomer separation by C₃₀ high performance liquid chromatography. *J. Sep. Sci.*, v. 24, p.955-959, 2001.
- BÖHM, V., PUSPITASARI-NIENABER, N. L., FERRUZZI, M. G., SCHWARTZ, S. J. Trolox equivalent antioxidant capacity of different geometrical isomers of α -carotene, β -carotene, lycopene and zeaxanthin. *J. Agric. Food Chem.*, v. 50, p. 221-226, 2002.
- BOILEAU, A.C., CLINTON, S. K., ERDMAN, J. W. JR. Tissue lycopene concentrations and isomer patterns are affected by androgen status and dietary lycopene concentration in male F344 rats. *J. Nutr.*, v. 130, p.1613-1618, 2000.
- BOILEAU, A.C., CLINTON, S. K., ZARIPHEH, S., MONACO, M. H., DONOVAN, S. M., ERDMAN, J. W. JR. Testosterone and food restriction modulated hepatic lycopene isomer concentrations in male F344 rats. *J. Nutr.*, v. 131, p. 1746-1752, 2001.
- BREITHAUPT, D. E., BAMEDI, A. Carotenoids and carotenoids esters in potatoes (*Solanum tuberosum* L): new insights into an ancient vegetable. *J. Agric. Food Chem.*, v. 50, p. 7175-7181, 2002.
- BRITTON, G. UV/visible Spectroscopy. In: "Carotenoids, Vol 1B: Spectroscopy". G. Britton; S. Liaaen-Jensen and H. Pfander (eds). Birkhäuser, Basel. p. 13-62, 1995.
- EMENHISER, C., ENGLERT, G., SANDER, L. C., LUDWIG, B., SCHWARTZ, S. J. Isolation and structural elucidation of the predominant geometrical isomers of α -carotene. *J. Chromatogr. A.*, v. 719, p. 333-343, 1996.
- FANG, L., PAJKOVIC, N., WANG, Y., GU, C., VAN BREEMEN, R. B. Quantitative analysis de lycopene isomers using HPLC-Tandem Mass Spectrometry. Apresentado no 13th International Carotenoid Symposium, Estados Unidos. p.143, 2002.
- FERRUZZI, M. G., NGUYEN, M. L., SANDER, L. C., ROCK, C. L., SCHWARTZ, S. J. Analysis of lycopene geometrical isomers in biological microsamples by liquid chromatography with coulometric array detection. *J. Chromatogr. B.*, v. 760, p. 289-299, 2001.
- GIOVANNUCCI, E. Lycopene and prostate cancer risk. Methodological considerations in the epidemiologic literature. *Pure Appl. Chem.*, v.74, p. 1427-1434, 2002.
- HACKETT, M. M., LEE, J. H., FRANCIS, D., SCHWARTZ, S. J. Thermal stability and isomerization of lycopene in tomato oleoresins from different varieties. *J. Food. Sci.*, v. 69, p. 536-541, 2004.
- HENGARTNER, U., BERNHARD, K., MEYER, K., ENGLERT, G. & GLINZ, E. Synthesis, isolation, and NMR-Spectroscopic characterization of fourteen (Z)-isomers of lycopene

- and of some acetylenic dihydro- and tetrahydrolycopenes. *Helv. Chim. Acta.*, v.75, p. 1849-1865, 1992.
- HENTSCHEL, V., KRANI, K., HOLLMANN, J., LINDHAUER, M. G., BÖHM, V., BITSCH, R. Spectrophotometric determination of yellow pigment content and evaluation of carotenoids by High-Performance Liquid Chromatography in durum wheat grain. *J. Agric. Food Chem.*, v. 50, p. 6663-6668, 2002.
- HUMPHRIES, J. M., KHACHIK, F. Distribution of lutein, zeaxanthin, and related geometrical isomers in fruit, vegetables, wheat, and pasta products. *J. Agric. Food Chem.*, v. 51, p. 1322-1327, 2003.
- JUNGHANS, A., SIES, H., STAHL, W. Macular pigments lutein and zeaxanthin as blue light filters studied in liposomes. *Arch. Biochem. Biophys.*, v. 391, p.160-164, 2001.
- MENDES-PINTO, M. M., FERREIRA, A. C. S., OLIVEIRA, M. B. P. P., PINHO, P. G. Evaluation of some carotenoids in grapes by reversed and normal phase liquid chromatography: a qualitative analysis. *J. Agric. Food Chem.*, v. 52, p. 3182-3188, 2004.
- MERCADANTE, A. Z., STECK, A., PFANDER, H. C. Carotenoids from guava (*Psidium guajava* L.): isolation and structure elucidation. *J. Agric. Food Chem.*, v. 47, p. 145-141, 1999.
- MOROS, E. E., DARNOKO, D., CHERYAN, M., PERKINS, E. G., JERREL, J. Analysis of xanthophylls in corn by HPLC. *J. Agric. Food Chem.*, v. 50, p. 5787-5790, 2002.
- MOULY, P. P., GAYDOU, E. M., CORSETTI, J. Determination of the geographical origin of Valencia orange juice using carotenoid liquid chromatographic profiles *J. Chromatogr. A.*, v. 844, p. 149-159, 1999.
- NUNES, I., MERCADANTE, A. Z. Obtenção de cristais de licopeno a partir de descarte de tomate. *Ciênc. Tecnol. Alim.*, v.24, p. 440-447, 2004.
- PANFILI, G., FRATIANNI, A., IRANO, M. Improved normal-phase high-performance liquid chromatography procedure for the determination of carotenoids in cereals. *J. Agric. Food Chem.*, v. 52, p. 6373-6377, 2004.
- RE, R., FRASER, P. D., LONG, M., BRAMLEY, P. M., RICE-EVANS, C. Isomerization of lycopene in the gastric milieu. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 281, p. 576-581, 2001.
- SANDER, L. C., SHARPLESS, K. E., CRAFT, N. E., WISE, S. A. Development of engineered stationary phases for the separation of carotenoid isomers. *Anal. Chem.*, v. 66, p. 1667-1674, 1994.

- SANDER, L. C., SHARPLESS, K. E., PURSCH, M. C₃₀ stationary phases for the analysis of food by liquid chromatography. *J. Chromatogr. A.*, v. 880, p. 189-202, 2000.
- SCHIERLE, J., BRETZEL, W., BÜHLER, I., FACCIN, N., HESS, D., STEINER, K., SCHÜEP, W. Content and isomeric ratio lycopene in food and human blood plasma. *Food Chem.*, v. 59, p. 459-465, 1997.
- STRINGHAM, J., M., HAMMOND, B. R. Dietary lutein and zeaxanthin: possible effects on visual function. *Nutr. Rev.*, v. 63, p. 59-64, 2005.
- VAN DEN BERG, H., FAULKS, R., GRANADO, H. F., HIRSCHBERG, J., OLMEDILLA, B., SOUTHON, S., STHAL, W. The potential for the improvement of carotenoid levels in foods and the likely systemic effects. *J. Sci. Food. Agric.*, v. 80, p.880-912, 2000.
- VENKATESWARAN, V., FLESHNER, N. E., SUGAR, L. M., KLOTZ, L. H. Antioxidants block prostate cancer in lady transgenic mice. *Cancer Res.*, v.64, p. 5891-5896, 2004.
- ZANATTA, C. F. Determinação da composição de carotenóides e antocianinas de camu-camu (*Myrciaria dubia*). Dissertação de mestrado, Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, 2004.

CAPÍTULO 4

PHOTOSENSITIZED OXIDATION OF LYCOPENE

EM PREPARAÇÃO PARA SER ENVIADO À REVISTA

“JOURNAL OF AGRICULTURAL AND FOOD CHEMISTRY”

ABSTRACT

The photosensitized oxidation of natural lycopene with methylene blue (MB) as the sensitizer in organic solvent model systems was studied under different temperatures and atmosphere. The analysis by HPLC-PDA-MS allowed the identification of four types of products: apo-carotenals from oxidative cleavage, compounds with one and two 32 mass units incorporated, epoxides and geometrical isomers of lycopene in all solvent systems. In the presence of the MB and air, the rate for the lycopene consumption decreased with the increased initial carotene concentration and both the initial compounds, all-*trans*- and 13-*cis*-lycopene, were consumed with the time of photosensitization. In the presence of a radical scavenger identical degradation products were observed, however k_{obs} was smaller compared to the system without this antioxidant. On the other hand, in N₂-saturated solutions with MB and under identical illumination conditions, a slower photosensitized degradation of all-*trans*- and 13-*cis*-lycopene was observed, and the oxidation products apo-6'-carotenal and epoxides were formed only in trace amounts. In the absence of MB solely 13-*cis*-lycopene increased. A mechanism was proposed to explain the observed results for the lycopene degradation.

KEYWORDS: lycopene, oxidation, photosensitization, kinetics, HPLC-PDA-MS

INTRODUCTION

Lycopene has received great attention in recent years, because epidemiological studies showed that the increased consumption of tomato-based foods, rich in lycopene, as well as high lycopene concentration in serum were associated to a lower risk of prostate cancer (1, 2). However, the mechanism by which this carotenoid may act *in vivo* is still not fully understood.

The formation of lycopene oxidation products was evaluated in details in several studies, however strong oxidant agents not found in food systems were used, such as *m*-chloroperoxybenzoic acid (MCPBA) (3), KMnO_4 (4) and hydrogen peroxide (5). Recently, oxidative and cleavage products of lycopene were obtained by a lipoxygenase-catalyzed system (6).

In addition, lycopene is well-known as the most powerful singlet molecular oxygen O_2 ($^1\Delta_g$) quencher *in vitro* (7-10). The remarkable quencher performance of lycopene was also observed in reversed-micelle membrane system (11).

On the other hand, light decreases the stability of food components by both photolytic autoxidation and photosensitized oxidation. The latter is the main reaction that occurs since natural pigments present in foods, such as chlorophyll, hematoporphyrins and riboflavin, are known to be efficient photosensitizers, which, in the presence of molecular oxygen and light produce O_2 ($^1\Delta_g$), a potent oxidant specie (12). However, most of the studies regarding lycopene stability evaluated the effects of illumination (13) and heating (13,14) on the formation of isomers. To the best of our knowledge, only few studies evaluated the lycopene autoxidation (15) and photosensitized oxidation (16), including the formation of oxidation products.

Recently, the photosensitized degradation mechanism of bixin, a *cis*-carotenoid, was studied in organic solvent and HPLC was used to separate the products formed, and the formation of the $^1\text{O}_2$ ($^1\Delta_g$) and triplet excited state of bixin was also observed by time-resolved spectroscopic and laser flash photolysis experiments (17).

Thus, the aim of this work was to evaluate the kinetics of all-*trans*-lycopene degradation by $^1\text{O}_2$ ($^1\Delta_g$) generated by methylene blue, and to separate and characterize the products formed in this system.

MATERIALS AND METHODS

Lycopene preparation. Lycopene crystal was obtained from fresh tomatoes according to Nunes and Mercadante (18). Briefly, the methodology consisted of (1) preliminary water removal step with four 30-minute extractions, each with 30 mL commercial ethanol with discard of the solvent, (2) four 120-minute extractions with ethyl acetate, each extraction with a mass/volume ratio of 1:0.7, (3) complete solvent evaporation on a rotary evaporator and (4) crystallization from dichloromethane/ethanol (1:4), repeated twice. The lycopene crystals obtained showed 97% purity, indicated by high-performance liquid chromatography-photo diode array detector (HPLC-PDA).

Photosensitized oxidation. The photosensitization experiments were performed at 10, 15, and 20°C, controlled by a water refrigerator system, in dichloromethane (DCM)/methanol (MeOH) (1:1) air-saturated solutions containing *ca.* 30 µg/mL lycopene and 2 µg/mL methylene blue (MB). The illuminated was provided with a 150 W filament lamp placed at 15 cm from the sample and coupled to a red cut-off filter in order to exclusively to excite the band of the sensitizer above 625 nm. Four additional quantitative experiments were carried out at 20°C under the following conditions: 30 µg/mL lycopene + MB + 0.02g/100mL BHT + air; 30 µg/mL lycopene + MB + N₂ (99.99% purity); 15 µg/mL lycopene + MB + air and 30 µg/mL lycopene + air. In order to evaluate the influence of the type of solvent on the cleavage and oxidation products, two air-saturated experiments were done, being one in 100% DCM for 1230 min and the other in DCM/acetonitrile (1:1) for 760 min.

The stability of MB during the experiments was verified by its non-consumption, followed in a UV-visible spectrophotometer.

Instrumentation. HPLC analysis was carried out using a Waters HPLC system equipped with a PDA (Waters, model 996). The equipment also included an on line degasser, a Rheodyne injection valve with a 20 µL loop and an external oven. Data acquisition and processing were performed using the Millenium Waters software. For quantitative analysis, the carotenoids were separated on a C₁₈ Novapack (4 µm, 300 x 3.9 mm) column using as mobile phase a linear gradient of MeOH (0.1% triethylamine (TEA))/ethyl acetate (EtOAc)/H₂O from 80:10:10 to 70:30:0 in 20 min at 1 mL/min and temperature set at 29°C. The spectra were recorded between 250 and 700 nm. The all-*trans*-lycopene quantification was done by area comparison to that of the standard injected in the same day, whereas the data of all the other peaks were obtained as area at their respective maximum absorption wavelength ($\lambda_{\max}$).

The separation was also carried out on an YMC C₃₀ column (3 µm, 250 x 4.6 mm) with MeOH (0.1% TEA)/*t*-butyl methyl ether (MTBE) (1:1) at 1 mL/min and column temperature set at 33°C. In both columns, co-chromatography with standards of all-*trans*-, 5-*cis*-, 9-*cis*- and 13-*cis*-lycopene, provided by DSM Nutritional Products from Basel, were carried out.

For identification, the HPLC-PDA-MS (Agilent, model MSD 1100) experiments were performed with an APCI interface and the mass spectra were obtained in positive ion mode. The separations were monitored at 472 nm. Nitrogen was used as drying gas at a flow rate of 5 mL/min and the corona current at 8 µA. The chromatographic conditions used were ProntoSil C₃₀ column (3 µm, 250 x 4.6 mm) with 100% MeOH for 5 min following by a linear gradient of MeOH/MTBE to 15:85 in 50 min, maintaining this proportion for 5 min. The flow rate was 1 mL/min and column temperature was set at 20°C.

RESULTS AND DISCUSSION

Although the crystal purity found was at least 97%, after preparation of the solution for photosensitization a spontaneous isomerization occurred. Figure 1 shows the initial HPLC-PDA chromatogram of 30 µg/mL lycopene solution in DCM/MeOH (1:1) with MB. In addition to the main peak corresponding to all-*trans*-lycopene (92% total area), two additional peaks in much less amounts were also detected. The UV-vis spectra of the peaks obtained from the PDA are presented in the inset of **Figure 1**. The peak with longer t_R (7% total area) was identified as a mixture of 13-*cis*- and 15-*cis*-lycopene by its UV-visible features, co-chromatography with authentic standards and molecular ion ($[M+H]^+$) at m/z 537 typical of a C-40 carotene. The isomers were separated on the C₃₀ column that showed the absence of the 9-*cis* isomer and 13-*cis*-lycopene as the predominant isomer, with an area ratio of 14:1 for 13-*cis* to 15-*cis*-lycopene. The compound eluted as the smallest peak (1% total area) with t_R in the range of 22.6-22.8 min showed at time zero of the experiment a fine structure (% III/II 74) in UV-visible spectrum with λ_{max} at 291 nm (*cis* peak), 443, 470 and 502 nm, however with the passage of time this compound was probably partially rearranged in another compound, because at this same t_R , the UV-visible gradual changed to 281, 291 (*cis* peaks), 418, 446 (maximum), 463 and 492 nm, as can be seen in **Figure 1**. This peak, not detected by HPLC-PDAD-MS, was further shown as peak 9 in **Figure 2**.

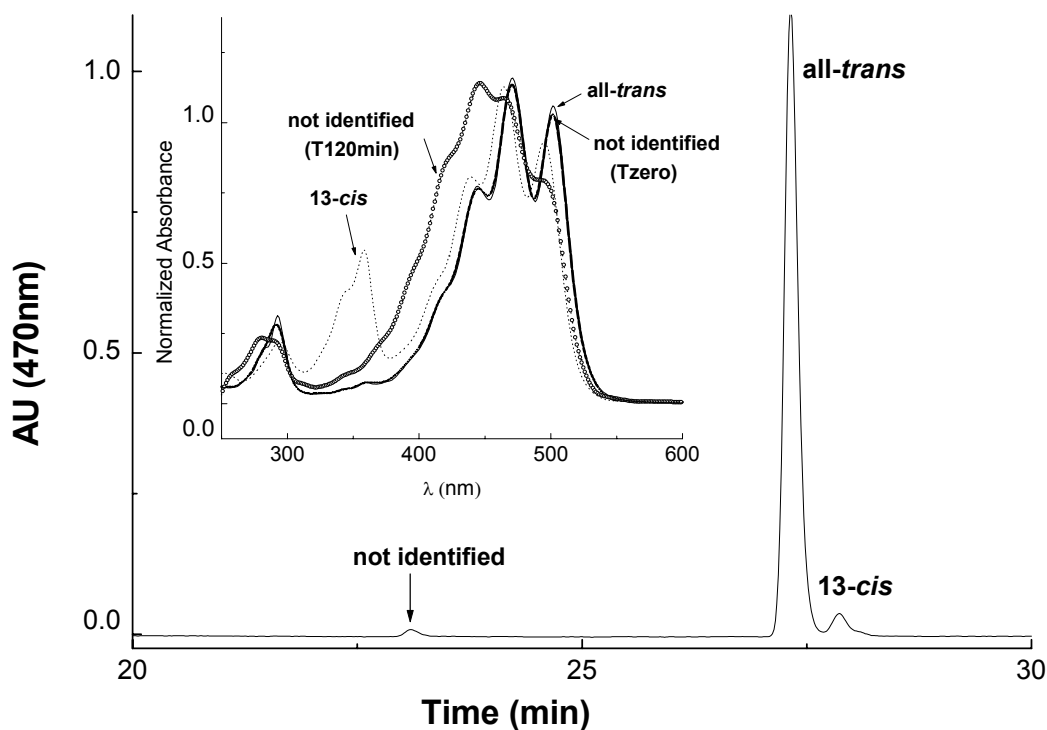


Figure 1. HPLC-PDA chromatogram of freshly prepared lycopene with MB in dichloromethane/methanol (1:1) solution. Chromatographic conditions: Novapak C₁₈ column with a linear gradient of MeOH (0.1% TEA)/ethyl acetate (EtOAc)/H₂O from 80:10:10 to 70:30:0 in 20 min at 1 mL/min column as mobile phase. Inset: UV-vis spectra of the peaks, obtained by PDA.

Figure 2 shows, in expanded scales, the HPLC chromatograms observed after illumination of the carotenoid solution under different experimental conditions. As mentioned before, in all cases the solutions were irradiated through a red-cut off glass filter excluding illumination effect on the carotenoid. **Figure 3** presents the UV-Vis spectra obtained for the HPLC peaks with the PDA detection. **Table 1** resumes the HPLC-PDA and MS parameters observed for all the reported peaks.

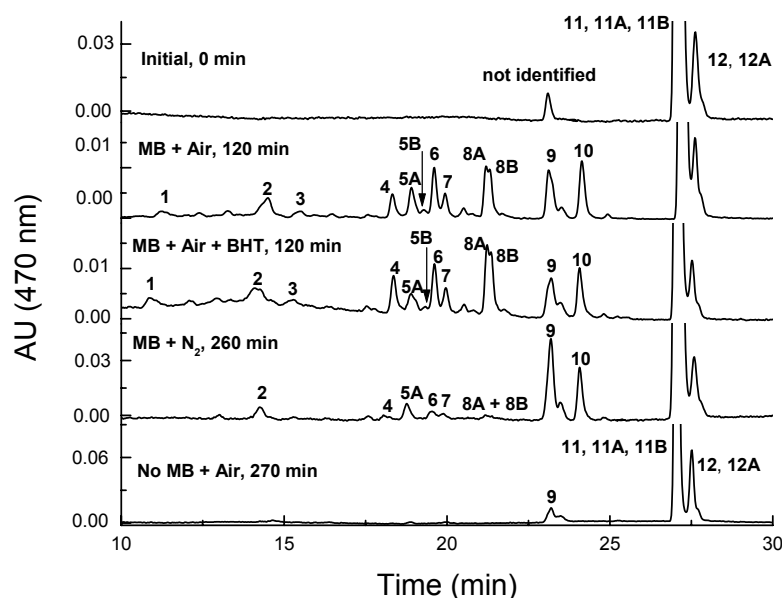


Figure 2. HPLC-PDA chromatograms of 30 µg/mL lycopene crystals in DCM/MeOH (1:1) solutions at 20°C, observed after different illumination times with filtered light above 625 nm. For experimental and chromatographic conditions see experimental section.

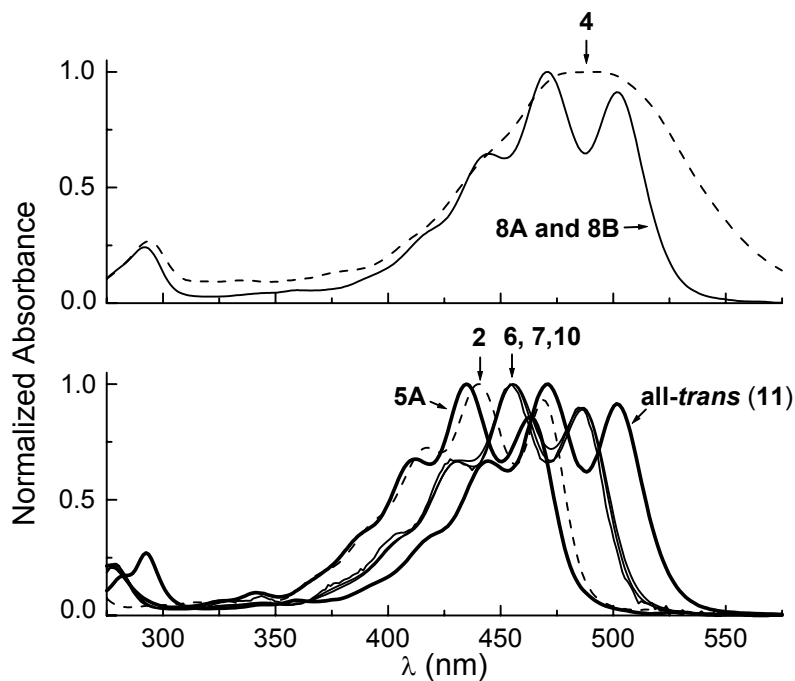


Figure 3. UV-vis absorption spectra of some of the HPLC peaks obtained with PDA in linear gradient of MeOH (0.1% TEA)/EtOAc/H₂O from 80:10:10 to 70:30:0 in 20 min at 1 mL/min. The numbers correspond to the peak numbers in Figure 2.

Table 1. Characteristics of the compounds formed upon photosensitized oxidation of lycopene.

Peak ^a	Carotenoid	t _R range		UV-visible			MS (m/z)
		C ₁₈ (min) ^b	C ₃₀ (min) ^c	λ _{max} (nm)	% III/II	% A _B /A _{II}	
1	apo-8'-lycopenal	10.8 - 11.0	32.1 - 32.4	276, 314, 416, 440, 462 ^b	0 ^b	14 ^b	417 (M + H), 399 (M + H - 18), 325 (M + H - 92), 311 (M + H - 106)
2	not identified	13.9 - 14.3	28.3 - 28.6	263, 327, 414, 441, 469 ^b	77 ^b	10 ^b	567 (M + H), 535 (M + H - 32), 461 (M + H - 106), 443 (M + H - 32 - 92), 429 (M + H - 32 - 106)
				278, 344, 412, 436, 464 ^c	53 ^c	11 ^c	
3	not identified	15.2 - 15.4	25.8 - 26.2	263, 309, 412, 439, 468 ^c	96 ^c	6 ^c	567 (M + H), 535 (M + H - 32), 475 (M + H - 92), 461 (M + H - 106), 443 (M + H - 32 - 92), 429 (M + H - 32 - 106)
				278, 342, 410, 434, 462 ^b	66 ^b	14 ^b	
4	apo-6'-lycopenal	17.8 - 18.0	36.3 - 36.6	294, 341, 491 ^b	0 ^b	6 ^b	443 (M + H), 425 (M + H - 18), 374 (M + H - 69), 337 (M + H - 106), 351 (M + H - 92)
				296, 343, 488 ^c	0 ^c	5 ^c	
5A	not identified	18.5 - 18.8	23.1 - 23.5	276, 342, 412, 435, 464 ^b	60 ^b	9 ^b	567 (M + H), 535 (M - 32), 475 (M + H - 92), 461 (M + H - 106), 443 (M + H - 32 - 92), 429 (M + H - 32 - 106)
				278, 342, 412, 434, 464 ^c	61 ^c	13 ^c	
5B	not identified	18.9 - 19.0	23.1 - 23.5	277, 341, 409, 431, 459 ^b	76 ^b	12 ^b	567 (M + H), 535 (M + H - 32), 475 (M + H - 92), 461 (M + H - 106), 443 (M + H - 32 - 92)
				280, 342, 408, 430, 458 ^c	44 ^c	18 ^c	
6	not identified	19.2 - 19.4	33.6 - 34.2	278, 345, 429, 456, 487 ^b	68 ^b	5 ^b	599 (M + H), 567 (M + H - 32), 535 (M + H - 32 - 32), 475 (M + H - 32 - 92), 461 (M + H - 32 - 106)
				280, 346, 432, 458, 488 ^c	78 ^c	4 ^c	
7	not identified	19.5 - 19.7	32.6 - 33.0	278, 342, 428, 455, 486 ^b	73 ^b	8 ^b	567 (M + H), 535 (M - 32), 475 (M + H - 92), 461 (M + H - 106), 443 (M + H - 32 - 92), 429 (M + H - 32 - 106)
				280, 344, 430, 458, 488 ^c	95 ^c	5 ^c	

8A	Lycopene 1,2,1',2'- diepoxide	20.8 - 20.9	42.6 - 42.9	293, 359, 444, 471, 502 ^b 294, 360, 446, 472, 502 ^c	73 ^b 75 ^c	4 ^b 4 ^c	569 (M + H), 553 (M + H - 16), 535 (100), non characteristic fragmentation
8B	lycopene 1,2- epoxide	21.0 - 21.1	45.7- 45.9	293, 359, 444, 471, 502 ^b 294, 360, 446, 472, 502 ^c	73 ^b 76 ^c	4 ^b 4 ^c	553 (M + H), 447 (M + H - 106)
9	not identified	22.6 - 22.8	-	291, 358, 443, 470, 502 ^{b,d} 291, 342, 446, 463, 492 ^{b,e}	74 ^{b,d} 0 ^{b,e}	4 ^{b,d} 8 ^{b,e}	not detected
10	not identified	23.6 - 23.9	-	278, 344, 429, 456, 487 ^b	71 ^b	5 ^b	not detected
11	all- <i>trans</i> - lycopene	26.7 - 27.0	50.1 - 50.4	293, 360, 444, 471, 502 ^b 294, 362, 446, 472, 504 ^c	74 ^b 73 ^c	5 ^b 7 ^c	537(M + H), 445 (M + H - 92), 431(M + H - 106)
11A	9- <i>cis</i> -lycopene	Eluted with 11	44.9 - 45.0	296, 362, 442, 466, 496 ^c	60 ^c	15 ^c	537(M + H), 431(M + H - 106)
11B	5- <i>cis</i> -lycopene	Eluted with 11	50.6 - 50.7	296, 362, 446, 472, 504 ^c	73 ^c	7 ^c	537(M + H), 445 (M + H - 92), 431(M + H - 106)
12	13- <i>cis</i> - lycopene	27.1 - 27.4	41.0 - 41.4	295, 358, 439, 464, 496 ^b 298, 360, 438, 464, 496 ^c	48 ^b 60 ^c	48 ^b 60 ^c	537 (M + H), 431(M + H - 106)
12A	15- <i>cis</i> -lycopene	Eluted with 12	10.9 - 11.2 ^f	297, 359, 443, 470, 500	44	74	not detected

^aThe peak numbers are from Figure 2.

^bRange of retention time from 35 runs. Mobile phase: linear gradient of MeOH (0.1% TEA)/EtOAc/H₂O from 80:10:10 to 70:30:0 in 20 min at 1 mL/min.

^cRange of retention time from 4 runs. Mobile phase: 100% MeOH for 5 min following by a linear gradient to 15:85 of MeOH/MTBE in 50 min, maintaining this proportion for 5 min at 1mL/min.

^dSpectra taken at time zero.

^eSpectra taken after 120 min.

^fRange of retention time from 8 runs. Mobile phase: MeOH (0.1% TEA)/ MTBE 1:1 at 1 mL/min.

% III/II corresponds to spectral fine structure and % A_B/A_{II} to intensity of the *cis* peak.

Figure 2 shows that several new peaks with shorter retention times than all-*trans*-lycopene were detected. The twelve main peaks were numbered as t_R increased.

The apo-8'- (peak **1**) and apo-6'-carotenal (peak **4**) were positively identified by its broad and non-structured UV-visible spectra and mass spectra molecular ion and fragments similar to the literature data (4,19).

Peaks **8A** and **8B** showed identical spectra to that of all-*trans*-lycopene, but its molecular ions $[M+H]^+$ at m/z 569 and m/z 553 indicate that these compounds contain, respectively, two and one extra oxygen atoms to the all-*trans*-lycopene structure. According to the literature data (3,19), the most probably assignment is lycopene 1,2,1',2'-diepoxide for peak **8A** and lycopene 1,2-epoxide for peak **8B**.

As expected, the mass spectra of all isomers (peaks **11**, **11A**, **11B**, **12**) were very similar with $[M+H]^+$ at m/z 537 and fragments at m/z 445 and at m/z 431 due to the respectively losses of toluene and of xylene from the polyene chain (20,21,22). Therefore, the identification of geometrical isomers was done by co-chromatography with authentic standards and comparison of spectral features with the literature (21). As the *cis* double bond moved from the peripheral to the center position of the molecule, the spectral fine structure decreased and the intensity of *cis* peak increased, such as for 9-*cis* (peak **11A**), 13-*cis* (**12**) and 15-*cis*-lycopene (**12A**). However, the 5-*cis*-isomer (peak **11B**) showed the same UV-visible spectral characteristics as the all-*trans*-lycopene, according to previous data (22).

Nevertheless, peaks **2**, **3**, **5A** and **5B** eluted within 5 min gap in both reversed phase columns and presented similar UV-visible, λ_{max} in the range of 431-441 nm, and mass spectra. The interesting characteristic of all these compounds are the $[M+H]^+$ at m/z 567 and losses of 32 amu (m/z 535), followed by losses of toluene and xylene from the molecular ion and also from 535 amu. Peak **6**, with λ_{max} at 456 nm, showed molecular ion at m/z 599 and two consecutive losses of 32 amu. Peaks **7** and **10** also presented λ_{max} at 455-456, however no mass spectra could be obtained for these peaks. At first sight, the loss of 32 amu was related to loss of methanol, a solvent present in the system. In order to confirm this hypothesis, two other photosensitized oxidations, one with acetonitrile/DCM and another with only DCM were carried out. The same number and type of compounds were obtained in those systems and consequently the loss of 32 amu could not be directly related to methanol from the medium. The possibility of reaction of sulfur (32 amu) from MB was discarded since consumption of MB was observed only in the system with 100% DCM.

In summary, according to **Table 1**, the analysis by HPLC-PDA-MS allowed the identification of four types of products: apo-carotenals from oxidative cleavage, such as peaks **1** and **4**, compounds with one (peaks **2**, **3**, **5A** and **5B**) and two (peak **6**) 32 mass units incorporated, epoxides (peaks **8A** and **8B**) and geometrical isomers of lycopene (peaks **11A**, **11B**, **12** and **12A**) in all solvent systems.

Ben-Aziz et al. (23) obtained lycopene-1,2 and 5,6-epoxides by oxidation MCPBA, and apo-6'-lycopenal and apo-8'-lycopenal with KMnO_4 . More recently, several other epoxides such as lycopene-5,6,5',6'-diepoxide (2%), lycopene-1,2,1',2'-diepoxide (3%), lycopene-1,2,5,6-diepoxide (8%), lycopene-1,2,5',6'-diepoxide (6%), lycopene-1,2-epoxide (18%) and lycopene-5,6-epoxide (25%), were also isolated using MCPBA (3). Oxidation with KMnO_4 was also re-evaluated and a series of cleavage compounds with 8 to 32 carbons were observed, being 8 apo-lycopenals, 6 diapo-lycopenals and 3 apo-lycopenones (4).

Oxidation of lycopene by oxygen catalyzed by a metalloporphyrin ($\text{Ru}(\text{CO})$ TPP) in the presence of acid, a milder oxidation condition than those above, gave *cis*-isomers, lycopene monoepoxides and apo-lycopenals (4). The epoxides were not identified because their low level did not allow the measurement of the visible spectra by PDA.

Seven apo-lycopenals, with 15 to 32 carbons, and one apo-lycopenone were isolated from lycopene autoxidation at 37°C for 72h either in toluene, aqueous emulsion with Tween 40 or liposomal suspension (15). On the other hand, although apo-carotenals were obtained after 1 h, 5,6-epoxy- β -carotene was found to be the major product from autoxidation of β -carotene in benzene at 30°C after 3 h (24).

Not common cleavage and oxidation metabolites were isolated by lycopene incubation with rat intestinal mucosa post-mitochondrial fraction and soy lipoxygenase. Along with lycopene-5,6,5',6'-diepoxide, the following unusual compounds found were 3-keto-apo-13-lycopenone, 3,4-dehydro-5,6-dihydro-15-apo-lycopenal, 1,16,17-trinor-2-ene-5,8-lycopene-furanoxide, lycopene-5,8-furanoxide and 3-keto-lycopene-5',8'-furanoxide (6).

All the above studies did not report the kinetics data both for lycopene and for the compounds formed upon oxidation.

Ukai et al. (16) detected apo-6'-lycopenal as the major product formed during photo-oxidation using MB as sensitizer, remaining 30% of lycopene after 40 h of reaction. Lycopene epoxides or isomers were not found (16). Since a filter to protect the lycopene was not used, competition occurred between photo-oxidation and light degradation (16). Photo-oxidation of β -carotene with bengal rose also gave β -apo-carotenals as major

products, along with β -carotene 5,8-endoperoxide (25). The latter authors suggested the use of 5,8-endoperoxide as a marker for detection of oxidation by O_2 ($^1\Delta_g$), type II, since the carotenals are also obtained by oxidation type I.

Comparing the different conditions used in the present study, **Figure 1** shows that in the presence of the photosensitizer MB and air, both the initial compounds, all-*trans*- and 13-*cis*-lycopene, were consumed with the time of photosensitization. Identical degradation products were observed upon the addition of 20 $\mu\text{g/mL}$ of the radical scavenger butylhydroxytoluene (BHT) in MB aerated solutions. In this case, the relative amount of apo-6'-carotenal (peak **4**) and 1,2-epoxy- and 1,2,1',2'-diepoxy-lycopene (peaks **8A+8B**) increased. However, in N_2 -saturated solutions with MB and under identical illumination conditions, a slower photosensitized degradation of all-*trans*- (peak **11**) and 13-*cis*-lycopene (peak **12**) was observed, and the oxidation products apo-6'-carotenal and epoxides were formed only in trace amounts. In all experiments degradation of MB did not occur. In addition, a control experiment in the absence of MB showed that solely 13-*cis*-lycopene increased.

Figure 4 shows the kinetics curves for the degradation of all-*trans*-lycopene under different experimental conditions.

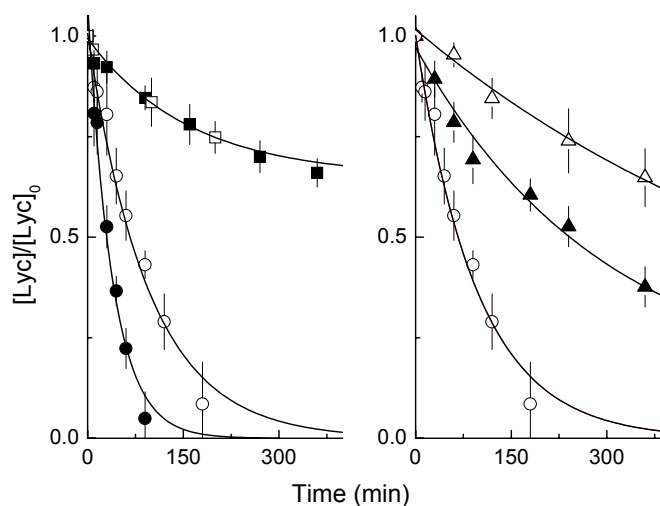


Figure 4. Kinetic curves for the degradation of all-*trans*-lycopene in photosensitized DCM/MeOH (1:1) experiments under several experimental conditions: (●) 2 $\mu\text{g/mL}$ MB + 18 $\mu\text{g/mL}$ Lyc + air at 20°C; (○) 2 $\mu\text{g/mL}$ MB + 30 $\mu\text{g/mL}$ Lyc + air at 20°C; (□) 2 $\mu\text{g/mL}$ MB + 30 $\mu\text{g/mL}$ Lyc + N_2 at 20°C; (■) No MB + 30 $\mu\text{g/mL}$ Lyc + air at 20°C; (▲) 2 $\mu\text{g/mL}$ MB + 30 $\mu\text{g/mL}$ Lyc + air at 15°C; (△) 2 $\mu\text{g/mL}$ MB + 30 $\mu\text{g/mL}$ Lyc + air at 10°C. Solid lines represent the first-order fitting of the experimental data.

In all cases, a first-order decay behavior was observed, and the observed rate constant k_{obs} (**Table 2**), was obtained by exponential fitting of the experimental data using equation 1.

$$[\text{Lyc}]_t = [\text{Lyc}]_0 \exp(-k_{\text{obs}}t) \quad (1)$$

Table 2. Observed first-order rate constant, k_{obs} , for the degradation of all-*trans*-lycopene in DCM/MeOH solutions irradiated with light above 625 nm.

[MB] ($\mu\text{g/mL}$)	[Lyc] ₀ ($\mu\text{g/mL}$)	Temp °C	Experimental conditions	$k_{\text{obs}} \times 10^{-4}$ (min^{-1}) ^a	R ²
2	30	10	Air	0.3 ± 0.1	0.913
2	30	15	Air	0.6 ± 0.2	0.925
2	18	20	Air	4.3 ± 0.4	0.978
2	30	20	Air	1.7 ± 0.2	0.986
2	30	20	Air + 20 $\mu\text{g/mL}$ BHT ^b	1.1 ± 0.2	0.985
0	30	20	Air	0.6 ± 0.2	0.985
2	30	20	N ₂	0.5 ± 0.2	0.983

^aAverage and standard deviation of duplicate experiments.

^bMaximum BHT concentration allowed by the Brazilian Food Regulations

In the presence of the photosensitizer MB and air, the rate for the lycopene consumption decreased with the initial carotene concentration. In the presence of BHT the products formed were the same as in the system without this radical scavenger, however k_{obs} was smaller, as can be observed in **Table 2**. On the other hand, the degradation rates of Lyc in both N₂-saturated solutions of MB and in aerated solutions in the absence of MB were similar.

According to this mechanism, under continuous irradiation and in the presence of oxygen both epoxides were simultaneously formed followed by decay at similar rate (ca. $1.0 \times 10^{-4} \text{ min}^{-1}$). Apo-6'-lycopenal was also formed at similar rates (**Figure 5**).

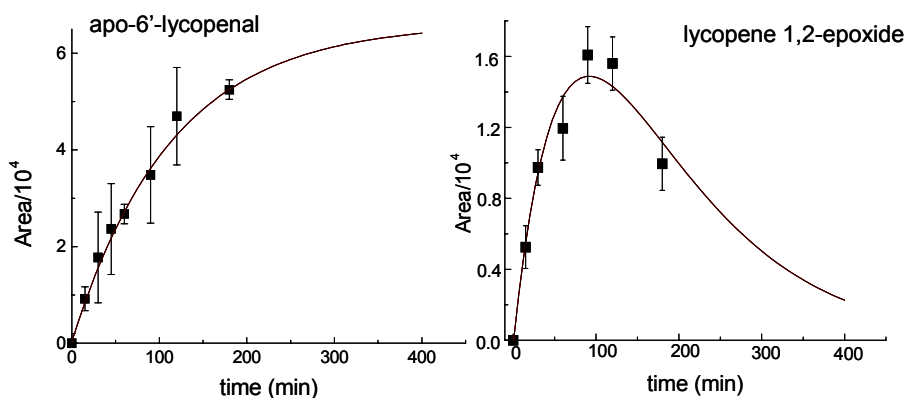
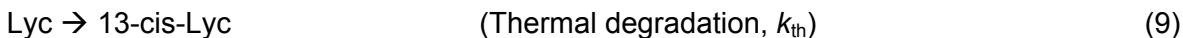
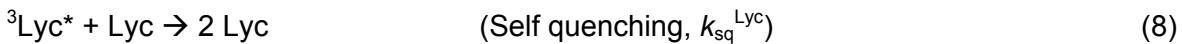
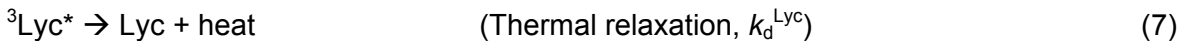
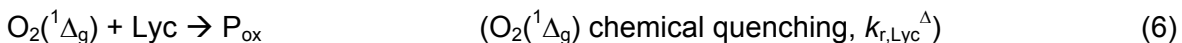
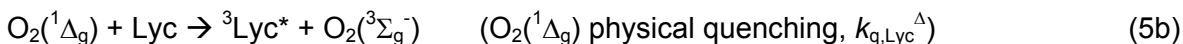
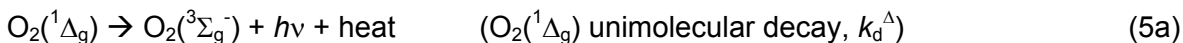
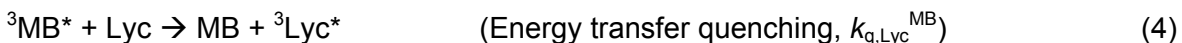
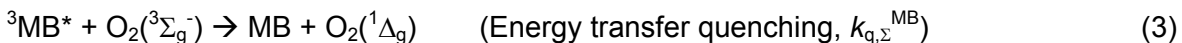
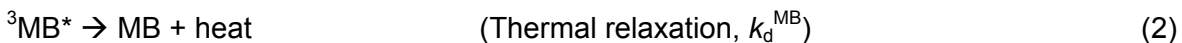


Figure 5. Kinetic curves for the apo-6'-lycopenal and lycopene 1,2-epoxide in photosensitized experiment in DCM/MeOH (1:1) with 2 $\mu\text{g/mL}$ MB + 30 $\mu\text{g/mL}$ Lyc + air at 20 $^{\circ}\text{C}$.

The combined results obtained in the present study indicate that in presence of light, air and MB, the degradation of all-*trans*-lycopene occurs according to schemes 1 - 6, and by less extended thermal degradation step, scheme 7, where P_{ox} represents peaks **1** to **12A**.



It is well known that carotenoids are efficient quenchers of $\text{O}_2({}^1\Delta_{\text{g}})$ (7-11,17) and triplet states (17,26). In fact, the physical quenching of $\text{O}_2({}^1\Delta_{\text{g}})$ by lycopene is diffusional (ca. $k_{\text{q}} \approx 10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$), whereas the chemical one was reported to be much lower, $k_{\text{r}} \approx 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (8,11), indicating that ${}^3\text{Lyc}^*$ is the main quenching product formed (step 5). In spite of

the low efficiency of the chemical reaction with $O_2(^1\Delta_g)$ (ca. 10^{-4}), carotenoids are degraded under continuous photosensitized conditions (11,17). The rate of the photosensitized reaction was depending on the initial concentration of Lyc, due to the competitive energy-transfer quenching of the triplet state of the sensitizer $^3MB^*$ by $O_2(^3\Sigma_g^-)$ and Lyc.

The increment of k_{obs} at lower lycopene concentration can be explained by the reduction in the efficiency of $O_2(^1\Delta_g)$ formation (step 3), due to the increases of the quenching efficiency of $^3MB^*$ by lycopene (step 4). This efficiency, calculated as $\tau_T k_q^{MB}[Lyc]/(1+\tau_T k_q^{MB}[Lyc])$, increases almost twice by increasing the lycopene concentration from 18 $\mu\text{g/mL}$ ($\equiv 31 \mu\text{M}$) to 30 $\mu\text{g/mL}$ ($\equiv 52 \mu\text{M}$), by using $\tau_T \leq 1 \mu\text{s}$ for the $^3MB^*$ lifetime in air-saturated organic solvents, and $k_q^{MB} \geq 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ as measured for the quenching of $^3MB^*$ by bixin (17) or for the quenching of the triplet state of chlorophyll (similar triplet energy than MB) by β -carotene (26).

Reactions from the $^3Lyc^*$ were discharged since the same much slower degradation was observed under absence of MB in dark conditions, and in the presence of MB in N_2 -saturated solutions, **Table 2**.

The temperature dependence of k_{obs} in the presence of MB+air was evaluated between 10 and 20°C, yielding observed activation energy ($E_{a_{obs}}$) of $29 \pm 5 \text{ kcal/mol}$. According to the above scheme, only steps 6 and 9 were irreversibly consuming ground state lycopene (Lyc), since the consumption of lycopene gives $^3Lyc^*$, in steps 4 and 5b, which is regenerated to Lyc in steps 7 and 8. Thus the total rate of lycopene degradation can be considered as $k_{obs} = k_{th} + k_r[^1O_2]$, furthermore, as the consuming lycopene steps were probably parallel, the experimental $E_{a_{obs}}$ was composed by $E_{a_{th}} + E_{a_{ox}}$ (thermal + photo-oxidation). Since Henry et al. (27) reported $E_{a_{th}} = 20 \pm 2 \text{ kcal/mol}$ for the thermal degradation of lycopene in an oily system, the photo-oxidation step was much less activated. However, sequential photo-oxidation steps involving primary and secondary oxidation products can not be discarded.

LITERATURE CITED

- (1) Giovannucci, E. Lycopene and prostate cancer risk. Methodological considerations in the epidemiologic literature. *Pure Appl. Chem.* **2002**, *74*, 1427-1434.
- (2) Miller, E. C.; Hadley, C. W.; Schwartz, S. J.; Erdman, J. W.; Boileau, T. W. M.; Clinton, S. C. Lycopene, tomato products, and prostate cancer prevention. Have we established causality? *Pure Appl. Chem.* **2002**, *74*, 1435-1441.
- (3) Khachik, F.; Steck, A.; Niggli, U.; Pfander, H. Partial synthesis and structural elucidation of the oxidative metabolites of lycopene identified in tomato paste, tomato juice, and human serum. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46*, 4874-4884.
- (4) Caris-Veyrat, C.; Schmid, A.; Carail, M.; Böhm, V. Cleavage products of lycopene produced by in vitro oxidations: characterization and mechanisms of formation. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 7318-7325.
- (5) Lu Y.; Etoh, H.; Watanabe, N.; Ina, K.; Ukai, N.; Oshima, S.; Ojima, F.; Sakamoto, H.; Ishiguro, Y. A new carotenoid, hydrogen peroxide oxidation products from lycopene. *Biosci. Biotech. Biochem.* **1995**, *59*, 2153-2155.
- (6) Ferreira, A. L. A.; Yeum, K.-J.; Russel, R. M.; Krinsky, N. I.; Tang, G. Enzymatic and oxidative metabolites of lycopene. *J. Nutr. Biochem.* **2004**, *15*, 493-502.
- (7) Di Mascio, P.; Kaiser, S.; Sies H. Lycopene as the most efficient biological carotenoid singlet oxygen quencher. *Arch. Biochem. Biophys.* **1989**, *274*, 532-538.
- (8) Conn, P. F.; Schalch, W.; Truscott, T. G. The singlet oxygen and carotenoids interaction. *J. Photochem. Photobiol. B. Biol.* **1991**, *11*, 41-47.
- (9) Wilkinson, F.; Brummer, J. G. Rate constants for the decay and reactions of the lowest electronically excited singlet state of molecular oxygen in solution. *J. Phy. Chem. Ref. Data*, **1981**, *10*, 809-999.
- (10) Edge, R.; McGarvey, D. J.; Truscott, T. G. The carotenoids as anti-oxidant- A review. *J. Photochem. Photobiol. B. Biol.* **1997**, *41*, 189-200.
- (11) Montenegro, M. A.; Nazareno, M. A.; Durantini, E. N.; Borsarelli, C. D. Singlet molecular oxygen quenching ability of carotenoids in a reverse-micelle membrane mimetic system. *Photochem. Photobiol.* **2002**, *75*, 353-361.
- (12) Bradley, D. G.; Min, D. B. Singlet oxygen oxidation of foods. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **1992**, *31*, 211-236.
- (13) Lee, M. T.; Chen, B. H. Stability of lycopene during heating and illumination in a model system. *Food Chem.* **2002**, *78*, 425-432.

- (14) Hackett, M. M.; Lee, J. H.; Francis, D.; Schwartz, S. J. Thermal stability and isomerization of lycopene in tomato oleoresins from different varieties. *J. Food Sci.* **2004**, 69, 536-541.
- (15) Kim, S-J.; Nara, E.; Kobayashi, H.; Terao, J.; Nagao, A. Formation of cleavage products by autoxidation of lycopene. *Lipids*. **2001**, 36, 191-199.
- (16) Ukai, N.; Lu, Y.; Etoh, H.; Yagi, A.; Ina, K.; Oshima, S.; Ojima, F.; Sakamoto, H.; Ishiguro, Y. Photosensitized oxygenation of lycopene. *Biosci. Biotech. Biochem.* **1994**, 58, 1718-1719.
- (17) Montenegro, M. A.; Rios, A. O.; Nazareno, M. A.; Mercadante, A. Z.; Borsarelli, C.D. Model studies on the photosensitized isomerization of bixin. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, 52, 367 - 373.
- (18) Nunes, I. L.; Mercadante, A. Z. Production of lycopene crystals from tomato waste. *Ciênc. Tecnol. Alim.* **2004**, 24, 440-447.
- (19) Mercadante, A. Z.; Egeland, E. S. *Handbook of Carotenoids*. G. Britton, S. Liaaen-Jensen, H. Pfander (ed.). Birkhauser Verlag, Basel, 2004, 612p.
- (20) Enzell, C. R.; Back, S. Mass Spectrometry. In: *Carotenoids: Spectroscopy*. Britton, G.; Liaaen-Jensen, S.; Pfander, H., Eds.; Birkhauser: Basel, 1995, vol 1B, pp. 261-320.
- (21) Mercadante, A. Z.; Steck, A.; Pfander, H. Carotenoids from guava (*Psidium guajava* L.): isolation and structure elucidation. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, 47, 145-151.
- (22) Hengartner, U.; Bernhard, K.; Meyer, K.; Englert, G.; Glinz, E. Synthesis, isolation, and NMR-spectroscopy characterization of fourteen (Z)-isomers of lycopene and of some acetylenic didehydro- and tetrahydrolycopenes. *Helvetica Chimica Acta* **1992**, 75, 1849-1865.
- (23) Ben-Aziz, A.; Britton, G.; Goodwin, T. W. Carotene epoxides of *Lycopersicum esculentum*. *Phytochem.* **1973**, 12, 2759-2764.
- (24) Mordí, R. C.; Walton, J. C.; Burton, G. W.; Hughes, L.; Ingold, K. U.; Lindsay, D. A.; Moffat, D. J. Oxidative degradation of β -carotene and β -apo-8'-carotenal. *Tetrahedron* **1993**, 49, 911-928.
- (25) Stratton, S. P.; Schaefer, W. H.; Liebler, D. C. Isolation and identification of singlet oxygen oxidation products of β -carotene. *Chem. Res. Toxicol.* **1993**, 6, 542-547.
- (26) Murov, S. L.; Carmichael, I.; Gordon, L. H. *Handbook of Photochemistry*. Marcel Dekker: New York, 1993.
- (27) Henry, L.K.; Catignani, G.L.; Schwartz, S.J. Oxidative degradation kinetics of lycopene, lutein, and 9-*cis* and all-*trans* β -carotene. *J. Assoc. Oil Chem. Soc.* **1998**, 75, 823-829.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank the Brazilian Foundation FAPESP and DSM Nutritional Products (Switzerland) for their support.

CAPÍTULO 5

ENCAPSULAMENTO DE LICOPENO POR “SPRAY- DRYER” E POR INCLUSÃO MOLECULAR

**EM PREPARAÇÃO PARA SER ENVIADO À REVISTA
“BRAZILIAN ARCHIVES OF BIOLOGY AND TECHNOLOGY”**

RESUMO

Para viabilizar a adição de carotenóides em sistemas hidrofílicos e aumentar a sua estabilidade durante o processamento e estocagem, técnicas de encapsulamento por “spray-dryer” e formação de complexos por inclusão com ciclodextrinas vem sendo avaliadas. Os objetivos do presente trabalho foram: 1) encapsular licopeno por “spray-dryer” utilizando goma arábica/sacarose como material de parede e 2) preparar o complexo licopeno- β -ciclodextrina (CD) e obter o mesmo na forma de pó por liofilização. A eficiência do encapsulamento por “spray-dryer” variou de 94 a 96% e o rendimento médio foi de 51%. As micro-cápsulas apresentaram formas irregulares, porém sem falhas ou aberturas na superfície. A pureza do licopeno (% área do *all-trans*-licopeno) foi de 96,4% antes e de 98,1% após o encapsulamento, devido à redução das porcentagens de área do 9-*cis*-, 13-*cis* e 1,2-epóxi-licopeno. A formação de complexo licopeno- β -CD ocorreu apenas quando utilizada razão molar de 1:4 e o pó obtido por liofilização apresentou coloração rósea. O licopeno não complexado neste processo ficou em torno de 50%. Estruturas volumosas, bem definidas e semelhantes foram observadas nas micrografias da β -CD livre e do complexo licopeno- β -CD. O licopeno apresentou pureza de 97,7% antes e de 91,3% após obtenção do complexo na forma de pó por liofilização, devido ao aumento de 5,2% na área do pico correspondente aos isômeros 13-*cis* + 15-*cis*-licopeno.

Palavras-chave: licopeno, encapsulamento, “spray-dryer”, goma arábica, complexação, ciclodextrinas.

INTRODUÇÃO

A partir de estudos que indicaram que o consumo de alimentos ricos em licopeno, como tomate e seus produtos, bem como altas concentrações de licopeno no sangue têm sido associadas ao menor risco de desenvolvimento de câncer de próstata, o interesse por este carotenóide tem aumentado nos últimos anos (Van den Berg *et al.*, 2000; Giovanucci, 2002; Venkateswaran *et al.*, 2004).

Além das funções benéficas aos seres humanos, os carotenóides também são largamente utilizados como corantes em alimentos, bebidas, cosméticos e rações animais, principalmente de aves e peixes. As indústrias de alimentos e farmacêuticas vêm buscando substituir os corantes sintéticos por naturais devido ao maior apelo do produto natural (Britton *et al.*, 1995).

As propriedades, ações e funções dos carotenóides estão intimamente ligadas a sua estrutura, que apresenta em sua cadeia uma alternância de ligações duplas e simples, as quais geram um sistema de elétrons π que se deslocam sobre a cadeia poliênica, proporcionando a estas substâncias absorção de luz na região do visível e alta reatividade química. A grande maioria dos carotenóides existentes na natureza encontra-se na forma *trans*, devido à maior estabilidade desta conformação em relação à forma *cis*. Como consequência das ligações duplas conjugadas, os carotenóides podem facilmente sofrer isomerização geométrica e oxidação durante o processamento e armazenamento de alimentos, culminando na diminuição ou perda do poder corante e da atividade biológica.

Uma das alternativas que vem sendo avaliada tanto para aumentar a estabilidade destes pigmentos bem como para viabilizar sua adição em ambientes hidrofílicos é o encapsulamento, utilizando técnicas como “spray-dryer” ou formação de complexos com ciclodextrinas (CD).

Estudos de encapsulamento de carotenóides ou de matrizes ricas nestes pigmentos, por “spray-dryer”, utilizando diversos materiais de parede têm sido reportados na literatura. Maltodextrinas (MD) com diferentes equivalentes de dextrose (DE) foram utilizadas para encapsular suco de cenoura (Wagner & Warthesen, 1995) e cristais de all-*trans*- β -caroteno (Desobry *et al.*, 1997), e em combinação com outros açúcares foram utilizadas para encapsular cristais de all-*trans*- β -caroteno (Desobry *et al.*, 1999) e de bixina (Barbosa *et al.*, 2005).

Outro polissacarídeo largamente utilizado é goma arábica, empregada sozinha para encapsular licopeno, obtido de goiaba (Matioli & Rodriguez-Amaya, 2002), em

misturas com MD (Leach *et al.*, 1998; Matioli & Rodriguez-Amaya, 2002) ou com sacarose (Barbosa *et al.*, 2005).

Inclusão de carotenóides com CD utilizando métodos de mistura sólida ou líquida, em razões molares variadas têm sido avaliados em diversos estudos. A inclusão de *trans*- β -caroteno comercial na forma de cristais com β - e γ -CD (razão molar 1:4), foi reportada por Mele *et al.* (1998). Técnica semelhante foi utilizada para preparo de complexos de licopeno, obtido a partir de *Rosa rubiginosa*, com α - e β -CD, em trabalho de Mele *et al.* (2002).

A preparação de complexos carotenóide-CD na forma sólida foi reportada também por Lacrajan *et al.* (2001), em estudo sobre a utilização de lipossomas e β -CD como carreadores para incorporação de três carotenóides (padrões comerciais de β -caroteno e cantaxantina e padrão de luteína isolado de fonte natural) pelo plasma, mitocôndrias e frações de membrana microssomal e nuclear de diversas células de porco, utilizando razão molar 1:10 (carotenóide:CD) e por Polyakov *et al.* (2004) onde β -caroteno comercial ou derivados sintéticos (7'-apo-7',7'-diciano- β -caroteno, 7'-apo-7'-(p-NO₂-C₆H₄)- β -caroteno ou ácido β -caroten-8'-óico) e β -CD (razão molar de 1:1 e 1:2) foram misturados na forma sólida.

Pfitzner *et al.* (2000) em trabalho com formulações à base de carotenóides (padrões comerciais de β -caroteno, licopeno, luteína ou zeaxantina) e metil- β -CD, para suplementação de culturas de células, relataram a utilização de mistura do carotenóide, dissolvido em diclorometano, com solução etanólica da CD para o preparo dos complexos. Inclusão de licopeno, obtido de goiaba, previamente dissolvido em acetona, com solução aquosa de CD (α -, β - ou γ -CD) e razões molares de 1:50, 1:100, 1:150, 1:200 e 1:250 foi reportado por Matioli & Rodriguez-Amaya (2003), sendo obtida inclusão máxima quando utilizada γ -CD e razão molar de 1:200.

Recentemente, uma combinação dos métodos de mistura líquida e sólida foi descrita por Ling *et al.* (2005) para a formação de um complexo de bixina com α -CD.

Diante do acima exposto, este trabalho teve como objetivos: 1) encapsular licopeno por "spray-dryer" utilizando goma arábica/sacarose como material de parede e 2) preparar o complexo licopeno- β -CD e obter o mesmo na forma de pó por liofilização.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção dos cristais de licopeno

Cristais de licopeno foram obtidos de tomate fresco de acordo com Nunes & Mercadante (2004), excluindo-se a etapa de esterilização do tomate. A metodologia consistiu de (1) etapa preliminar para remoção de água com quatro extrações de 30 minutos, cada uma com 30 mL de etanol comercial e posterior descarte do solvente, (2) quatro extrações de 120 minutos com acetato de etila, cada extração com razão massa/solvente de 1:0,7, (3) eliminação do solvente em evaporador rotatório e (4) duas cristalizações com diclorometano/etanol (1:4).

Encapsulamento do licopeno por “spray-dryer”

O encapsulamento por atomização foi realizado em “spray-dryer” (Lab Plant SD-04), operado com pressão do ar de 5 kgf/cm² e temperaturas de entrada e saída de ar de 170 ± 2°C e 113 ± 2°C, respectivamente.

O preparo da emulsão foi realizado dissolvendo-se os encapsulantes (goma arábica/sacarose 8:2) em 200 mL de água destilada a 45°C, sob agitação com magneto e somente após a solução atingir temperatura ambiente, cerca de 15 mg de cristais de licopeno, previamente dissolvidos em diclorometano, foram adicionados lentamente sob vigorosa agitação mecânica em homogeneizador (7000 rpm). Em seguida foram adicionados mais 80 mL de água destilada e a solução foi mantida sob leve agitação durante todo o processo de secagem.

O rendimento do encapsulamento (RE) foi calculado de acordo com a equação 1.

$$RE = \frac{MSD \times 100}{MSA} \quad (\text{eq. 1})$$

onde:

MSA = massa total de sólidos antes do encapsulamento;

MSD = massa total de sólidos obtidos após encapsulamento.

A eficiência do encapsulamento (EE) foi calculada de acordo com McNamee *et al.* (2001), como mostra a equação 2.

$$\%EE = \frac{(LT - LS)}{LT} \times 100 \quad (\text{eq. 2})$$

onde:

LT = licopeno total;

LS = licopeno de superfície.

Complexação com β -ciclodextrina

Cristais de licopeno foram dissolvidos em diclorometano e adicionados lentamente à solução aquosa de β -CD (35°C), sob agitação vigorosa. A mistura resultante permaneceu sob agitação até atingir temperatura ambiente e depois foi mantida em repouso por uma noite no freezer. Posteriormente foi dissolvida com água (35°C), filtrada para remoção do material não complexado e liofilizada para obtenção de pó. Foi testada razão molar de 1:1 e de 1:4 de licopeno- β -CD. O licopeno não complexado, ou seja, o licopeno remanescente no filtro na etapa de filtração foi removido com diclorometano, seco em evaporador rotatório e elevado a volume conhecido, com éter de petróleo para quantificação.

Determinação de licopeno

Baseado nas condições de extração de carotenóides de suco de cenoura encapsulado, descritas por Wagner & Warthesen (1995), desenvolveu-se um método específico para a determinação do licopeno total e de superfície das micro-cápsulas de goma arábica/sacarose.

O pó de licopeno encapsulado foi pesado (cerca de 0,3 g), dissolvido em água destilada (5 mL) e a solução resultante transferida para um tubo de ensaio de 70 mL, ao qual foram adicionados lentamente 7,5 mL de metanol para romper as micro-cápsulas. Após agitação em vórtex, adicionou-se 7,5 mL de diclorometano e agitou-se o tubo de ensaio por inversão para extração do licopeno. A mistura foi então transferida para funil de separação e a segunda e terceira extrações foram feitas com a adição de mais 3 mL de água, 5 mL de metanol e 5 mL de diclorometano cada, agitando a mistura e coletando em cada uma delas a fase contendo o carotenóide. A este extrato foi adicionado sulfato de sódio anidro para retirada da água residual, e em seguida o mesmo foi seco em evaporador rotatório e elevado a volume conhecido, com éter de petróleo para quantificação. As análises foram realizadas em duplicata.

Para a determinação do licopeno da superfície das micro-cápsulas de goma arábica, a adaptação do procedimento descrito por Wagner & Warthesen (1995) deu-se pela centrifugação inicial, a 3000 rpm durante 10 minutos, de uma mistura de 0,5 g de licopeno encapsulado com 5 mL de diclorometano previamente agitados em vórtex. O solvente foi separado e uma segunda extração, nas mesmas condições, foi feita com mais 5 mL de diclorometano, seguido de centrifugação. A fase orgânica foi também centrifugada a 4000 rpm por 7 minutos, visto que a mesma ainda apresentava traços do encapsulante. No caso da centrifugação não ter sido eficiente e a fase orgânica ainda

continuar túrbida, a mesma foi filtrada em membrana Millipore. O extrato foi, então, concentrado em evaporador rotatório e elevado a volume conhecido, com éter de petróleo para quantificação. As análises foram realizadas em duplicata.

Após o processo de inclusão e liofilização foi pesado cerca de 0,01g de pó, adicionados ao mesmo 2 mL de diclorometano e realizada agitação em vórtex. A mistura foi transferida para um funil de separação contendo 10 mL de água destilada, a fase orgânica foi separada e a seguir foram realizadas mais duas extrações com o mesmo volume de diclorometano. A este extrato foi adicionado sulfato de sódio anidro para retirada da água residual, e em seguida o mesmo foi seco sob N_2 e elevado a volume conhecido, com éter de petróleo para quantificação. As análises foram realizadas em duplicata.

Independentemente da extração empregada, a quantificação foi realizada por espectrofotometria no UV - Visível, através de leitura do comprimento de onda máximo de absorção do extrato de licopeno (470 nm) em éter de petróleo, e a concentração calculada considerando uma absortividade ($A^{1\%}_{1cm}$) de 3450 (Davies, 1976).

Microscopia eletrônica de varredura

As micro-cápsulas de licopeno e de goma arábica/sacarose (8:2), assim como a β -CD livre e o complexo licopeno- β -CD (os dois últimos após serem submetidos ao processo de liofilização) foram aspergidos sobre fita metálica adesiva dupla face e colocados sobre suportes metálicos para posterior recobrimento com ouro (75s/40mA) em metalizador a vácuo (Balzers). As micrografias foram obtidas no microscópio JEOL-JSTM modelo T-300 sob aceleração de 10KV através de captura de imagem.

Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

A pureza dos cristais de licopeno, do licopeno encapsulado por “spray-dryer” e do licopeno- β -CD após liofilização foi verificada por CLAE. O equipamento consiste de um sistema quaternário de bombeamento de solventes (Waters), injetor “Rheodyne” de 20 μ L, forno externo com controle de temperatura, desgaseificador “on line” de membrana, detector de arranjo de diodos (DAD, Waters) e sistema de aquisição e processamento de dados Millenium (Waters).

Todos os solventes utilizados foram de grau cromatográfico e previamente filtrados em sistema Millipore de filtração a vácuo, com membrana para solvente orgânico de 0,45

µm. As amostras após serem dissolvidas no solvente de injeção foram filtradas em membrana de polietileno com 0,22 µm de poro.

As separações do licopeno encapsulado por “spray-dryer” foram realizadas em coluna C₃₀ (3 µm, 250 x 4,6 mm) utilizando como fase móvel metanol (MeOH) (0,1% trietilamina -TEA)/ éter *tert*-metil butílico (TBME) (1:1) a 1 mL/min e temperatura da coluna de 33°C e as separações do licopeno-β-CD foram realizadas em coluna C₁₈ monomérica Nova-Pak (4 µm, 300 x 3,9 mm) utilizando como fase móvel gradiente linear de metanol (0,1% TEA)/acetato de etila/água 80:10:10 para 70:30:0 em 20 minutos a 1 mL/min e temperatura da coluna de 29°C.

Os isômeros de licopeno foram identificados, em ambas as colunas, por comparação das informações espectrais com dados da literatura (Hengartner *et al.*; 1992; Mercadante *et al.*, 1999; Nunes & Mercadante, 2004) e com padrões autênticos de *all-trans*-, *5-cis*-, *9-cis*- e *13-cis*-licopeno, cedidos pela DSM Nutritional Products (Suíça).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Encapsulamento por “spray-dryer”

O rendimento médio do encapsulamento nas condições avaliadas neste trabalho foi de $51 \pm 1\%$. Cabe mencionar que o rendimento do processo é altamente dependente da construção do “spray-dryer”, enquanto que a eficiência está relacionada com a natureza química do core e do material de parede.

Chen & Tang (1998) reportaram rendimento superior (67%) ao encontrado neste estudo, no processo de encapsulamento de extrato de carotenóides obtido a partir de resíduos de polpa de cenoura, por “spray-dryer” (Niro Atomizer Co., Denmark), com uma mistura de sacarose/gelatina (3,5:2,5, p/p) como materiais de parede e utilizando 15% de sólidos na alimentação, temperatura do ar de entrada de 135-145°C e temperatura de saída do ar de 90-100°C. Possivelmente o menor rendimento obtido no presente estudo deva-se à utilização de uma temperatura maior de entrada do ar ($170 \pm 2^\circ\text{C}$), a qual pode ter contribuído para uma maior caramelização e aderência da sacarose no equipamento, bem como às diferenças entre os equipamentos utilizados.

Utilizando 15,43% de sólidos na alimentação com maltodextrina (12 DE)/goma arábica na proporção de 3,5:1 como encapsulantes, temperatura de entrada do ar de 200 ou 265°C e temperatura do ar na saída de 110 ou 120°C, Leach *et al.* (1998) relataram atingir rendimento de 98% no processo de obtenção da biomassa seca de *Dunalliella*

salina por “spray-dryer” (Niro Atomizer Mobile Minor Unit, Copenhagen, Denmark), valor bem superior ao rendimento obtido neste estudo, entretanto, sem a utilização de sacarose.

No presente estudo a eficiência variou de 94 a 96%. Wagner & Warthesen (1995) reportaram a obtenção de maior eficiência no encapsulamento de α - (89%) e de β -caroteno (87%) de cenoura utilizando maltodextrina 4 DE como material de parede do que com dextrinas de outras DE. Desobry *et al.* (1997) relataram uma eficiência de $62 \pm 2\%$ no encapsulamento de padrão cristalizado de *trans*- β -caroteno com maltodextrina (25 DE) e em estudo posterior de 78% utilizando a mistura maltodextrina 4 DE e glicose (82:18) (Desobry *et al.*, 1999). Eficiência máxima (86%) no encapsulamento de cristais de bixina foi atingida com a utilização de goma arábica/sacarose (95:5) em trabalho de Barbosa *et al.* (2005), enquanto que com maltodextrina a eficiência foi de 54%, aumentando para 75% com a adição de um emulsificante a maltodextrina.

Pode-se concluir, portanto, que como a eficiência do encapsulamento obtida no presente estudo foi superior às mencionadas em todos estes trabalhos, o material de parede escolhido é extremamente adequado para encapsular licopeno.

Formação do complexo licopeno- β -CD

Utilizando a metodologia descrita foi possível verificar a formação de complexo licopeno- β -CD apenas quando utilizada razão molar de 1:4, sendo que aproximadamente 50% do licopeno adicionado à solução de ciclodextrina permaneceu no filtro na etapa de filtração e a solução resultante apresentou uma coloração rósea. Quando utilizada razão molar de 1:1 todo o licopeno permaneceu no filtro e a solução resultante ficou transparente. O pó com razão molar de 1:4 obtido por liofilização também apresentou coloração rósea.

Formação de complexo de licopeno, obtido a partir de *Rosa rubiginosa*, com α - e β -CD também com razão molar de 1:4 foi reportada por Mele *et al.* (2002), utilizando como técnica de preparo dos complexos a mistura dos compostos na forma sólida. Já em estudo realizado por Matioli & Rodriguez-Amaya (2003), utilizando método de preparo dos complexos de licopeno-CDs na forma líquida e razão molar de 1:50, bastante superior às razões molares avaliadas neste estudo, o licopeno formou complexo com a β - e a γ -CD e não com a α -CD e a inclusão foi máxima com o emprego da γ -CD e razão molar de 1:200, entretanto o rendimento não foi reportado nos dois trabalhos.

Micrografias

As micro-cápsulas obtidas por “spray-dryer” apresentaram formas irregulares, porém mostraram superfícies sem falhas ou aberturas (Fig. 1a e 1b), o que assegura uma proteção eficiente do licopeno. Morfologia semelhante também foi observada por Bertolini *et al.* (2001) em micro-cápsulas de monoterpenos encapsulados com goma arábica e em micro-cápsulas de bixina encapsulada com goma arábica/sacarose (95:5) em trabalho de Barbosa *et al.* (2005). A superfície indentada das micro-cápsulas de goma arábica pode ser atribuída à secagem por “spray-dryer”, que ocasiona encolhimento das partículas durante as etapas de secagem e resfriamento (Sheu & Rosenberg, 1998; Pedroza-Islas *et al.*, 1999). Pode-se observar também que as micro-cápsulas não apresentaram tamanhos uniformes.

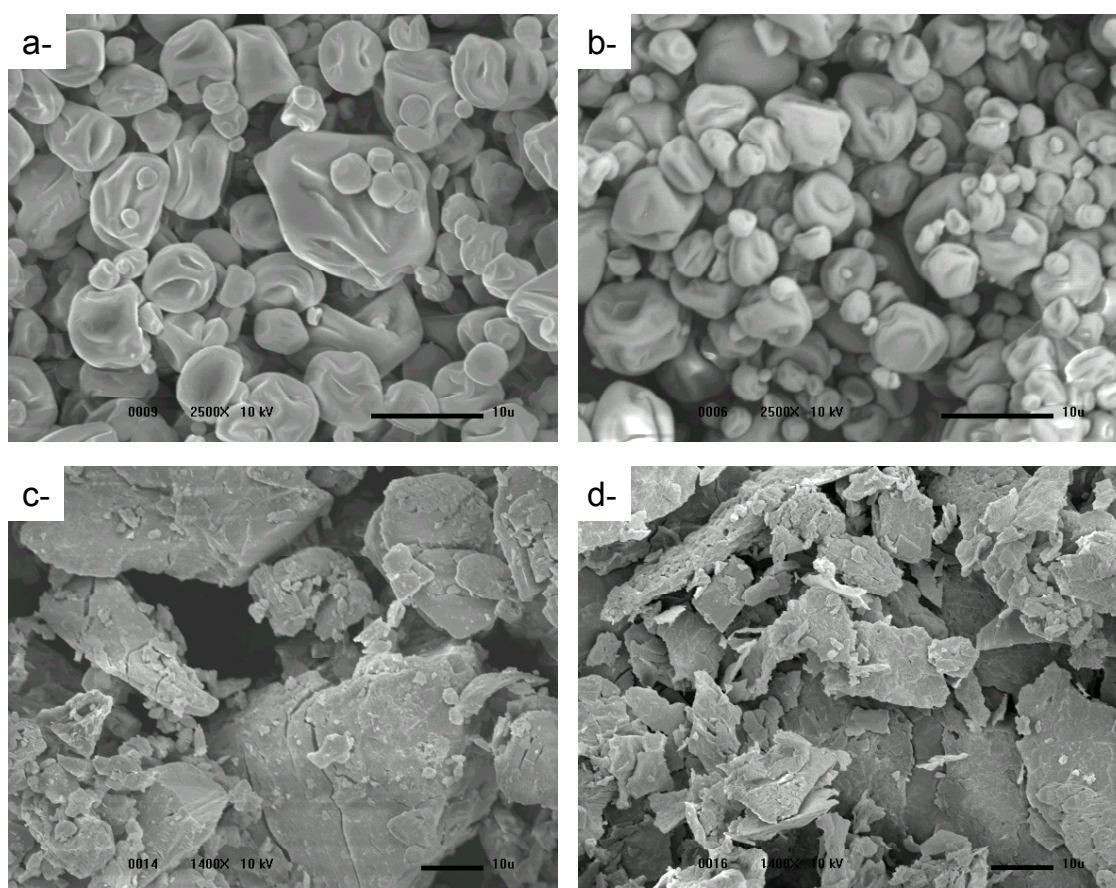


Figura 1 - Micrografia eletrônica. **a-** micro-cápsulas goma arábica + sacarose , **b-** micro-cápsulas goma arábica + sacarose + licopeno (aumento de 2500 x), **c-**β-CD livre, **d-** complexo licopeno-β-CD (aumento de 1400 x).

Para a β -CD livre (Fig. 1c) observa-se uma estrutura volumosa bem definida com pequenos fragmentos de cristais de CD aderidos à superfície da estrutura. Observando-se a micrografia do complexo licopeno- β -CD (Fig. 1d) pode-se perceber estruturas semelhantes às da β -CD livre. Estruturas similares foram apresentadas por Lima (2001) em estudo sobre o encapsulamento de fármacos com β -CD, tanto para a β -CD livre como para os supostos complexos fármacos- β -CD, sugerindo a formação dos complexos de inclusão entre os fármacos.

Pureza do licopeno antes e após o encapsulamento e a inclusão

No processo de encapsulamento por “spray-dryer”, a pureza do licopeno, avaliada por CLAE em coluna C_{30} , aumentou de 96,4% (porcentagem de área correspondente ao pico do *all-trans*-licopeno) (Fig. 2a) para 98,1% após o encapsulamento, principalmente devido à redução das porcentagens de área do 9-*cis*- (0,7%), 13-*cis* (0,7%) e 1,2-epóxi-licopeno (0,3%) (Fig. 2b). Traços de 15-*cis*-licopeno foram detectados somente antes do encapsulamento.

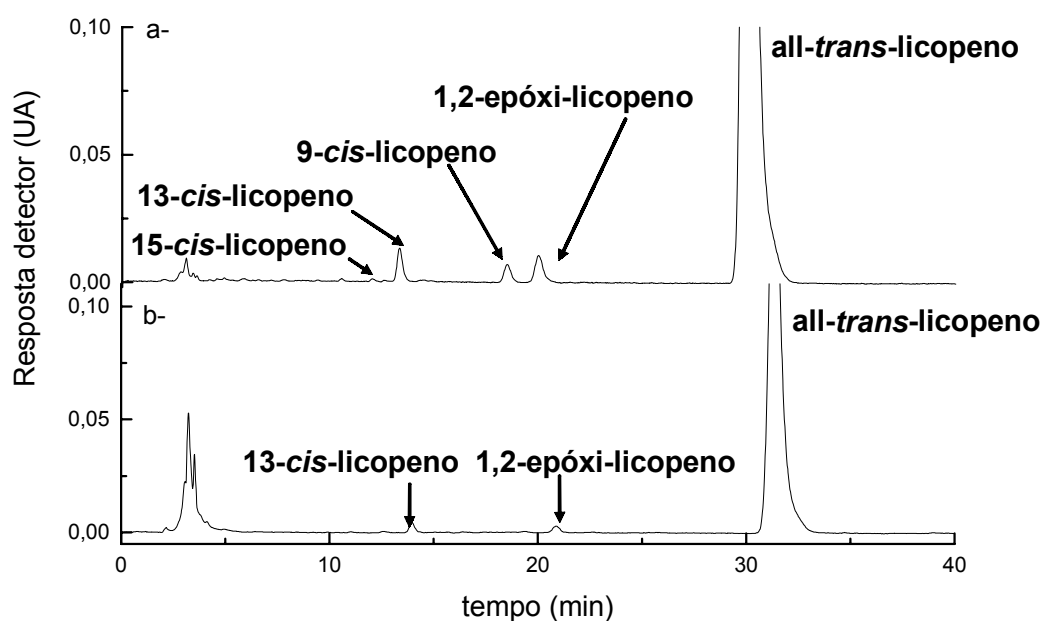


Figura 2 - Cromatogramas obtidos por CLAE: **a**- licopeno utilizado para encapsulamento por “spray-dryer”, **b**- licopeno após o encapsulamento. Condições cromatográficas: coluna C_{30} (3 μ m, 250 x 4,6 mm) utilizando como fase móvel metanol (MeOH) (0,1% trietilamina - TEA)/ éter *tert*-metil butílico (TBME) (1:1) a 1 mL/min e temperatura da coluna de 33°C.

Licopeno, obtido a partir de goiaba vermelha, com 95% de pureza (verificada por CLAE em coluna C₁₈ Vydac), foi utilizado para estudo de encapsulamento por “spray-dryer” com goma arábica e maltodextrina por Mاتيoli & Rodriguez-Amaya (2002), não sendo reportada a pureza do mesmo após o processo.

De acordo com a análise por CLAE em coluna C₁₈ (Fig. 3a), os cristais de licopeno utilizados na obtenção do complexo licopeno-β-CD apresentaram pureza de 97,7% (porcentagem de área correspondente ao pico do *all-trans*-licopeno). Após a obtenção do complexo na forma de pó por liofilização a porcentagem de pureza caiu para 91,3%, ocorrendo um aumento de 5,23% na área do pico correspondente aos isômeros 13-*cis* + 15-*cis*-licopeno (Fig. 3b).

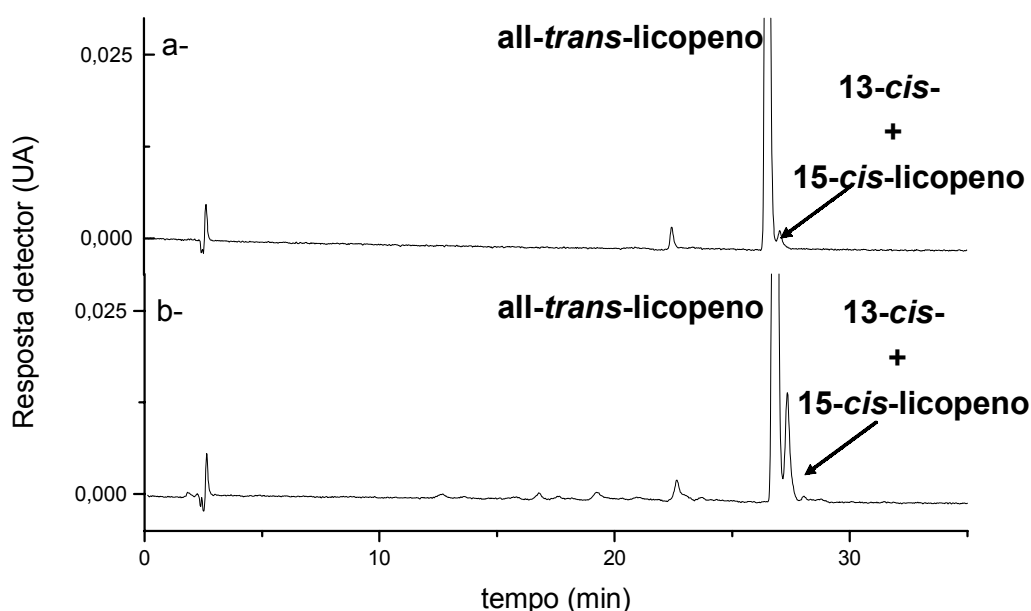


Figura 3 - Cromatogramas obtidos por CLAE: **a-** licopeno utilizado para preparo do complexo, **b-** licopeno após a obtenção do complexo na forma de pó. Condições cromatográficas: coluna C₁₈ monomérica Nova-Pak (4 μm, 300 x 3,9 mm) utilizando como fase móvel gradiente linear de metanol (0,1% TEA)/acetato de etila/água 80:10:10 para 70:30:0 em 20 minutos a 1 mL/min e temperatura da coluna de 29°C.

Mاتيoli & Rodriguez-Amaya (2003) utilizaram licopeno extraído de goiaba vermelha com pureza de 96,8%, similar à utilizada neste trabalho, para encapsulamento com ciclodextrinas. Ling *et al.* (2005) utilizaram bixina, extraída de urucum com pureza > 95%

para complexação com α -CD. Ambos avaliaram a pureza do carotenóide por CLAE em coluna C₁₈.

A pureza do padrão comercial de β -caroteno, utilizado para preparação de complexos com β - e γ -CD (Mele *et al.*, 1998) e a pureza do licopeno, obtido a partir de *Rosa rubiginosa*, utilizado para inclusão em α - e β -CD (Mele *et al.*, 2002) não foram reportadas. A pureza dos carotenóides após a formação dos complexos não foi reportada em nenhum dos trabalhos citados.

O aumento da pureza do *all-trans*-licopeno após o encapsulamento por “spray-dryer” não era esperado devido à utilização de alta temperatura, entretanto, o processo é rápido, enquanto que na liofilização, o aumento dos isômeros (13-*cis*- + 15-*cis*-licopeno) pode estar relacionado ao fato do licopeno permanecer em solução por mais tempo, uma vez que neste caso não foi empregada alta temperatura.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à FAPESP e a DSM Nutritional Products (Suíça) pelo suporte financeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Barbosa, M. I. M. J.; Borsarelli, C. D.; Mercadante, A. Z. (2005), Light stability of spray-dried bixin encapsulated with different edible polysaccharide preparations. *Food Research International*, **38**, 989-994.
- Bertolini, A. C.; Siani, A. C.; Grosso, C. R. F. (2001), Stability of monoterpenes microencapsulated in gum arabic by spray – drying. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **49**, 780-785.
- Britton, G. (1995), UV/visible Spectroscopy. In-Carotenoids, Vol 1B: Spectroscopy, ed. G. Britton; S. Liaaen-Jensen and H. Pfander. Birkhäuser, Basel. pp. 13-62.
- Chen, B. H.; Tang, Y. C. (1998), Processing and stability of carotenoid powder from carrot pulp waste. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **46**, 2312-2318.
- Davies, B.H. (1976), Carotenoids. In-Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments, ed. T. W. Goodwin. Academic Press, London. pp. 38-165.
- Desobry, S. A.; Netto, F. M.; Labuza, T. P. (1997), Comparison of spray-drying, drum-drying and freeze-drying for β -carotene encapsulation and preservation. *Journal of Food Science*, **62**, 1158-1162.
- Desobry, S. A.; Netto, F. M.; Labuza, T. P. (1999), Influence of maltodextrin systems at an equivalente 25 DE on encapsulated β -carotene loss during storage *Journal of Food Processing Preservation*, **23**, 39-55.
- Giovannucci, E. Lycopene and prostate cancer risk. (2002), Methodological considerations in the epidemiologic literature. *Pure and Applied Chemistry*, **74**, 1427-1434.
- Hengartner, U.; Bernhard, K.; Meyer, K.; Englert, G.; Glinz, E. (1992), Synthesis, isolation, and NMR-spectroscopy characterization of fourteen (Z)-isomers of lycopene and of some acetylenic dihydro- and tetrahydrolycopenes. *Helvetica Chimica Acta*, **75**, 1849-1865.
- Lacrajan, I.; Dichl, H. A.; Socaciu, C.; Engelke, M.; Zorn-Kruppa; M. (2001), Carotenoid incorporation into natural membranes from artificial carriers: liposomes and β -cyclodextrins. *Chemistry and Physics of Lipids*, **112**, 1-10.
- Leach, G.; Oliveira, G.; Morais, R. (1998), Spray-drying of *Dunaliella salina* to produce a β -caroteno rich powder. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, **20**, 82-85.
- Lima, H. O. S. (2001), Estudo da encapsulação de fármacos de 1ª linha no tratamento de tuberculose em lipossomas e ciclodextrinas. Tese de doutorado, Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, SP.

- Ling, S. M. O.; Passos, M.; Fontana, J. D. (2005), Bixin and α -cyclodextrin inclusion complex and stability tests. *Process Biochemistry*, **40**, 865-872.
- McNamee, B. F.; O'riordan, E. D.; O'sullivan, M. (2001), Effect of partial replacement of gum arabic with carbohydrates on its microencapsulation properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **49**, 3385-3388.
- Matioli, G.; Rodriguez-Amaya, D. B. (2002), Licopeno encapsulado em goma arábica e maltodextrina: estudo da estabilidade. *Brazilian Journal of Food Technology*, **5**, 197-203.
- Matioli, G.; Rodriguez-Amaya, D. B. (2003), Microencapsulação do licopeno com ciclodextrinas. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, **23** (supl.), 102-105.
- Mele, A.; Mendichi, R.; Selva, A. (1998), Non-covalent associations of cyclomaltooligosaccharides (cyclodextrins) with *trans*- β -caroteno in water: evidence for the formation of large aggregates by light scattering and NMR spectroscopy. *Carbohydrate Research*, **310**, 261-267.
- Mele, A.; Mendichi, R.; Selva, A.; Molnar, P.; Toth, G. (2002), Non-covalent associations of cyclomaltooligosaccharides (cyclodextrins) with carotenoids in water. A study on the α - and β - cyclodextrin- ψ , ψ -carotene (lycopene) systems by light scattering, ionspray ionization and tandem mass spectrometry. *Carbohydrate Research*, **337**, 1129-1136.
- Mercadante, A. Z.; Steck, A.; Pfander, H. C. (1999), Carotenoids from guava (*Psidium guajava* L.): isolation and structure elucidation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **47**, 145-141.
- Nunes, I.; Mercadante, A. Z. (2004), Obtenção de cristais de licopeno a partir de descarte de tomate. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, **24**, 440-447.
- Pedroza-Islas, R.; Vernon-Carter, E. J., Dúran-Domínguez, C.; Trejo-Martinez, S. (1999), Using biopolymer blends for shrimp feedstuff microencapsulation – I. Microcapsule particle size, morphology and microstructure. *Food Research International*, **32**, 367-374.
- Pfitzner, I.; Francz, P. I.; Biesalski, H. K. (2000), Carotenoid:methyl- β -cyclodextrin formulations: an improved method for supplementation of cultured cells. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1474**, 163-168.
- Polyakov, N. E.; Leshina, T.V.; Konovalova, T. A.; Hand, E. O.; Kispert, L. D. (2004), Inclusion complexes of carotenoids with cyclodextrins: ^1H NMR, EPR, and optical studies. *Free Radical Biology & Medicine*, **36**, 872-880.
- Sheu, T. Y.; Rosenberg, M. (1998), Microstructure of microcapsules consisting of whey proteins and carbohydrates. *Journal of Food Science*, **63**, 491-494.

- Van Den Berg, H.; Faulks, R.; Granado, H. F.; Hirschberg, J.; Olmedilla, B.; Southon, S.; Sthal, W. (2000), The potential for the improvement of carotenoid levels in foods and the likely systemic effects. *Journal of the Science of Food Agriculture*, **80**, 880 -912.
- Venkateswaran, V.; Fleshner, N. E.; Sugar, L. M.; Klotz, L. H. (2004), Antioxidants block prostate cancer in lady transgenic mice. *Cancer Research*, **64**, 5891-5896.
- Wagner, L. A.; Warthesen, J. J. (1995) Stability of spray-dried encapsulated carrot carotenes. *Journal of Food Science*, **60**, 1048-1053.

CAPÍTULO 6

EFEITO PROTETOR DE LICOPENO ENCAPSULADO NA DEGRADAÇÃO DE VITAMINAS A E D EM LEITE

**EM PREPARAÇÃO PARA SER ENVIADO À REVISTA
“JOURNAL OF AGRICULTURAL AND FOOD CHEMISTRY”**

RESUMO

Uma das principais causas de alterações no leite é a exposição direta à luz, devido à interação da mesma com a riboflavina (Rf) presente em quantidades apreciáveis em todos os produtos lácteos. Em presença de oxigênio, a excitação da Rf gera espécies reativas oxidantes, tais como oxigênio singlete e radicais livres, que reagem com os componentes do leite, ocasionando perda de qualidade nutricional e diminuição da vida útil. Quando o leite foi estocado no escuro, as vitaminas A e D₃ mostraram-se estáveis, enquanto que na presença de luz a velocidade de degradação que seguiu modelo cinético de primeira ordem, da vitamina A foi maior ($k_{obs} \text{ } 8^{\circ}\text{C} = 0,24 \text{ h}^{-1}$) do que da vitamina D₃ ($k_{obs} \text{ } 8^{\circ}\text{C} = 0,02 \text{ h}^{-1}$). O consumo do licopeno encapsulado ($k_{obs} \text{ } 8^{\circ}\text{C} = 0,03 \text{ h}^{-1}$) disperso em água em presença de luz seguiu um modelo cinético de primeira ordem. A adição de 2 μM de licopeno encapsulado ao leite aumentou em cerca de 1,8 vezes a estabilidade das vitaminas. Entretanto, o fato de que a fração de moléculas de vitamina protegidas ($f_{vit} \approx 0,46$) foi maior do que o valor da fração de O₂(¹ Δ_g) desativada por licopeno (f_{Δ}), indica a presença de um mecanismo de proteção adicional ao da desativação de O₂(¹ Δ_g). Devido à absorção de luz na região de 200 a 550 nm o licopeno exerce também um efeito de filtro sobre a Rf, absorvendo a maior parte da radiação emitida pela lâmpada. Estes resultados indicam que o licopeno encapsulado pode atuar como um eficiente antioxidante em amostras de leite, uma vez que o encapsulamento não altera a sua capacidade de desativação de O₂(¹ Δ_g) e retarda os processos oxidativos que envolvem radicais livres e, além disso, atua combinadamente como filtro prevenindo a formação de Rf no estado triplete excitado.

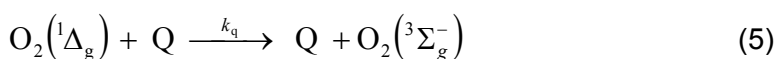
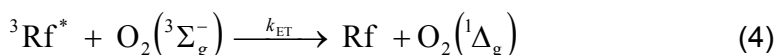
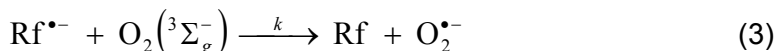
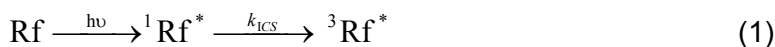
PALAVRAS-CHAVE: licopeno encapsulado; vitamina A; vitamina D₃; proteção, antioxidante; filtro

INTRODUÇÃO

Alterações no valor nutricional, no sabor e cor do leite são freqüentemente produzidas após sua exposição à luz, ao ar, à alta temperatura e ao armazenamento prolongado (1, 2). Em particular a exposição à luz induz reações químicas que causam a degradação de vitaminas (A, D, B₂), proteínas, aminoácidos e lipídios (3-9). Além da perda nutricional e de qualidade, ocorre formação de compostos tóxicos como óxidos de colesterol (10).

A interação entre a luz, oxigênio e compostos denominados sensibilizadores, tais como riboflavina (Rf) presente em leite (4) e clorofila em óleos vegetais (11), causa foto-oxidação em alimentos, através da produção de radicais livres e oxigênio molecular singlete (O₂(¹Δ_g)) que por sua vez podem oxidar os constituintes dos alimentos, tais como ácidos graxos insaturados, vitaminas, proteínas e aminoácidos (12). O grau de alteração no leite depende de fatores tais como comprimento de onda e intensidade da luz, tempo de exposição, tipo de embalagem, área superficial exposta e temperatura (13, 14).

A riboflavina ao absorver luz passa do seu estado singlete fundamental (¹Rf) para o estado singlete excitado (¹Rf*), que é convertido no estado triplete excitado (³Rf*), pelo cruzamento entre sistemas (Eq 1), o qual pode seguir dois mecanismos de reação, Tipo I ou Tipo II (15). No mecanismo **Tipo I**, ³Rf* reage com um substrato (Q), como proteínas ou ácidos graxos para produzir radicais livres e íons radicais (Eqs 2 e 3). No mecanismo **Tipo II** o ³Rf* reage com oxigênio molecular fundamental triplete, O₂ (³Σ_g⁻), para produzir O₂ (¹Δ_g) excitado (Eq 4). O O₂ (¹Δ_g) pode ser desativado por um mecanismo de transferência de energia conhecido como desativação física (Eq 5) ou por desativação química que corresponde à reação com compostos ricos em elétrons (Q) tais como ácidos graxos, vitaminas lipossolúveis, aminoácidos, etc, conduzindo à degradação destes compostos (Eq 6).



Os alimentos possuem antioxidantes naturais, tais como carotenóides e tocoferóis, que podem proteger contra as oxidações, entretanto, o leite contém baixas concentrações destes compostos, que com frequência são perdidos durante o processamento e armazenamento, ou na obtenção de leite desnatado (16).

Os carotenóides são considerados os mais eficientes desativadores de $O_2(^1\Delta_g)$ dentre os compostos naturais, não somente devido ao alto valor de k_t , mas também por que $k_q \gg k_r$ indicando que os carotenóides possuem grande capacidade catalítica para desativar o $O_2(^1\Delta_g)$ (17).

Como a luz fluorescente ($\lambda_{\text{emissão}} > 350 \text{ nm}$) usada nas gôndolas expositoras proporciona condições ótimas para a promoção de reações deteriorantes iniciadas pela R_f , e considerando que o licopeno é o mais eficiente desativador de $O_2(^1\Delta_g)$ dentre os carotenóides (18), este estudo teve como objetivo avaliar o efeito da adição de licopeno na estabilidade das vitaminas A e D em leite.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção do licopeno. Cristais de licopeno foram obtidos de tomate fresco de acordo com Nunes & Mercadante (19), excluindo-se a etapa de esterilização do tomate. A metodologia consistiu de (1) etapa preliminar para remoção de água com quatro extrações de 30 minutos, cada uma com 30 mL de etanol comercial e posterior descarte do solvente, (2) quatro extrações de 120 minutos com acetato de etila, cada extração com razão massa/solvente de 1:0,7, (3) eliminação do solvente em evaporador rotatório e (4) duas cristalizações com diclorometano/etanol (1:4). Os cristais de licopeno apresentaram 98% de pureza, verificada por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD), em coluna C_{30} utilizando como fase móvel metanol (0,1% trietilamina)/éter *tert*-metil butílico (1:1).

Encapsulamento do licopeno. O encapsulamento por atomização foi realizado em spray-dryer (Lab Plant SD-04), operado com pressão do ar de 5 kgf/cm^2 e temperaturas de entrada e saída de ar de $170 \pm 2^\circ\text{C}$ e $113 \pm 2^\circ\text{C}$, respectivamente.

O preparo da emulsão foi realizado dissolvendo-se os encapsulantes (goma arábica/sacarose 8:2) em 200 mL de água destilada a 45°C sob agitação com magneto e somente após a solução atingir temperatura ambiente, cerca de 15 mg de cristais de licopeno, previamente dissolvidos em diclorometano, foram adicionados lentamente sob vigorosa agitação mecânica em homogeneizador (7000 rpm). Em seguida foram

adicionados mais 80 mL de água destilada e a solução foi mantida sob leve agitação durante todo o processo de secagem. O encapsulamento foi realizado em duplicata, com eficiência de encapsulamento de 94-96% (determinado no capítulo 5).

Extração do licopeno. Baseado nas condições de extração de carotenóides de suco de cenoura encapsulado, descritas por Wagner & Warthesen (20), desenvolveu-se um método específico para a determinação do licopeno total das micro-cápsulas.

Uma alíquota homogênea de 5 mL foi retirada do sistema-modelo e transferida para um tubo de ensaio de 70 mL, à qual foram adicionados 7,5 mL de metanol para romper as micro-cápsulas. Após agitação em vórtex, adicionou-se 7,5 mL de diclorometano e agitou-se o tubo de ensaio por inversão para extração do licopeno. A mistura foi então transferida para um funil de separação e a segunda e terceira extrações foram feitas com a adição de mais 3 mL de água, 5 mL de metanol e 5 mL de diclorometano cada, agitando a mistura e coletando em cada uma delas a fase contendo o carotenóide. A este extrato foi adicionado sulfato de sódio anidro para retirada da água residual.

O extrato de licopeno foi seco em evaporador rotatório e elevado a volume conhecido, com éter de petróleo para quantificação. A medida da concentração foi realizada através de leitura do comprimento de onda máximo de absorção do extrato total por espectrofotometria no UV - Visível, em éter de petróleo, e a absorvidade ($A^{1\%}_{1\text{cm}}$) utilizada foi de 3450 (21). As análises foram realizadas em duplicata.

Preparo das amostras de leite. Leite em pó comercial desnatado (70 g) fortificado com vitaminas A e D₃ foi dissolvido em 700 mL de água destilada estéril. Os materiais utilizados foram previamente esterilizados e a preparação da amostra foi realizada em câmara de fluxo laminar sob iluminação reduzida.

Extração das vitaminas do leite. Foi utilizado o método proposto por Indyk & Woollard (22), que resumidamente envolve a saponificação do leite com 1% pirogalol em etanol e KOH 50% em água, por uma noite à temperatura de 25°C, no escuro sob atmosfera de N₂, seguido de três extrações com 30 mL de etanol/água (1:2) e 80 mL de éter de petróleo/éter etílico (9:1). Após lavagem do extrato etéreo com água até a neutralidade, o extrato foi concentrado em evaporador rotatório ($T < 40^\circ\text{C}$), seco sob N₂ e armazenado em freezer.

Estabilidade. Amostras de leite desnatado comercialmente fortificadas com 4,3 µg/mL de vitamina D₃ e 0,6 µg/mL de vitamina A foram expostas à luz fluorescente ($\cong 8000$ lux) ou mantidas no escuro a $8 \pm 1^\circ\text{C}$ e $21 \pm 2^\circ\text{C}$, na presença de oxigênio. Foi também realizado um experimento na temperatura de 8°C com adição de ca. 2 µM de

licopeno encapsulado para avaliação do efeito protetor deste carotenóide na estabilidade das vitaminas.

Licopeno encapsulado (ca. 2 μ M) foi disperso em solução aquosa contendo 0,5% de sorbato de potássio para evitar crescimento microbiano, e exposto à luz a 8°C.

Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). O equipamento utilizado consiste de um sistema quaternário de bombeamento de solventes (Waters), injetor “Rheodyne” de 20 μ L, forno externo com controle de temperatura, desgaseificador “on line”, detector de arranjo de diodos (DAD, Waters) e sistema de aquisição e processamento de dados Millenium (Waters).

A pureza dos cristais de licopeno foi verificada em coluna C₃₀ (3 μ m, 250 x 4,6 mm) utilizando como fase móvel metanol (0,1% trietilamina)/éter *tert*-metil butílico (1:1) a 1 mL/min e temperatura da coluna de 33°C.

As vitaminas A e D₃ foram separadas em coluna C₁₈ Vydac 218TP54 (4,6 x 250 mm, 5 μ m), a 23°C, com acetonitrila/metanol (90:10) como fase móvel com vazão de 1,2 mL/min, e detecção a 265 nm (vitamina D₃) e 324 nm (vitamina A). A identificação foi realizada por co-cromatografia com amostras padrões e através do espectro de absorção no UV, e a quantificação através de calibração externa por comparação das áreas dos picos das amostras com as áreas dos padrões injetados diariamente.

Análise dos dados. Os resultados do monitoramento da estabilidade foram expressos através de curvas e parâmetros cinéticos, utilizando o software Origin 5.0.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O procedimento escolhido para a extração das vitaminas A e D₃ do leite desnatado fortificado foi eficiente em relação à retirada de possíveis interferentes e as condições cromatográficas utilizadas permitiram a separação das vitaminas na linha base (**Figura 1A**). A degradação das vitaminas A e D₃ do leite, sob temperatura de 8°C, pode ser observada nos cromatogramas apresentados na **Figura 1B**, pela redução dos picos com o aumento do tempo de exposição à luz.

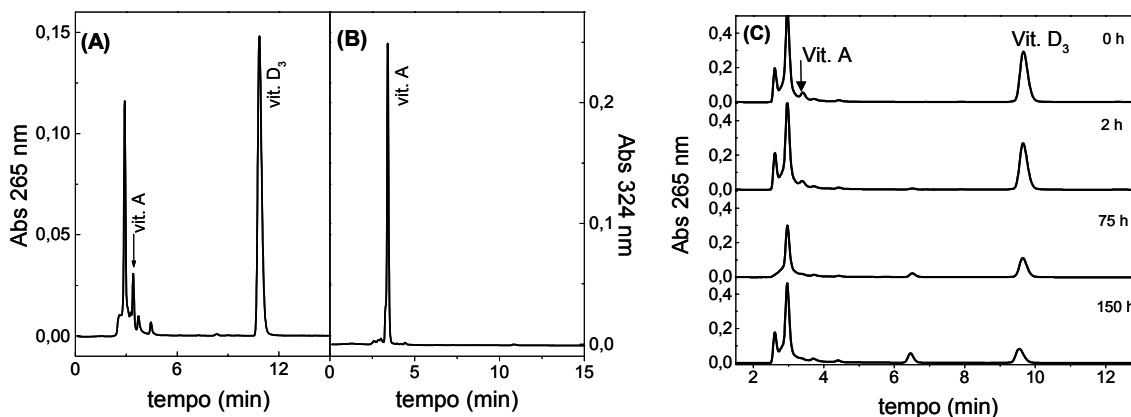


Figura 1. Cromatogramas, obtidos por CLAE, dos extratos de leite: (A) processamento a 265 nm, (B) processamento a 324nm e (C) em diferentes tempos de exposição à luz a 8°C. Condições cromatográficas: coluna C₁₈-Vydac, fase móvel acetonitrila/metanol (90:10) a 1,2 mL/min.

A lâmpada fluorescente emite radiação acima de 380 nm, produzindo somente excitação de compostos que absorvem na região do visível como a Rf (**Figura 2**). Além disso, como as amostras de leite foram armazenadas durante a iluminação em tubos de vidro Pirex, o qual absorve radiação de $\lambda < 350$ nm, não ocorreu a iluminação das vitaminas A e D₃.

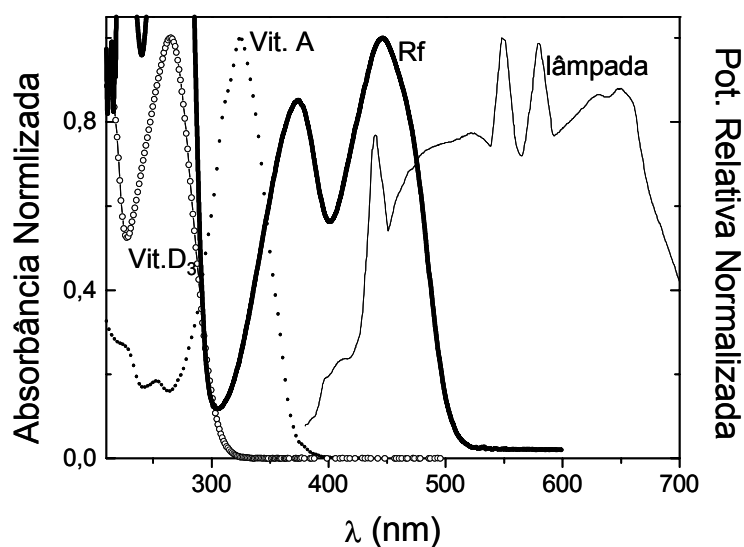


Figura 2. Espectros de absorção normalizados de riboflavina, vitaminas A e D₃ em etanol, e espectro de emissão normalizado da lâmpada fluorescente (23).

Os perfis cinéticos a 8°C, do consumo das vitaminas A e D₃ obtidos através das áreas dos picos por CLAE, estão apresentados nas **Figuras 3A e 3B** e o perfil cinético de degradação do licopeno encapsulado, obtido através da absorbância, por espectrofotômetro, pode ser observado na **Figura 3C**.

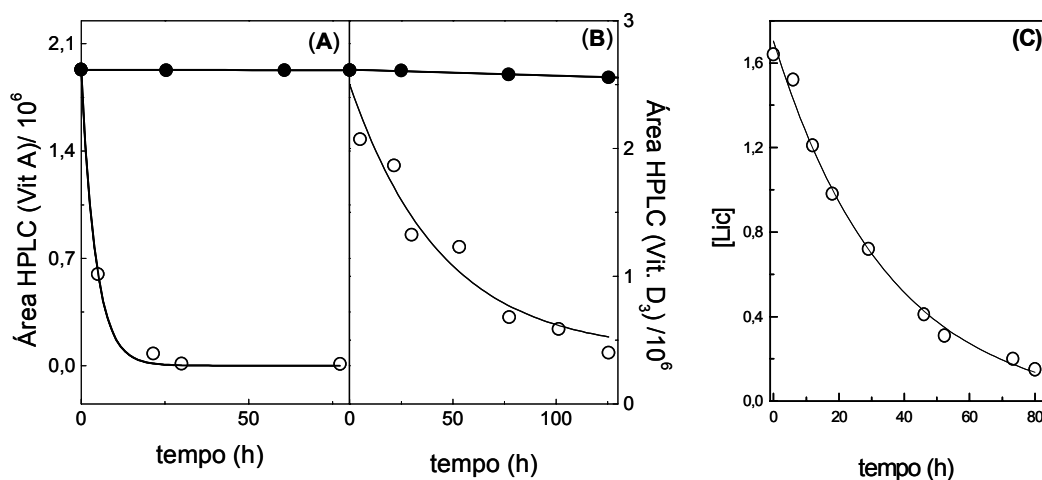


Figura 3. Curvas cinéticas a 8°C: (A) vitamina A, (B) vitamina D₃ e (C) licopeno encapsulado. (○) luz, (●) escuro.

De acordo com as curvas cinéticas (**Figuras 3A e 3B**) pode-se verificar que as vitaminas são estáveis no escuro. A velocidade de degradação da vitamina A é maior do que da vitamina D₃ nas duas temperaturas avaliadas (**Tabela 1**), similar ao observado em solventes homogêneos, e concordante com os valores de energia de ativação (**Tabela 1**) obtidos a partir da eq. 1.

$$\ln \frac{k_1}{k_2} = -\frac{E_a}{R} \left(\frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_2} \right) \quad (1)$$

onde k_1 e k_2 são as constantes de pseudo-primeira ordem observadas nas temperaturas T_1 e T_2 , E_a é a energia de ativação e R representa a constante dos gases.

Tabela 1. Constantes de velocidade de pseudo-primeira ordem e energias de ativação para degradação foto-sensibilizada de vitaminas A e D₃.

Vitamina	k_{obs} 21°C (h ⁻¹)	k_{obs} 8°C (h ⁻¹)	$k_{\text{obs}}^{21^\circ\text{C}}/k_{\text{obs}}^{8^\circ\text{C}}$	E_a (kcal/mol)
Vitamina A	0,32	0,24	1,35	4
Vitamina D ₃	0,07	0,02	3,5	16

A velocidade de degradação do licopeno encapsulado com goma arábica/sacarose (8:2) em sistema aquoso foi de 0,03 h⁻¹, seguindo um modelo cinético de primeira ordem (**Figura 3C**).

Em estudo realizado por Sharma & Le Maguer (24) a degradação de licopeno de polpa de tomate seguiu uma cinética de pseudo-primeira ordem, com $k_{\text{obs}} = 0,001 \text{ h}^{-1}$, na temperatura de 25°C em presença de luz (intensidade não relatada) e oxigênio. A maior k_{obs} encontrada no presente estudo, pode ser possivelmente devido à menor concentração de licopeno utilizada (ca. 2 μM) bem como à menor proteção da micro-cápsula em comparação com a proteção dos tecidos naturais do tomate ou à maior quantidade de luz incidente.

Cabe ressaltar que no presente trabalho não foram realizados experimentos para avaliar a estabilidade do licopeno no escuro pelo fato de que as vitaminas A e D₃ não degradaram na ausência de luz na temperatura avaliada. Além disso, diversos estudos têm demonstrado uma maior estabilidade de licopeno e demais carotenóides no escuro do que sob luz em diferentes sistemas-modelo (25-27).

Sob temperatura de 8°C em presença de luz, o licopeno foi consumido mais lentamente (0,03 h⁻¹) do que a vitamina A (0,24 h⁻¹) e mais rápido do que a vitamina D₃ (0,02 h⁻¹), entretanto grande parte da desativação do O₂(¹Δ_g) por ação do licopeno ocorre por processo físico, onde o mesmo retorna ao estado fundamental sem ser destruído.

Com o objetivo de avaliar o efeito protetor dos carotenóides na degradação das vitaminas A e D₃ em amostras de leite desnatado foi adicionada uma pequena quantidade de licopeno encapsulado com goma arábica/sacarose ([Lic] = 2 μM) de modo que a coloração original do leite não fosse alterada. Considerando que a concentração de carotenóides em leite integral é de aproximadamente 0,5 μM (28), a concentração adicionada foi quatro vezes maior do que a concentração de carotenóides no leite. A **Figura 4** mostra o efeito da adição de licopeno sobre o perfil cinético do consumo de vitamina D₃, obtido pela análise das áreas dos picos por CLAE, para as amostras de leite

a 8°C. Os resultados indicam que licopeno encapsulado reduziu eficientemente a velocidade de degradação de ambas vitaminas (**Tabela 2**).

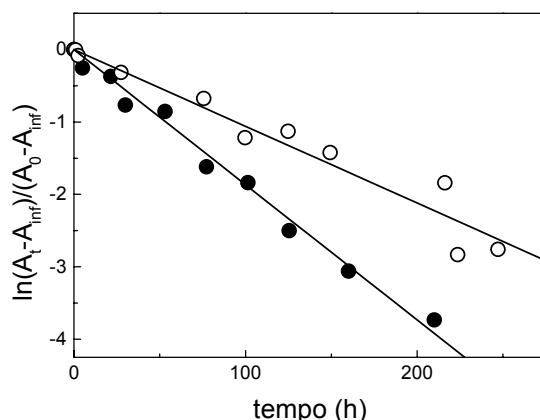


Figura 4. Perfis cinéticos obtidos através das áreas dos picos, por CLAE, para vitamina D₃, durante a iluminação das amostras de leite a 8 °C. (●) ausência de licopeno encapsulado, (○) presença de licopeno encapsulado.

Tabela 2. Constantes de velocidade de pseudo-primeira ordem para a degradação foto-sensibilizada das vitaminas A e D₃ a 8°C, em presença e ausência de licopeno encapsulado.

Vitamina	$k_{obs} (h^{-1})$ sem licopeno	$k_{obs} (h^{-1})$ com licopeno	razão k sem e com $(k_{obs}^{Vit} / k_{obs}^{Vit,L})$
Vitamina A	0,24	0,13	1,83
Vitamina D ₃	0,02	0,011	1,81

Com o objetivo de avaliar a capacidade protetora de licopeno encapsulado na degradação das vitaminas A e D₃, levou-se em conta que a velocidade de oxigenação das vitaminas (Vit) em presença e ausência de licopeno (L) é dada pela eq. 2 , de acordo com a dedução para o caso de triptofano (29):

$$-\frac{d[\text{Vit}]}{dt} = I_a \Phi_{\Delta} k_r^{\text{Vit}} [\text{Vit}] / (k_d + k_q^{\text{Vit}} [\text{Vit}] + k_q^{\text{L}} [\text{L}]) \quad (2)$$

onde I_a é a velocidade de absorção de fótons pelo sensibilizador, Φ_{Δ} é o rendimento quântico de $\text{O}_2(^1\Delta_g)$.

Considerando $[\text{Vit A}] = 2,1 \mu\text{M}$, $[\text{Vit D}_3] = 12 \mu\text{M}$, e constantes bimoleculares de desativação de $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ pelas vitaminas A e D₃ (em benzeno), $k_q^{\text{vitA}} = 1 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ e $k_q^{\text{vitD}} = 4 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (30), respectivamente, tem-se que $k_q^{\text{Vit}} [\text{Vit}] \ll k_d + k_q^{\text{L}} [\text{L}]$, e a eq. 2 pode ser expressa como:

$$-\frac{d \ln[\text{Vit}]}{dt} = I_a \Phi_{\Delta} k_r^{\text{Vit}} [\text{Vit}] / (k_d + k_q^{\text{L}} [\text{L}]) = k_{\text{obs}}^{\text{Vit,L}} \quad (3)$$

onde $k_{\text{obs}}^{\text{Vit,L}}$ é a tangente do gráfico de primeira ordem para o consumo de vitamina em presença de licopeno encapsulado.

Em ausência de licopeno, o consumo de vitaminas é dado por:

$$-\frac{d \ln[\text{Vit}]}{dt} = I_a \Phi_{\Delta} k_r^{\text{Vit}} [\text{Vit}] / k_d = k_{\text{obs}}^{\text{Vit}} \quad (4)$$

onde $k_{\text{obs}}^{\text{Vit}}$ é a tangente do gráfico de primeira ordem para o consumo de vitamina em ausência de licopeno.

O quociente entre as duas pendentes (eq. 5) é proporcional a fração de moléculas de vitaminas protegidas por Lic, f_{vit} , como mostra a eq. 6

$$k_{\text{obs}}^{\text{Vit}} / k_{\text{obs}}^{\text{Vit,L}} = 1 + k_q^{\text{L}} \tau_{\Delta} [\text{L}] \quad (5)$$

$$f_{\text{vit}} = 1 - \frac{k_{\text{obs}}^{\text{Vit,L}}}{k_{\text{obs}}^{\text{Vit}}} \quad (6)$$

Por outro lado, a fração de moléculas de $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ que são desativadas por Lic, f_{Δ} é dada pela eq. 7:

$$f_{\Delta} = \frac{\tau_{\Delta,0} k_t [\text{L}]}{1 + \tau_{\Delta,0} k_t [\text{L}]} \quad (7)$$

Considerando um valor para $\tau_{\Delta} \approx 7 \mu\text{s}$ para micro-emulsões do tipo óleo em água (31), e valores de constantes bimoleculares de desativação de $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ por licopeno, de $k_t \approx 2 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ para meios micelares (32) ou $k_t \approx 2 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ em meios homogêneos, os valores obtidos para a fração de $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ desativado por licopeno f_{Δ} , variam entre 0,03 e 0,12, respectivamente, sendo consideravelmente menor do que a da fração de moléculas de vitamina protegidas $f_{\text{Vit}} \approx 0,46$ neste estudo. Este resultado indica claramente a presença de um mecanismo de proteção adicional ao da desativação de $\text{O}_2(^1\Delta_g)$.

Os espectros de absorção em água de Rf e de licopeno encapsulado, apresentados na **Figura 5**, mostram que o licopeno absorve a maior parte da radiação emitida pela lâmpada, exercendo um efeito de filtro sobre a Rf. A partir das áreas dos espectros de Rf e de licopeno na região de emissão da lâmpada calcula-se que a Rf absorva somente 10% da radiação.

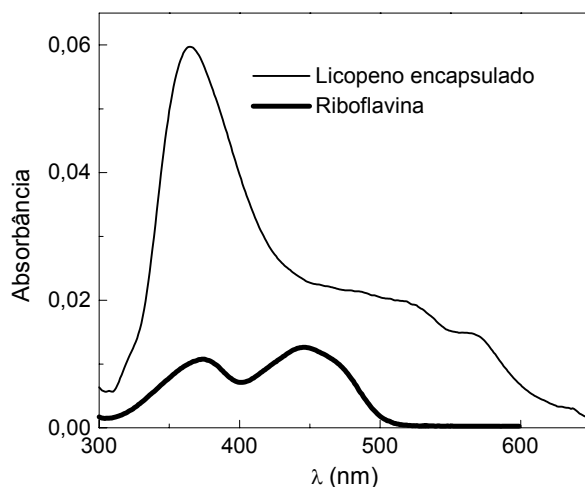


Figura 5. Espectros de absorção em água de riboflavina e licopeno.

Em conclusão, o licopeno encapsulado pode atuar como um eficiente antioxidante em amostras de leite, uma vez que os resultados indicam que o encapsulamento não altera a sua capacidade de desativação de $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ e retarda os processos oxidativos que envolvem radicais livres e, além disso, atua combinadamente como filtro prevenindo a formação de $^3\text{Rf}^*$.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) Bradley, R.L. Effect of light on alteration of nutritional value and flavor of milk: A review. *J. Food Prot.* **1980**, *43*, 314-320.
- (2) Whited, L. J.; Hammond, B.H.; Chapman, K. W.; Boor, K. J. Vitamin A degradation and lightoxidized flavor defects in milk. *J. Dairy Sci.* **2002**, *85*, 351-354.
- (3) Dimick, P. S. Effect of fluorescent light on amino acid composition of serum proteins from homogenized milk. *J. Dairy Sci.* **1976**, *59*, 305-308.
- (4) Aurand, L. W.; Boone, N.H.; Giddings, G. G. Superoxide and singlet oxygen in milk lipid peroxidation. *J. Dairy Sci.* **1977**, *60*, 363-369.
- (5) Allen, C.; Parks, O. W. Photodegradation of riboflavin in milks exposed to fluorescent light. *J. Dairy Sci.* **1979**, *62*, 1377-1379.
- (6) White, C. H.; Bulthaus, M. Light activated flavor in milk. *J. Dairy Sci.* **1982**, *65*, 489-494.
- (7) Fellmann, R. L.; Dimick, P. S.; Hollender, R. Photooxidative stability of vitamin A fortified 2% low fat milk and skim milk. *J. Food Prot.* **1991**, *54*, 113-116.
- (8) Renken, S. A.; Warthesen, J. J. Vitamin D stability in milk. *J. Food Sci.* **1993**, *58*, 552-556.
- (9) Lee, K. H.; Jung, M.Y.; Kim, S. Y. Effects of ascorbic acid on the light-induced riboflavin degradation and color changes in milk. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46*, 407-410.
- (10) Mortensen, G.; Bertelsen, G.; Mortensen, B. K.; Stapelfeldt, H. Light-induced changes in packaged cheeses – a review. *Internat. Dairy J.* **2004**, *14*, 85-102.
- (11) Lee, S. H; Min, D. B. Effects, quenching mechanism, and kinetics of carotenoids in chlorophyll-sensitized photooxidation of soybean oil. *J. Agric. Food Chem.* **1990**, *38*, 1630-1634.
- (12) Borle, F.; Sieber, R.; Bosset, J. O. Photo-oxidation and photoprotection of foods, with particular reference to dairy products - an update of a review article (1993-2000). *Sciences des Aliments.* **2001**, *21*, 571-590.
- (13) Dunkley, W. L; Franklin, J. D; Pangborn, R. M. Effects of fluorescent light on flavor, ascorbic acid, and riboflavin in milk. *Food Technol.* **1962**, *16*, 112-118.
- (14) Maniere, F. Y.; Dimick, P. S. Effect of fluorescent light on repartition of riboflavin in homogenized milk. *J. Dairy Sci.* **1976**, *59*, 2019-2023.
- (15) Foote, C. S. Photosensitized Oxygenation and the Role of Singlet Oxygen. *ACC. Chem. Res.* **1968**, *1*, 104-110.
- (16) Jensen, S. K.; Nielsen, K. N. Tocopherols, retinol, β -carotene and fatty acids in fat globule core in cows' milk. *J. Dairy Res.* **1996**, *63*, 565-574.

- (17) Wilkinson, F. Rate constants for the decay and reactions of the lowest electronically excited singlet state of molecular oxygen in solution. An expanded and revised compilation. *J. Phys. Chem. Ref. Data*. **1995**, 24, 663-1021.
- (18) Di Mascio, P.; Kaiser, S.; Sies H. Lycopene as the most efficient biological carotenoid singlet oxygen quencher. *Arch. Biochem. Biophys.* **1989**, 274, 532-538.
- (19) Nunes, I.; Mercadante, A. Z. Obtenção de cristais de licopeno a partir de descarte de tomate. *Ciênc. Tecnol. Alim.* **2004**, 24, 440-447.
- (20) Wagner, L. A.; Warthesen, J. J. Stability of spray-dried encapsulated carrot carotenes. *J. Food Sci.* **1995**, 60, 1048-1053.
- (21) Davies, B.H. Carotenoids. In *Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments*; T.W. Goodwin (Ed.); Academic Press: London, 1976, pp. 38-165.
- (22) Indyk, H.; Woollard, D. C. The determination of vitamin D in fortified milk powders and infant formulas by HPLC. *J. Micronutr. Anal.* **1985**, 1, 121-141.
- (23) Meyers, R. D. *Color Accurated Digital Photography of Artworks*. Better Light, Inc, 2000.
- (24) Sharma, S. K.; Le Maguer, M. Kinetics of lycopene degradation in tomato pulp solids under different processing and storage conditions. *Food Res. Int.* **1996**, 29, 309-315.
- (25) Matiloli, G.; Rodriguez-Amaya, D. B. Licopeno Encapsulado em Goma Arábica e Maltodextrina: Estudo da Estabilidade. *Braz. J. Food Technol.* **2002**, 5, 197-203.
- (26) Minguez-Mosquera, M.I.; Jaren-Galan, M. Kinetics of the decolouring of carotenoid pigments. *J. Sci. Food Agric.* **1995**, 67, 153-61.
- (27) Chen, B. H.; Tang, Y. C. Processing and stability of carotenoid powder from carrot pulp waste. *J. Agric. Food. Chem.* **1998**, 46, 2312-2318.
- (28) Salo-Vänänen, P.; Ollilainen, V.; Mattila, P.; Lehtikainen, K.; Salmela-Mölsä, E.; Piironen, V. Simultaneous HPLC Analysis of fat-soluble vitamins in selected animal products after small-scale extraction. *Food. Chem.* **2000**, 7, 535-543.
- (29) Wilkinson, F.; Brummer, J. G. Rate constants for the decay and reactions of the lowest electronically excited singlet state of molecular oxygen in solution. *J. Phys. Chem. Ref. Data*. **1981**, 10, 809-999.
- (30) Wilkinson, F. Rate Constants for the decay and reactions of the lowest electronically excited singlet state of molecular oxygen in solution. An expanded and revised compilation. *J. Phys. Chem. Ref. Data*. **1995**, 24, 663-1021.

- (31) Martínez, L.A.; Martínez, C.G.; Klopotek, B. B.; Lang, J.; Neuner, A.; Braun, A.N.; Oliveros, E. nonradiative and radiative deactivation of singlet molecular oxygen ($O_2(^1\Delta_g)$) in micellar media and microemulsions. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **2000**, *58*, 94-107.
- (32) Edge, R.; Mcgarvey, D.J.; Truscott, T.G. The carotenoids as anti-oxidant- a review. *J. Photochem. Photobiol. B. Biol.* **1997**, *41*, 189-200.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à FAPESP e a DSM Nutritional Products (Suíça) pelo suporte financeiro.

CONCLUSÃO GERAL

Utilizando planejamento experimental fatorial foi desenvolvido e otimizado um método simples para extração de licopeno a partir de tomate, consistindo de uma etapa prévia para retirada de água com 4 extrações de 30 minutos cada com 30 mL de etanol comercial, seguido por 4 extrações com acetato de etila de 120 minutos cada e relação massa/volume de 1:0,7. Aplicando este método, o teor médio de carotenóides obtido foi de $59,2 \pm 21,8 \mu\text{g/g}$ para 6 lotes de descarte de tomate recolhido no CEASA de Campinas.

Através da técnica de cristalização, foi obtido padrão de licopeno na forma de cristais e com alto teor de pureza (98%), apresentando apenas traços de isômeros geométricos, semelhante ao padrão sintético fornecido pela DSM Nutritional Products da Suíça.

Na separação por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), a coluna C_{30} mostrou maior eficiência que a coluna C_{18} tanto na separação dos isômeros 5-*cis*-, 9-*cis*-, 13-*cis*- e all-*trans*-licopeno quanto de luteína e zeaxantina, sendo seu uso recomendado para análise qualitativa pelo fato destes isômeros serem os mais encontrados em alimentos processados, apesar do elevado custo no Brasil do éter *tert*-metil butílico, utilizado na fase móvel, e da própria coluna. Entretanto, caso o objetivo seja acompanhar mudanças quantitativas é necessário acompanhar cuidadosamente a ocorrência de problemas com a repetibilidade de áreas e eluição de compostos minoritários.

A degradação foto-sensitizada de licopeno, em todos os sistemas solventes avaliados, seguiu um modelo cinético de primeira ordem, com a formação de quatro tipos de produtos: apo-carotenóides, compostos adicionados de uma ou duas moléculas com 32 unidades de massa, epóxidos e isômeros geométricos de licopeno. O consumo de licopeno foi menor com o aumento da concentração inicial do pigmento. Na presença de BHT os produtos de degradação foram os mesmos, embora o k_{obs} tenha sido menor em relação ao sistema sem antioxidante. Sob atmosfera de nitrogênio houve uma menor degradação do all-*trans*-licopeno e apenas traços do apo-6'-licopenal e dos epóxidos foram detectados enquanto na ausência de sensibilizador houve acréscimo apenas do 13-*cis*-licopeno.

A eficiência do encapsulamento por spray-dryer variou de 94 a 96% e o rendimento médio foi de 51%. Através de análise por CLAE foi verificado que a pureza do licopeno (% área do all-*trans*-licopeno) foi de 96,4% antes e de 98,1% após o encapsulamento, devido à redução das porcentagens de área do 9-*cis*-, 13-*cis* e 1,2-epóxi-licopeno.

Ocorreu formação de complexo licopeno- β -CD apenas quando utilizada razão molar de 1:4, entretanto, cerca de 50% do licopeno não foi complexado, e o pó obtido por liofilização apresentou coloração rósea. O licopeno apresentou pureza de 97,7% antes e de 91,3% após

obtenção do complexo na forma de pó por liofilização, devido ao aumento de 5,2% na área do pico correspondente aos isômeros 13-*cis* + 15-*cis*-licopeno.

O licopeno encapsulado atuou como um eficiente antioxidante em amostras de leite, uma vez que os resultados indicaram que o encapsulamento não altera a sua capacidade de desativação de oxigênio singlete e retarda os processos oxidativos que envolvem radicais livres e, além disso, atua combinadamente como filtro prevenindo a formação de riboflavina no estado triplete excitado.