

UFRRJ

INSTITUTO DE TECNOLOGIA

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E
TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**

DISSERTAÇÃO

**PREPARO DE PADRÕES ANALÍTICOS, ESTUDO DE
ESTABILIDADE E PARÂMETROS DE VALIDAÇÃO PARA
ENSAIO DE CAROTENÓIDES POR CROMATOLOGRAFIA
LÍQUIDA**

Sidney Pacheco

2009



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS**

**PREPARO DE PADRÕES ANALÍTICOS, ESTUDO DE ESTABILIDADE
E PARÂMETROS DE VALIDAÇÃO PARA ENSAIO DE
CAROTENÓIDES POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA**

SIDNEY PACHECO

Sob a orientação do Professor
Ronoel Luiz de Oliveira Godoy

e Co-orientação do Professor
João Oiano Neto

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, área de concentração em Ciência dos Alimentos.

seropédica, RJ

Março de 2009

612.399

P116p

Pacheco, Sidney, 1972-

T

Preparo de padrões analíticos, estudo de estabilidade e parâmetros de validação para ensaio de carotenóides por cromatografia líquida / Sidney Pacheco – 2009.

115 f. : il.

Orientador: Ronoel Luiz de oliveira Godoy.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Bibliografia: f. 104-106

1. Vitamina A na nutrição humana – Avaliação - Teses. 2. Carotenóides - Teses. 3. Cromatografia líquida - Teses. I. Godoy, Ronoel Luiz de Oliveira, 1951-. II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. III. Título.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DOS
ALIMENTOS**

SIDNEY PACHECO

Dissertação submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestre em Ciências** no programa de pós-graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos área de concentração em Ciência dos Alimentos.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 12 de março de 2009

Ronoel Luiz de Oliveira Godoy (D.Sc.) Embrapa-CTAA
(Orientador)

João Oiano Neto (D.Sc.) Embrapa-CTAA
(Co-orientador)

Armando Ubirajara Oliveira Sabaa Srur (D.Sc.) UFRRJ

Keila dos Santos Cople Lima (D.Sc.) IME

Antonio Luís dos Santos Lima (D.Sc.) IME
(Suplente)

DEDICATÓRIA

Ao "seu" Lutércio e à "dona" Zoé, que tenho o privilégio de ter como pais.

Ao "seu" Sady (in memoriam) e à "dona" Maria, queridos padrinhos.

E ao meu Pitéu: Melina.

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Ronoel Luiz de Oliveira Godoy pela orientação, apoio, incentivo e amizade.

Ao Dr. João Oiano Neto pela co-orientação e incansáveis correções.

Ao programa de pós-graduação da Embrapa pela viabilização deste trabalho.

Ao programa de pós-graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

A então chefe da Embrapa Agroindústria de Alimentos Dr. Amauri Rosenthal e Dra. Regina Isabel Nogueira.

Ao então presidente do CTI da Embrapa Agroindústria de Alimentos Dr. Rogério Germani.

À atual chefe da Embrapa Agroindústria de Alimentos Dra. Regina Celi Araujo Lago.

À Dra. Angela Aparecida Lemos Furtado.

Aos programas HarvestPlus e AgroSalud.

A todos os colegas de turma.

Às colegas de trabalho Manuela e Jeane pelo suporte e incentivo.

À Adriana pelo apoio e compreensão.

E com carinho especial, agradeço aos que tanto colaboraram com esse trabalho, seja me ouvindo ou dividindo a bancada e as tarefas: Rafael, Suellen, Ana Cristina, Fernanda, Daniel, Pedro, Raquel, Rachel, Sâmara, Robson, Gianna, Josi, Vanessa, Cyntia, Aline, Marcelle, Cristina, Filipe, Fernando, Juliana, Patricia e Karla.

RESUMO

PACHECO, Sidney. **Preparo de padrões analíticos, estudo de estabilidade e parâmetros de validação para ensaio de carotenóides por cromatografia líquida**. Seropédica: UFRRJ, 2009. 106p. (Dissertação, Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Ciência dos Alimentos).

A vitamina A é essencial aos seres humanos sendo ingerida através de alimentos de origem animal como carnes e ovos, ou obtida através da conversão dos carotenóides pró-vitamínicos presentes principalmente em frutas e vegetais. A deficiência de vitamina A (retinol) é o maior problema nutricional em populações subdesenvolvidas e suas conseqüências são a xerofthalmia, cegueira e morte prematura, especialmente em crianças. A vitamina A é também importante na manutenção do crescimento, na eficiência reprodutiva, na manutenção dos tecidos epiteliais e na prevenção de queratinização, além de apresentar uma importante ação na resposta imunológica. A ingestão deficiente de vitamina A, especialmente em populações de países subdesenvolvidos ou populações pobres de países desenvolvidos, é o maior problema nutricional da atualidade. Cerca de 4,4 milhões de crianças em idade pré-escolar apresentam danos à visão devido à deficiência desta vitamina e anualmente 250 a 500 mil dessas crianças acabam cegas. Os carotenóides são a fonte de retinol mais importante em populações onde a ingestão dessa vitamina é baixa. Desta maneira, a sua correta análise, tanto qualitativa quanto quantitativa, em alimentos é muito importante. Neste trabalho, desenvolveu-se uma metodologia cromatográfica específica para a separação dos carotenóides e seus isômeros. Este estudo propôs a otimização da separação cromatográfica dos principais carotenóides encontrados em alimentos e a posterior validação do método implantado. Para isto foi necessário o isolamento dos padrões desses carotenóides em quantidades e purezas suficientes. Uma avaliação da estabilidade dos padrões preparados foi realizada para determinar as melhores condições de armazenamento, assim como o período máximo de armazenamento. O isolamento dos padrões deu-se por cromatografia aberta com posterior quantificação espectrofotométrica e determinação da pureza através de CLAE. Avaliaram-se diversas matrizes naturais como fonte dos carotenóides de interesse e foram descobertas novas matrizes com características melhores que as usuais para o isolamento desses padrões, produzindo padrões com purezas cromatográficas superiores à exigência mínima de 90%. O estudo de estabilidade mostrou que é possível o armazenamento dos padrões, em misturas multi padrões prontas para o uso para calibração cromatográfica externa, por mais de 370 dias. A validação mostrou que o método implantado e otimizado é seletivo, sensível, linear e a faixa de trabalho para a análise dos carotenóides em amostras de alimentos foi estabelecida em 0,5 a 8,0 μ g/mL para cada carotenóide.

Palavras-chave: carotenóides; vitamina A; validação de métodos analíticos

ABSTRACT

PACHECO, Sidney. **Preparation of analytical standards, study of stability and validation parameters of the test of carotenoids by liquid chromatography.** Seropédica: UFRRJ, 2009. 106p. (Dissertation, Master in Science and Technology of Food, Liquid Chromatography).

Vitamin A is essential to the human beings, being ingested through animal sources as meat and eggs, or gotten for the conversion of pro vitamin carotenoids found mainly in fruits and vegetables. The vitamin A deficiency is the major nutritional problem that affects underdeveloped populations. As a consequence of this deficiency, xerophthalmia, blindness and premature death can occur, mainly in children. Vitamin A is also important for growth maintenance, for reproductive efficiency, maintenance of the epithelial tissues and keratinization prevention, beyond presenting an important role into the immunological response. Nowadays, the deficient intake of vitamin A is the major nutritional problem found into developing countries populations or poor population of the developed countries. Around of 4.4 million of children, within preschool age, are presenting vision damages due to the deficiency of this vitamin, every year about 250-500 thousand children become blind. Carotenoids are the most important source of retinol for populations in which the consumption of this vitamin is low. For this reason, quantitative and qualitative analysis of carotenoids in foods is very important. In this work, a specific chromatographic methodology was developed to separate the carotenoids and their isomers. Chromatographic separation of the main food carotenoids was optimized and validated. The chromatographic standards were isolated with appropriated amount and purity, and their stability was evaluated to determine the better conditions of storage, as well as shelf life. The isolation of all chromatographic standards was carried out with open column, quantification was done using spectrophotometry and purity evaluation was measured by HPLC. Many matrices have been evaluated as a source of standards, some new sources were found and showed better characteristics, as purity higher than 90%, if compared with those, frequently, used for this purpose. The study of stability showed that mixtures of carotenoids used as external standard for calibration can be storage more than 370 days. Validation study showed that this methodology of analysis has good selectivity, sensitivity and linearity in a concentration range from 0.5 to 8.0 µg/mL for each carotenoid.

Key words: carotenoids; vitamin A; validation of analytical methods

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	01
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	03
2.1	Os carotenóides na natureza.....	03
2.1.1	Carotenóides em animais.....	03
2.1.2	Microorganismos produtores de carotenóides.....	05
2.1.3	Funções dos carotenóides em plantas.....	05
2.2	Um breve histórico do estudo dos carotenóides.....	06
2.3	Biossíntese dos carotenóides.....	08
2.3.1	Biossíntese do Isopentenilpirofosfato (IPP).....	09
2.3.2	Biossíntese do fitoeno.....	11
2.3.3	Biossíntese do licopeno a partir do fitoeno.....	12
2.3.4	Ciclização do licopeno.....	13
2.4	Engenharia genética.....	16
2.4.1	Transgenia do arroz.....	16
2.4.2	Transgenia do tomate.....	17
2.4.3	Transgenia da canola.....	17
2.4.4	Transgenia do tabaco.....	17
2.5	Relação entre a cor e a estrutura química dos carotenóides.....	17
2.6	Diferenças de absorção dos carotenóides em diferentes solventes.....	21
2.7	A oxidação dos carotenóides em substâncias de aroma.....	22
2.8	Vitamina A.....	23
2.8.1	Conversão de carotenóides em Vitamina A.....	24
2.8.2	Retinol equivalente (RE) e os fatores de conversão.....	25
2.9	Importância dos carotenóides na dieta humana.....	27
2.9.1	Relação com processos inflamatórios.....	27
2.9.2	Atividade antioxidante e pró-oxidante.....	27
2.9.3	Reação com espécies radicalares.....	28
2.9.4	Efeitos dos carotenóides em processos celulares.....	29
2.9.5	Carotenóides e o câncer.....	30
2.9.6	Carotenóides e doenças cardiovasculares.....	31
2.9.7	Carotenóides como pigmentos maculares.....	31
2.9.8	Relação da zeaxantina e luteína com a catarata.....	35
2.10	Métodos de análise dos carotenóides.....	35
2.10.1	Extração.....	35
2.10.2	Saponificação.....	36
2.10.3	Análise cromatográfica.....	36

3	MATERIAL E MÉTODOS.....	38
3.1	Material.....	38
3.1.1	Material de consumo e equipamentos.....	38
3.1.2	Cromatógrafos e condições cromatográficas.....	40
3.1.3	Ampolas e sistema de selagem.....	41
3.2	Métodos.....	42
3.2.1	Extração dos carotenóides.....	43
3.2.2	Saponificação dos extratos de carotenóides.....	43
3.2.3	Concentração e análise de carotenóides totais e perfil cromatográfico.....	43
3.2.4	Preparação dos padrões cromatográficos.....	45
3.2.4.1	Preparação da coluna cromatográfica aberta.....	45
3.2.4.2	Aplicação e eluição na coluna aberta.....	46
3.2.4.3	Verificação da pureza cromatográfica do padrão isolado.....	46
3.2.4.4	Quantificação espectrofotométrica do padrão isolado.....	47
3.2.4.5	Armazenamento em ampolas dos padrões isolados.....	48
3.2.4.6	Preparação de ampolas multi-padrão.....	49
3.2.5	Otimização do método analítico e construção da curva de calibração.....	49
3.2.6	Teste de estabilidade dos padrões cromatográficos.....	50
3.2.7	Parâmetros de validação da metodologia analítica.....	52
3.2.7.1	Especificidade e seletividade.....	52
3.2.7.2	Linearidade.....	54
3.2.7.3	Faixa de trabalho e faixa linear de trabalho.....	54
3.2.7.4	Sensibilidade.....	55
3.2.7.5	Limite de detecção.....	55
3.2.7.6	Limite de quantificação.....	55
3.2.7.7	Exatidão.....	55
3.2.7.8	Precisão.....	56
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	57
4.1	Preparação dos padrões cromatográficos.....	57
4.1.1	Preparação dos padrões de α -caroteno e β -caroteno.....	57
4.1.2	Preparação dos padrões de luteína e violaxantina.....	59
4.1.3	Preparação dos padrões de β -criptoxantina e licopeno.....	63
4.1.4	Preparação do padrão de zeaxantina.....	65
4.1.5	Preparação do padrão de zeinoxantina.....	67
4.2	Otimização do método cromatográfico de análise de carotenóides.....	68
4.3	Verificação do perfil cromatográfico dos carotenóides isolados.....	72
4.4	Estudo de estabilidade dos padrões cromatográficos.....	73
4.4.1	Análise dos carotenóides do grupo 1.....	73
4.4.2	Análise dos carotenóides do grupo 2.....	76
4.4.3	Análise dos carotenóides do grupo 3.....	78
4.4.4	Análise dos carotenóides do grupo 4.....	80
4.4.5	Análise dos carotenóides do grupo 5.....	82
4.4.6	Análise da solução de acenafteno.....	85
4.5	Avaliação dos parâmetros de validação.....	86
4.5.1	Avaliação da seletividade.....	86

4.5.2	Curva de calibração e avaliação da linearidade.....	89
4.5.3	Faixa de trabalho e faixa linear de trabalho.....	98
4.5.4	Sensibilidade.....	98
4.5.5	Limite de detecção.....	99
4.5.6	Limite de quantificação.....	99
4.5.7	Exatidão.....	100
4.5.8	Precisão.....	101
5	CONCLUSÕES.....	102
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	103
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	104

1 INTRODUÇÃO

Devido a sua característica de dar coloração aos tecidos animais e vegetais onde estão presentes, os carotenóides são alvo de cientistas e de curiosos há muito tempo.

São os metabólitos secundários que aparecem na natureza em maior quantidade e a investigação de suas funções e propriedades já somam mais de 150 anos de estudos.

A própria invenção da cromatografia líquida mistura-se a história dos carotenóides, pois foi desenvolvida para separar os componentes coloridos das plantas.

Muitas outras propriedades dos carotenóides foram descobertas, como: sua capacidade de serem convertidos em vitamina A, suas propriedades antioxidantes, sua ação na melhora da acuidade visual e sua ação contra doenças degenerativas, como câncer, catarata e cegueira.

Frente a tantas promissoras propriedades, os carotenóides acabaram por agregar propriedades funcionais aos alimentos que os contém e o interesse em seu estudo vem crescendo e envolvendo áreas diversas do conhecimento.

A demanda por metodologias analíticas cada vez mais rápidas, precisas e sensíveis cresceu na mesma velocidade e a cromatografia líquida é hoje a metodologia mais utilizada na análise dos carotenóides.

Por ser uma classe de substâncias que tem em comum a característica da instabilidade química, de reagir facilmente com espécies radicalares e oxidantes, além de sofrer isomerizações geométricas, a probabilidade de ocorrer erros analíticos gerando dados subestimados é compreensível.

Outro problema na determinação analítica dos carotenóides reside na dificuldade de obtenção de padrões analíticos em quantidades apreciáveis, com pureza adequada, alta estabilidade química e que possam ser transportados e armazenados sem que haja alterações.

Devido à diversidade das matrizes estudadas e à própria diversidade de substâncias classificadas como carotenóides, as metodologias de extração e análise descritas são numerosas. Dessa maneira torna-se fundamental o processo de validação das metodologias analíticas empregadas com esse propósito.

Os principais objetivos deste trabalho foram:

- ✓ Isolar os principais carotenóides encontrados nos alimentos para posterior uso como padrões analíticos, com purezas compatíveis com a técnica de cromatografia líquida. E em quantidades suficientes.
- ✓ Avaliar a estabilidade química dos padrões preparados e sua viabilidade no decorrer do tempo em função da presença de oxigênio, do efeito da luz e da temperatura.
- ✓ Otimizar o método cromatográfico.
- ✓ Avaliar os principais parâmetros de validação do método otimizado (seletividade, linearidade, faixa de trabalho, sensibilidade, limites de detecção e quantificação, exatidão e precisão).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Os carotenóides na natureza

Os carotenóides são uma grande família de substâncias, onde mais de 600 já foram identificados e suas estruturas químicas elucidadas. Muitas cores que vemos na natureza são resultado da presença e combinação destes carotenóides (KRINSKY & JOHNSON, 2005).

São responsáveis pelas cores de muitas frutas vermelhas (tomates, melancia, goiaba e caqui), amarelas (manga, banana e melão) e alaranjadas (abóbora, mamão, laranja e tangerina). Mas também estão presentes em outros tecidos vegetais como flores, raízes (cenoura), sementes (milho, urucum) e, de maneira não tão evidente, nas folhas verdes, em especial nas de coloração escura (espinafre, couve e brócolis) (Figura 1).

Nas folhas, os carotenóides estão sempre associados à clorofila e ao contrário do que ocorre nas frutas, sua composição qualitativa praticamente não varia. Neste caso, a coloração característica da presença dos carotenóides está encoberta pela alta concentração de clorofila. Ao ocorrer degradação da clorofila, as folhas em geral tornam-se amarelas, revelando então a presença dos carotenóides.

No amadurecimento das frutas observa-se uma intensa produção de carotenóides, que juntamente com a degradação da clorofila, produz a cor característica do fruto maduro. Na natureza, tal mudança de cor tem função atrativa para agentes dispersores de sementes, como pássaros e mamíferos.

O processamento dos alimentos, em especial os tratamentos térmicos, em geral não é suficiente para promover a degradação total dos carotenóides. Ao contrário, em alguns casos melhoram a sua biodisponibilidade devido ao amolecimento dos tecidos e rompimento das células (SCOTT & ELDRIDGE, 2004; KRINSKY & JOHNSON, 2005).

2.1.1 Carotenóides em animais

Apesar dos carotenóides não serem produzidos pelos animais, estes estão largamente distribuídos em seus tecidos. As cores apresentam funções importantes de sinalização e comunicação entre indivíduos de muitas espécies de animais. Muitos peixes, alguns usados como ornamentais, apresentam colorações características na ocasião da corte nupcial, coloração esta devida à presença de carotenóides (DAVIES *et al.*, 2008).

Nas aves a cor também apresenta funções vitais: sinalização, corte nupcial, defesa, mimetismo, entre outras.

Todos os animais que se utilizam de carotenóides para produzir padrões de coloração devem obtê-los em sua dieta. Isto se torna determinante quando se deseja a criação comercial ou a manutenção em cativeiro de tais animais, pois terão sua dieta restrita e a não ingestão de carotenóides provocará alterações em seus padrões de coloração.

Atualmente, o mercado de corantes naturais, para a incorporação de carotenóides em rações para a alimentação de peixes (trutas e salmões) e aves (canários etc.), movimentam milhões de dólares todos os anos.

A coloração característica do salmão, truta, camarão, flamingo, guará e muitos outros animais é função da presença de carotenóides, em especial da astaxantina e da cantaxantina (Figura 1).



Figura 1 – Distribuição dos carotenóides na natureza: **a**-vegetais e **b**-animais.

2.1.2 Microorganismos produtores de carotenóides

Os fungos, bactérias, algas e microalgas são grandes produtores de carotenóides (Figura 2). Algumas alterações da cor de alimentos são resultado do crescimento de microorganismos produtores de carotenóides, como o amarelamento característico de carnes de peixe promovido pelo crescimento de bactérias, especialmente da espécie *Flavobacterium*.

As algas e microalgas são os principais produtores dos carotenóides presentes em animais, na cadeia alimentar elas são o alimento de crustáceos e peixes, que em seguida transferem os carotenóides absorvidos para aves e peixes maiores.

Grandes quantidades dos carotenóides astaxantina e cantaxantina são produzidas através do cultivo de microalgas, para utilização como corantes de rações para peixes e aves.

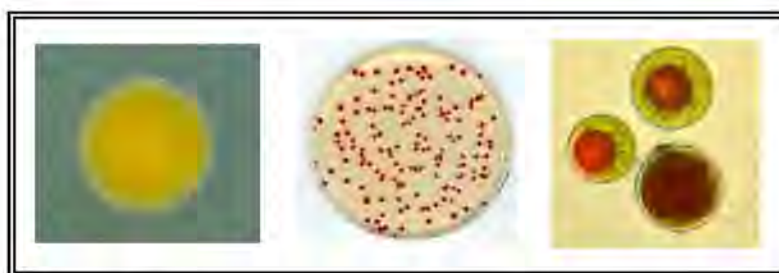


Figura 2 – Microorganismos produtores de carotenóides.

2.1.3 Funções dos carotenóides em plantas

A presença constante dos carotenóides em tecidos vegetais que contém clorofila indica que sua função vai muito além da simples pigmentação. Os carotenóides nas folhas encontram-se dentro dos cloroplastos, juntamente com a clorofila. Essa descoberta norteou estudos a fim de se verificar a relação dos carotenóides com a fotossíntese.

Estudos demonstraram que os carotenóides são capazes de absorver luz e transferir a energia coletada à clorofila, deste modo foi provado a sua relação direta com a fotossíntese (FRANK *et al.*, 2004).

Mas as funções dos carotenóides ainda vão além, pois se sabe hoje que sua principal função é a fotoproteção de centros de reação em células e tecidos. Experimento com uma variedade mutante da bactéria *Rhodospseudomonas sphaeroides*, obtida de modo a não conter carotenóides, mostrou que a bactéria tornou-se fotossensível e a mutação letal (FRANK *et al.*, 2004).

2.2 Um breve histórico do estudo dos carotenóides

Devido a sua coloração intensa, os carotenóides vem despertando interesse de cientistas a muito tempo. Data de 1831 o primeiro isolamento dessas substâncias a partir de cenouras feito por Heinrich Wilhelm Ferdinand Wackenroder (1798-1854). Derivando do inglês “carrot” (cenoura), Wackenroder batizou as substâncias de carotenos (FRANK *et al.*, 2004).

Berzelius, em 1837, ao isolar carotenóides de folhas batizou os compostos amarelos obtidos de xantofilas, do grego *xanthos* para amarelo e *phyll* para folhas.

Em 1860, Fremy fez a primeira revisão do conhecimento sobre os carotenóides até então e em 1902 já havia 800 publicações sobre o assunto.

Dentre as descobertas da época, destaca-se a descoberta que um dos dois pigmentos majoritários encontrados em folhas era idêntico a um dos pigmentos da cenoura. Xantofilas foram descobertas em algas e uma xantofila (luteína) foi descoberta na gema do ovo, demonstrando não tratar-se de pigmentos exclusivos de folhas.

Em 1938, Strain usou o termo carotenos para os hidrocarbonetos e xantofilas para os carotenos oxigenados. No entanto, Borget sugeriu que as xantofilas fossem denominadas carotenóis, devido a sua estrutura química e por não serem exclusivas de folhas. Esta nomenclatura chegou a ser usada, a luteína era denominada luteol, violaxantina violaxantol, zeaxantina zeaxantol e assim por diante. Mas a nomenclatura proposta por Strain voltou a ser aceita sendo usada até hoje.

A primeira separação e purificação dos carotenóides é creditada ao botânico russo Tswett (1906, 1911), que inventou a cromatografia líquida para a separação das substâncias coloridas das folhas. Tswett ainda inseriu a concepção de uma família formada por muitos compostos, os carotenóides (carotenos e xantofilas).

A Figura 3 é uma reprodução da separação feita por Strain em 1938, semelhante à realizada por Tswett, onde é mostrada a separação dos carotenóides em dois sistemas cromatográficos.

Em 1934, já se sabia que a molécula do β -caroteno, assim como as de outros carotenóides, era simétrica. Sabia-se também que a molécula da vitamina A era quimicamente igual à metade de uma molécula de β -caroteno.

Em 1948, aproximadamente 80 carotenóides já eram conhecidos e a metade deles já estava com suas estruturas estabelecidas, em 1950 chegou-se à síntese do β -caroteno (FRANK *et al.*, 2004).

A nomenclatura oficial dos carotenóides foi estabelecida em 1974 pela *International Union of Pure and Applied Chemistry* e pela *International Union of Biochemistry* (IUPAC, 1974).

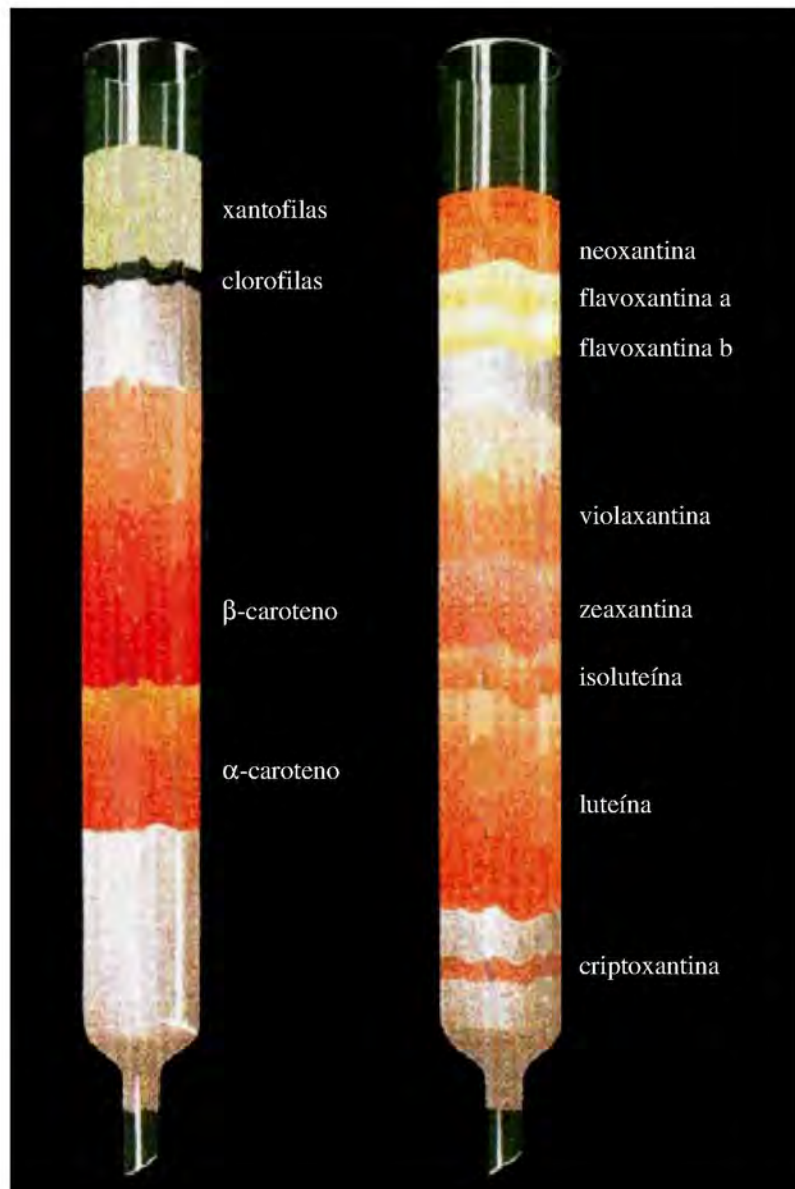


Figura 3 – Separações de carotenóides em colunas cromatográficas feitas por Strain em 1938 (FRANK *et al.*, 2004).

2.3 Biossíntese dos carotenóides

A biossíntese dos carotenóides é uma via da rota dos isoprenóides, muitos dos genes e enzimas das etapas iniciais são comuns à biossíntese de todos os derivados isoprenóides e são bem conhecidos. A primeira etapa da rota exclusiva dos carotenóides é a condensação de duas moléculas C₂₀, geranylgeranylpirofosfato (GGPP), para formar o fitoeno, que é o primeiro precursor dos carotenóides com 40 átomos de carbono. Quatro insaturações geram então o fitoflueno, ζ-caroteno, neurosporeno e o licopeno, todos carotenóides acíclicos.

O licopeno pode então sofrer ciclização em um ou ambos os lados da cadeia para formar os carotenóides monocíclicos (γ-caroteno e δ-caroteno) e dicíclicos (α-caroteno e β-caroteno), respectivamente. As etapas de oxigenação que levam à formação dos álcoois, cetonas e epóxidos, além de outras modificações estruturais como esterificação, por exemplo, são os passos finais da biossíntese.

Essa aparente complexidade da rota de biossíntese dos carotenóides resulta em um grande número de estruturas e aproximadamente 700 carotenóides já foram descritos e isolados de fontes naturais (HORNERO-MENDEZ & BRITTON, 2002).

Os carotenóides são sintetizados por bactérias, algas, fungos e plantas superiores. Com exceção de alguns poucos carotenóides produzidos por bactérias, que apresentam 30, 45 ou 50 átomos de carbono, os carotenóides com 40 carbonos representam a maioria das estruturas conhecidas, sendo os carotenóides produzidos por bactérias os que apresentam maior diversidade (SANDMANN, 2000).

2.3.1 Biossíntese do Isopentenilpirofosfato (IPP)

O isopentenilpirofosfato (IPP) é a unidade primária construtora na síntese dos terpenóides, e duas rotas de síntese foram descobertas para sua formação: uma característica de fungos e outra de bactérias e plantas.

Os carotenóides de fungos são derivados da via do mevalonato, na qual o ácido mevalônico (ácido 3-metil-3,5-diidroxi-pentanóico) é sintetizado via condensação de três moléculas de acetil-SCoA (GEISSMAN & CROUT, 1969). Os passos subsequentes envolvem etapas de fosforilação gerando ácido mevalônico pirofosfato, que sofre descarboxilação para gerar IPP (Figura 4).

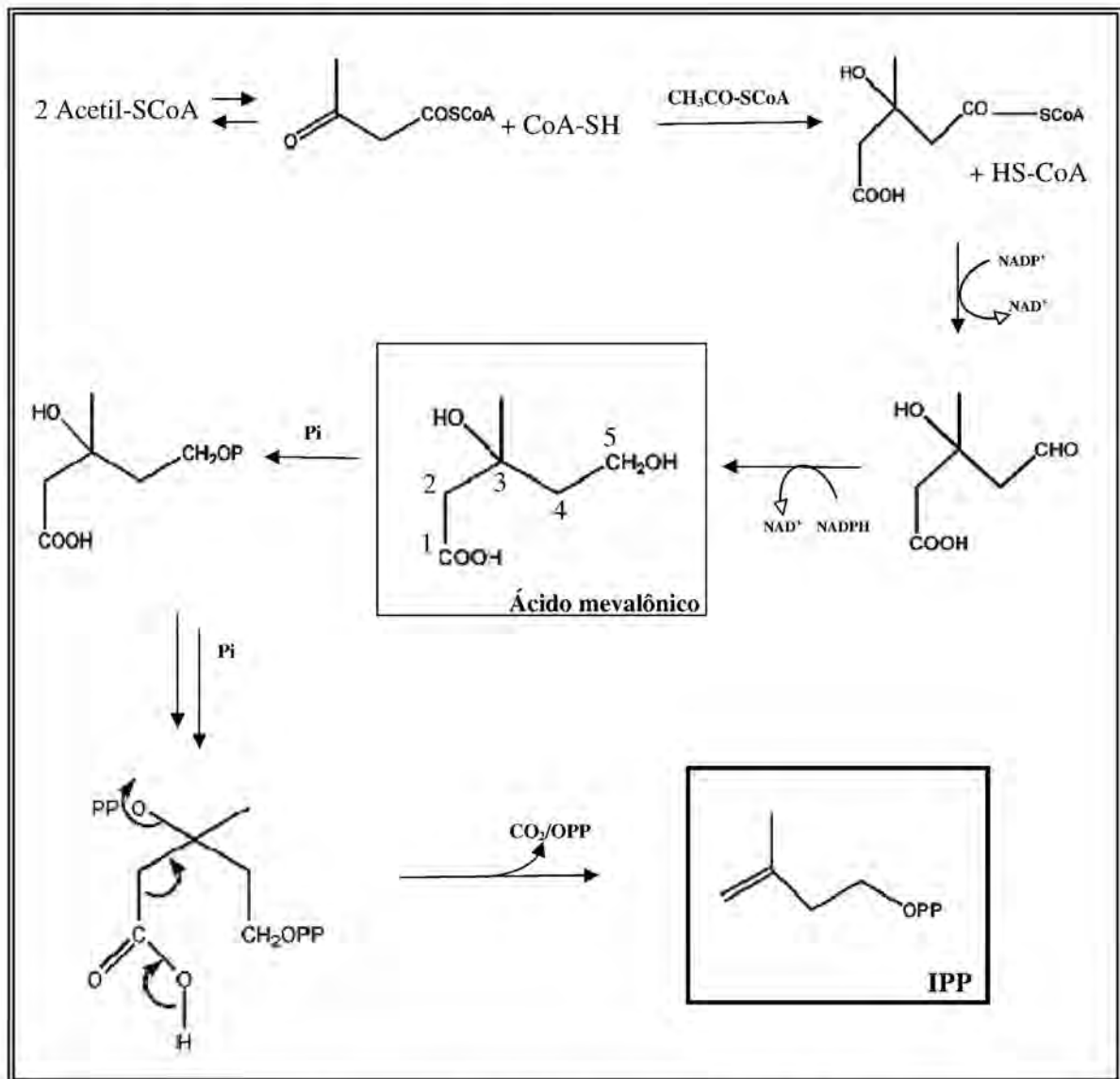


Figura 4 – Rota do mevalonato de formação do isopentenilpirofosfato

Em bactérias e nos plastídios de plantas a formação do IPP se dá via rota alternativa conhecida como 1-desoxyxilulose-5-fosfato, que é o primeiro intermediário, ou de 2-C-metil-D-eritritol-4-fosfato que é o primeiro produto. Nem todas as etapas das reações foram ainda

elucidadas, sabe-se que inicialmente uma unidade C₂ de piruvato é condensada com gliceraldeído-Pi, então o produto é convertido a 2-C-metil-D-eritritol.

As etapas seguintes envolvem a formação do 4-difosfocitidil-2-C-metileritritol e uma fosforilação na posição C₂ por ATP. Na seqüência 2-C-metil-D-eritritol-2,4-ciclodifosfato é formado, esse produto é então transformado a IPP e dimetilalilpirofosfato (DMAPP) de maneira ainda não totalmente elucidada. Evidências ainda sugerem que a rota sintética difere em procariontes e eucariontes (Figura 5).

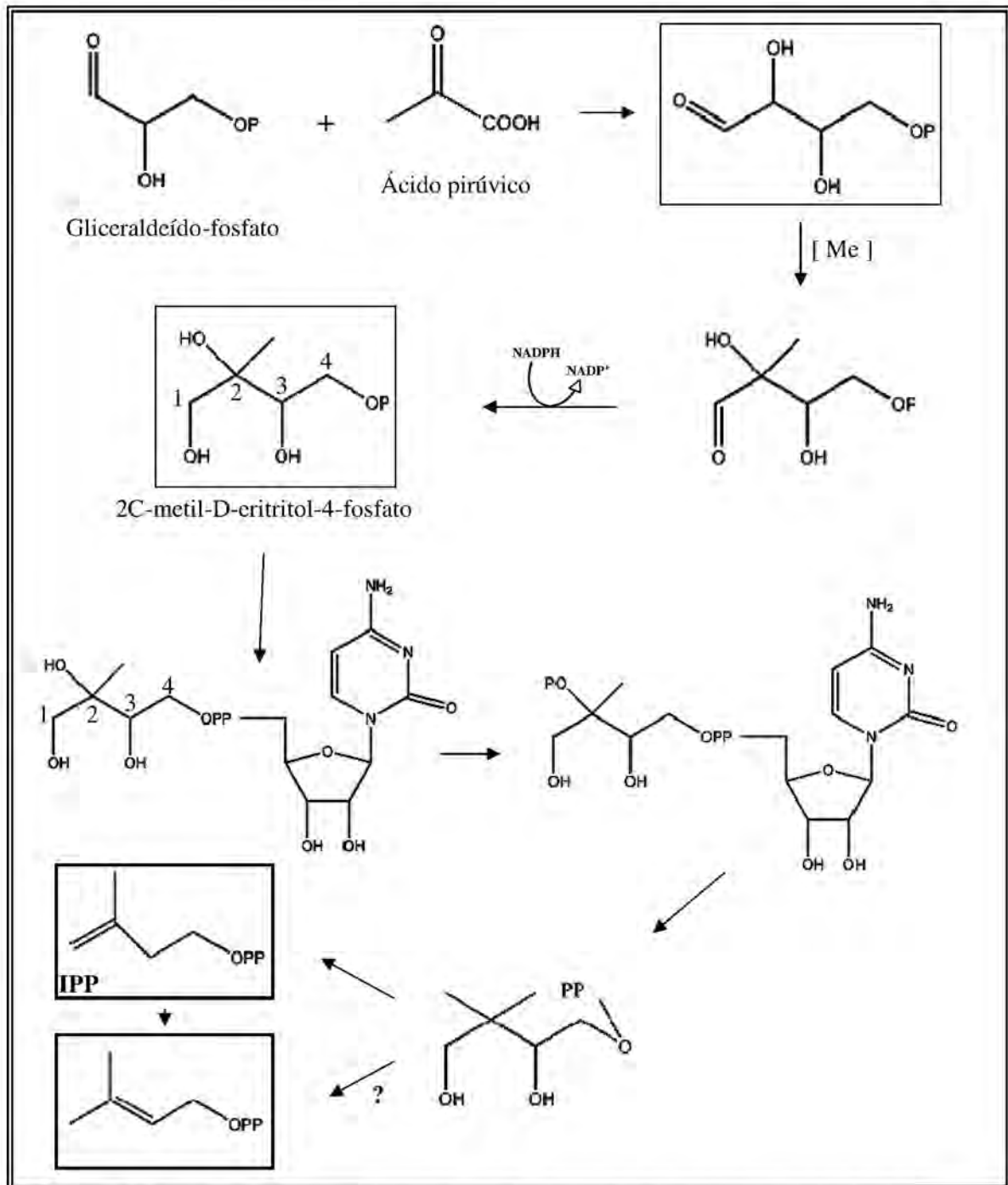


Figura 5 – Rota mevalonato independente de formação do isopentenilpirofosfato

Uma vez que a enzima IPP isomerase está presente nos plastídios de plantas e que sua atividade é o passo limitante na síntese de carotenóides em etioplastos, pode-se concluir que IPP é o produto majoritário ou único da via 1-desoxyxilulose-5-fosfato. Desta maneira, o DMAPP deve se originar através da isomerização do IPP, mesmo assim a formação paralela de DMAPP ainda não pôde ser excluída (DUVOLD *et al.*, 1997; SANDMANN, 2000).

2.3.2 Biossíntese do fitoeno

O farnesil pirofosfato (FPP) é formado através da ação de diferentes enzimas prenil transferases, após a isomerização do IPP para DMAPP, mediante sucessivas condensações C₁-C₄ com unidades IPP. A ligação carbono é formada entre o carbono 4 do IPP e o carbono 1 do substrato alílico. No caso da síntese do GGPP as reações catalisadas pelas prenil transferases seguem o mecanismo de acoplamento cabeça-cauda tanto para plantas superiores quanto para bactérias.

A síntese do fitoeno é o primeiro passo da biossíntese dos carotenóides C₄₀. Esta é realizada através de uma condensação cabeça-cabeça de duas moléculas de GGPP formando um intermediário ciclopropilcarbonil entre os carbonos C₁ da primeira unidade GGPP e os carbonos C₂ e C₃ da segunda molécula de GGPP, gerando um intermediário pré-fitoeno pirofosfato. Em plantas o *todo-trans* e o *15-cis*-fitoeno são então formados pela eliminação do grupo pirofosfato (desfosforilação) e abstração estereoespecífica de um hidrogênio (H⁺) (Figura 6) (SANDMANN, 2000).

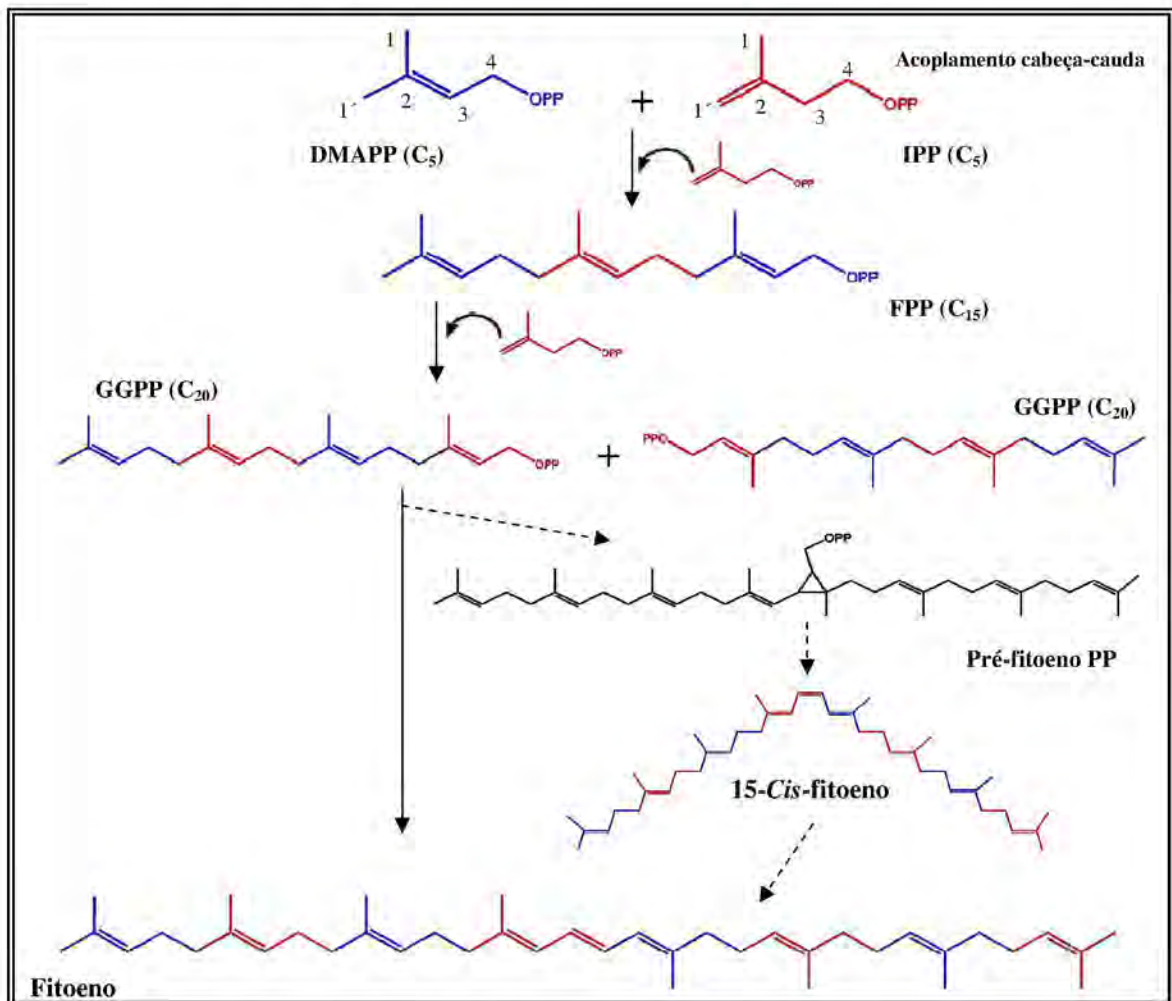


Figura 6 – Acoplamentos cabeça-cauda de unidades DMAPP e IPP para formação do fitoeno.

2.3.3 Biossíntese do licopeno a partir do fitoeno

O licopeno é o carotenóide de plantas com o maior número de ligações duplas conjugadas (11 conjugações). Sendo sintetizado a partir do fitoeno através de quatro etapas de desidrogenação.

A enzima Fitoeno desidrogenase encontrada em bactérias (exceto cianobactérias) e fungos catalisa o processo de quatro etapas de desidrogenação do fitoeno em licopeno. A enzima fitoeno desnaturase de cianobactérias, algas e plantas promove a reação de desidrogenação em duas etapas, com formação de diferentes isômeros de ζ -caroteno como subprodutos (Figura 7) (SANDMANN, 2000).

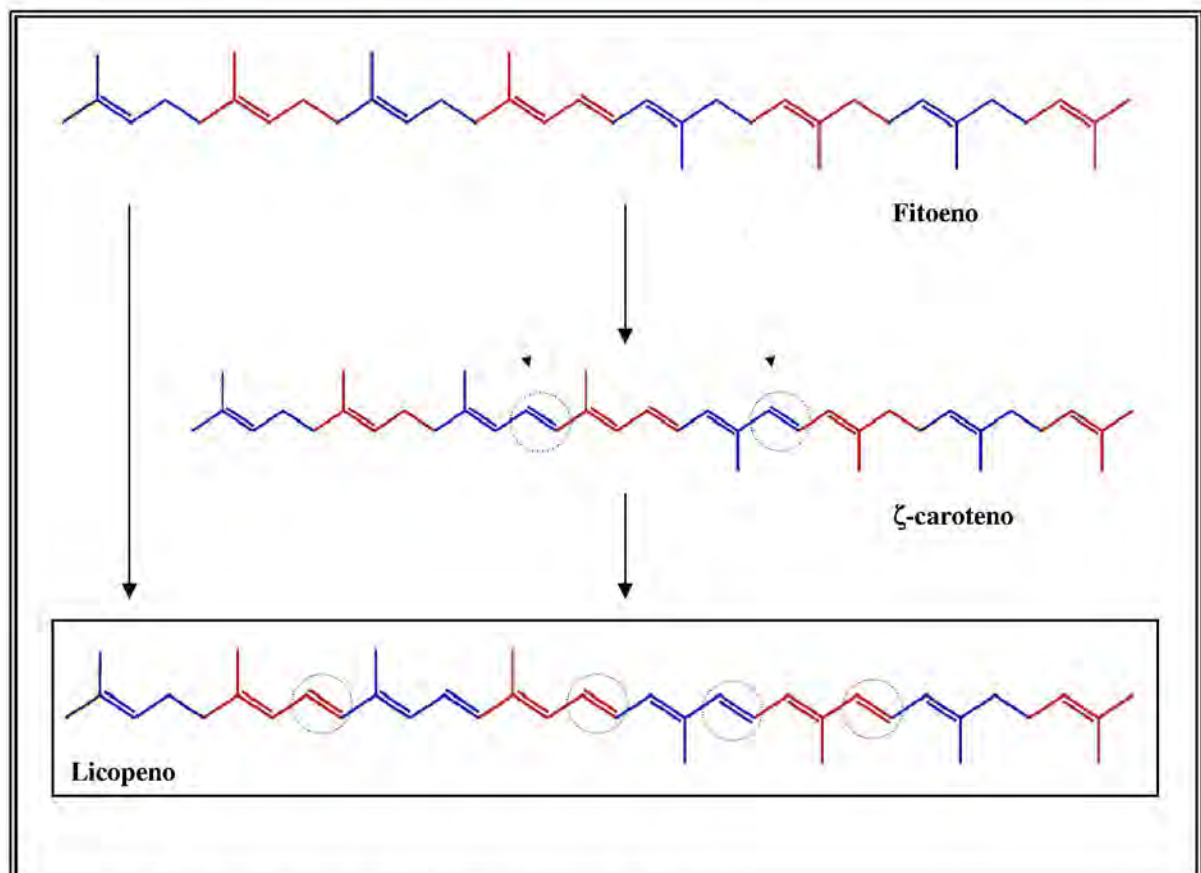


Figura 7 – Formação do licopeno a partir do fitoeno

2.3.4 Ciclização do licopeno

O licopeno é o precursor dos carotenóides cíclicos, o mecanismo da ciclização que forma o anel β envolve a adição estereoespecífica de um hidrogênio no carbono C_2 . Tem-se por pressuposto que a reação de ciclização dos carotenóides é similar, em princípio, ao processo de ciclização na biossíntese de outros compostos isoprenóides.

A enzima ciclase envolve o final da cadeia alquílica colocando-a em conformação adequada, dessa maneira ocorre um ataque eletrofilico em C_2 , com conseqüente formação da ligação C_1-C_6 para formação do anel.

Esse mecanismo leva à formação de um carbocátion em C_5 estabilizado pela enzima. Com a eliminação de hidrogênio ocorre a formação do anel. Se a saída do H^+ for de C_6 tem-se a formação do anel β -ionona, se for de C_4 o anel ϵ , e se a saída for do grupo metil C_{18} , tem-se a formação do anel γ (Figura 8).

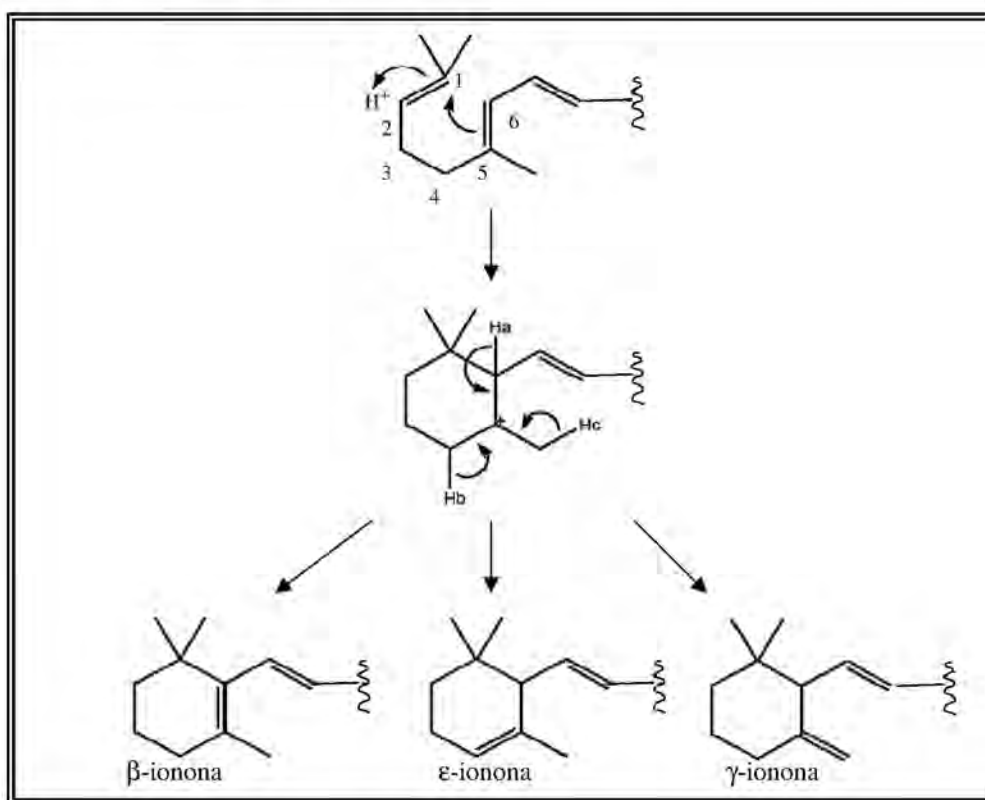


Figura 8 – Formação dos anéis iononas.

Devido ao fato da reação parecer um simples rearranjo que não envolve nenhuma modificação no nível de oxidação, o envolvimento do NAD^+ ou NADH na reação não seria esperado. No entanto, estudos de Schnurr *et al.* (1996) com a enzima ciclase mostraram que, quando o licopeno é fornecido como substrato, NADPH é requerimento absoluto para a ciclização.

Essa descoberta gerou dúvidas sobre o mecanismo de ciclização, ou ao menos mostrou que este é mais complexo do que se pensava, sendo necessária nova investigação para a elucidação desta etapa fundamental da biossíntese dos carotenóides (HORNERO-MENDEZ & BRITTON, 2002).

O estudo *in vitro* conduzido por Hornero-Mendez e Britton (2002) provou que não há transferência de hidrogênio do NADPH durante a ciclização, no entanto este participa indiretamente da reação. O mecanismo permanece desconhecido, mas o modelo previamente proposto, onde a reação é iniciada pela adição de um hidrogênio da água do meio ao C_2 do precursor licopeno, foi confirmado.

A formação dos anéis β e ϵ -ionona ocorre sob controle de genes diferentes, conseqüentemente, o β -caroteno é formado pela ação de uma única enzima, a licopeno β -ciclase. No caso da formação do α -caroteno, duas enzimas diferentes, licopeno β -ciclase e licopeno ϵ -ciclase, estão envolvidas. Análises genéticas complementares demonstraram que a enzima ϵ -ciclase forma apenas um anel enquanto a β -ciclase introduz dois anéis ao licopeno, ou um anel adicional ao δ -caroteno que é o equivalente à molécula de licopeno com um anel ϵ (Figura 9) (SANDMANN, 2000).

As xantofilas, que são os carotenóides oxigenados, são enzimaticamente formadas pela oxidação do α -caroteno e β -caroteno. Grupos típicos são hidroxilas na posição C_3 dos anéis β e ϵ -ionona, epóxido nas posições $\text{C}_{5,6}$ do anel β -ionona e o grupo cetona na posição C_4 (Figura 9) (SANDMANN, 2000).

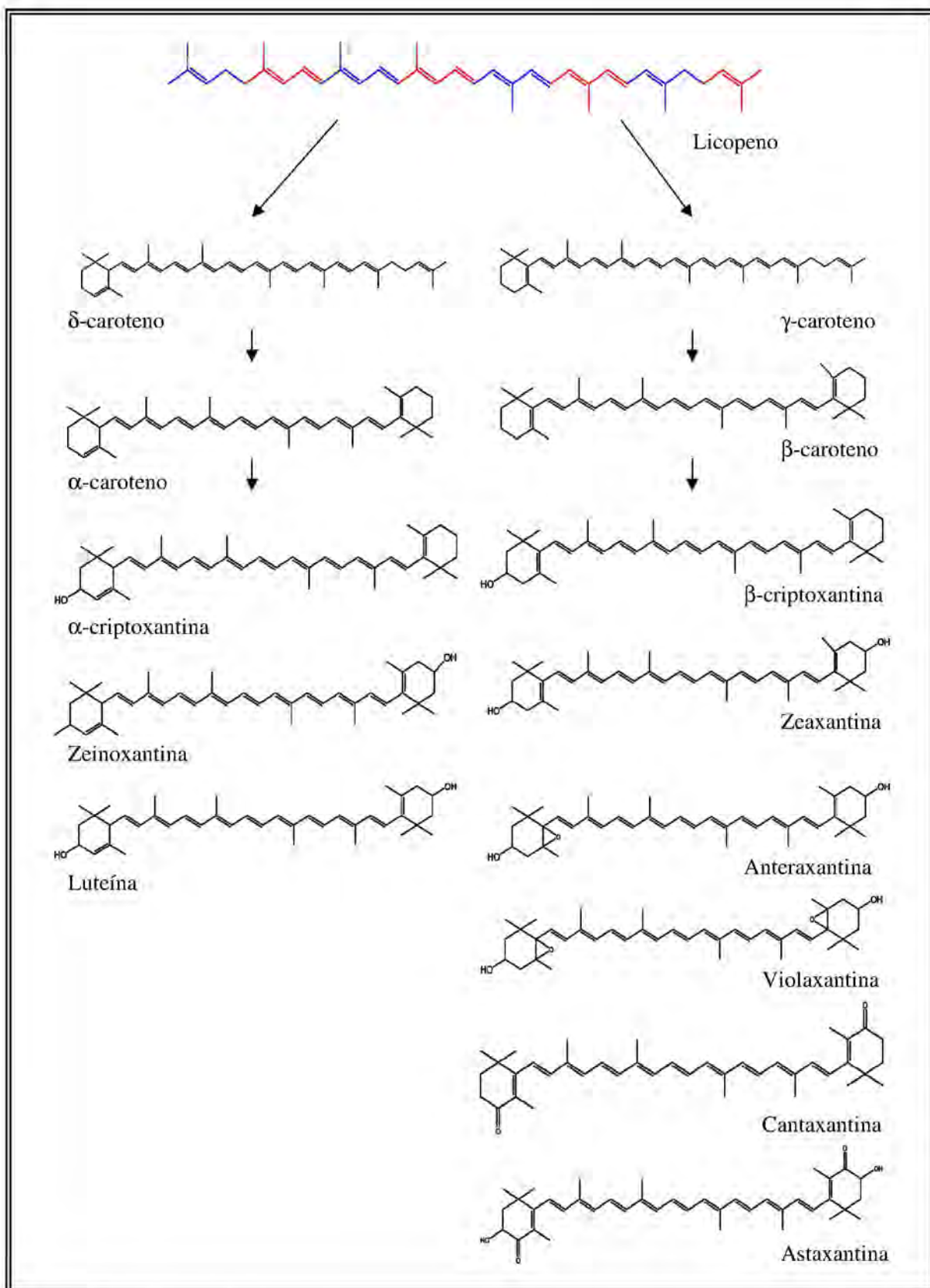


Figura 9 – Carotenóides mais comumente encontrados na natureza

2.4 Engenharia genética

As enzimas envolvidas na síntese dos carotenóides são associadas à membrana celular ou estão integradas a ela. Apresentam grande sensibilidade aos detergentes, usados para a sua solubilização durante métodos de extração, e são pouco abundantes. Todos esses fatores fazem do isolamento e purificação destas enzimas uma tarefa muito difícil, esta é a razão pela qual somente poucas foram purificadas de tecidos de plantas. No entanto, muitas dessas enzimas vêm sendo produzidas através da expressão genética, especialmente em bactérias (SANDMANN, 2000).

A disponibilidade de um grande número de genes carotenogênicos propicia modificar e fazer engenharia com a biossíntese de carotenóides em microorganismos e plantas.

E. coli é uma bactéria muito conveniente para a produção de carotenóides, pois os genes de bactérias, fungos e plantas superiores podem ser funcionalmente expressos nesta espécie. Destacam-se a produção de licopeno em *Saccharomyces cerevisiae* e β -caroteno, licopeno e astaxantina em *Candida utilis* (SANDMANN, 2000).

Em muitas cultivares de plantas o conteúdo de carotenóides também foi manipulado pela inserção de genes carotenogênicos. A engenharia metabólica de carotenóides de plantas é hoje um fato e os primeiros resultados são uma promessa para a erradicação da avitaminose A e para a produção biotecnológica de carotenóides.

No entanto, resultados inesperados também mostram a necessidade de mais pesquisas para o completo entendimento metabólico das plantas. Dentre os trabalhos realizados nesta área, destacam-se os com arroz, tomate, canola e tabaco (GIULIANO *et al.*, 2000).

2.4.1 Transgenia do arroz

O endosperma do arroz maduro é capaz de sintetizar GGPP, mas não contém carotenóides. Através de engenharia dos grãos de arroz, com o propósito de produzir licopeno, introduziu-se os genes que expressam a síntese das enzimas fitoeno e licopeno sintase, além da fitoeno desnaturase. Apesar de não ter-se inserido genes que expressam as enzimas ciclases, surpreendentemente as sementes de arroz, ao invés de conter apenas licopeno continham β -caroteno, zeaxantina e luteína (Figura 10) (HIRSCHBERG, 2001).

Com o arroz transgênico, que se tornou amarelo e foi batizado de “Golden Rice”, conseguiu-se mais de 200 μ g de β -caroteno por 100g de arroz. É um valor ainda baixo para atingir a dose diária recomendada de 3-6mg/dia (IOM, 2000), porém pode ter um grande impacto em populações do sudeste asiático onde a avitaminose A é um problema sério e o consumo de arroz é alto (GIULIANO *et al.*, 2000).



Figura 10 – Arroz comum (esquerda) e o transgênico “Golden Rice” (direita) (GOLDEN RICE PROJECT HOME PAGE, 2009).

2.4.2 Transgenia do tomate

Algumas variedades de tomate apresentam teores de licopeno maiores que 10mg/100g do produto fresco, mesmo assim muitos pesquisadores vêm tentando aumentar os teores de licopeno através de engenharia genética.

Novamente resultados inesperados foram obtidos, pois com a transgenia os tomates não acumularam mais licopeno e ainda acabaram produzindo menos carotenóides totais. A boa notícia é que mais de 50% desses carotenóides totais foram de β -caroteno (mais de 5mg/100g), o que fez com que os frutos se tornassem alaranjados. A modificação é dominante e transmitida para os descendentes. Nesses níveis a dose diária recomendada de β -caroteno pode ser atingida com apenas 120g de tomate (GIULIANO *et al.*, 2000).

2.4.3 Transgenia da canola

As sementes e óleo de canola (*Brassica napus*) contêm teores muito baixos de β -caroteno. A manipulação genética propiciou um aumento de 300 vezes neste teor, elevando os níveis de β -caroteno a níveis similares aos encontrados em óleo de palma (dendê) (GIULIANO *et al.*, 2000).

2.4.4 Transgenia do tabaco

A astaxantina, um cetocarotenóide encontrado em bactéria marinha, é muito utilizado como aditivo alimentar para peixes. Foi produzida por transgenia em flores de tabaco, que acumularam astaxantina e cantaxantina sem alteração do conteúdo de carotenóides das folhas da planta (GIULIANO *et al.*, 2000).

2.5 Relação entre a cor e a estrutura química dos carotenóides

O espectro na região UV/Vis dos carotenóides é de grande importância para o analista, pois fornece valiosas informações sobre a estrutura da substância. O espectro característico dos carotenóides é consequência da presença da longa cadeia com duplas ligações conjugadas.

Moléculas orgânicas podem absorver luz nas regiões do ultravioleta e do visível, como consequência desta absorção de luz ocorrem transições eletrônicas que levam a molécula a um estado de maior energia (estado excitado).

No caso dos carotenóides essas transições eletrônicas são dos orbitais π (ligantes) aos orbitais π^* (antiligantes). Devido à deslocalização dos elétrons através das conjugações do cromóforo, o estado excitado da molécula é relativamente de menor energia, de modo que em geral a absorção da luz visível é suficiente para promover as transições.

Quanto maior o número de duplas ligações conjugadas (DLC), menos energia é necessária para promover a excitação e consequentemente o valor do comprimento de onda máximo de absorção é maior. Ao menos 7 DLC são necessárias ao carotenóide para que haja percepção de cor pelo olho humano. O ζ -caroteno, com 7 DLC, tem coloração amarelo pálido, enquanto o fitoeno e fitoflueno com 3 e 5 DLC, respectivamente, são incolores (MELÉNDEZ-MARTÍNEZ *et al.*, 2006).

Carotenóides acíclicos têm absorção máxima em comprimentos de onda maiores que os carotenóides cíclicos com o mesmo número de DLC. O que pode ser explicado pelo fato de quando a conjugação se estende ao anel ocorrem tensões de anel, pois as DLC dos anéis não são coplanares com o restante da cadeia.

A absorção máxima do licopeno (11 DLC sem anéis) em acetona ocorre em 474nm, enquanto a do β -caroteno (11 DLC com 2 endocíclicas) ocorre em 454nm (Figura 11). Este fato também explica a absorção máxima da cantaxantina ser similar à do licopeno, apesar da cantaxantina apresentar 13 DLC, 4 ligações são endocíclicas.

A presença de anéis sem DLC produz pouco efeito sobre o espectro do composto, prova disto é a grande similaridade entre os espectros da auraxantina (cíclico) e do ζ -caroteno (acíclico), ambos com 7 DLC exocíclicas.

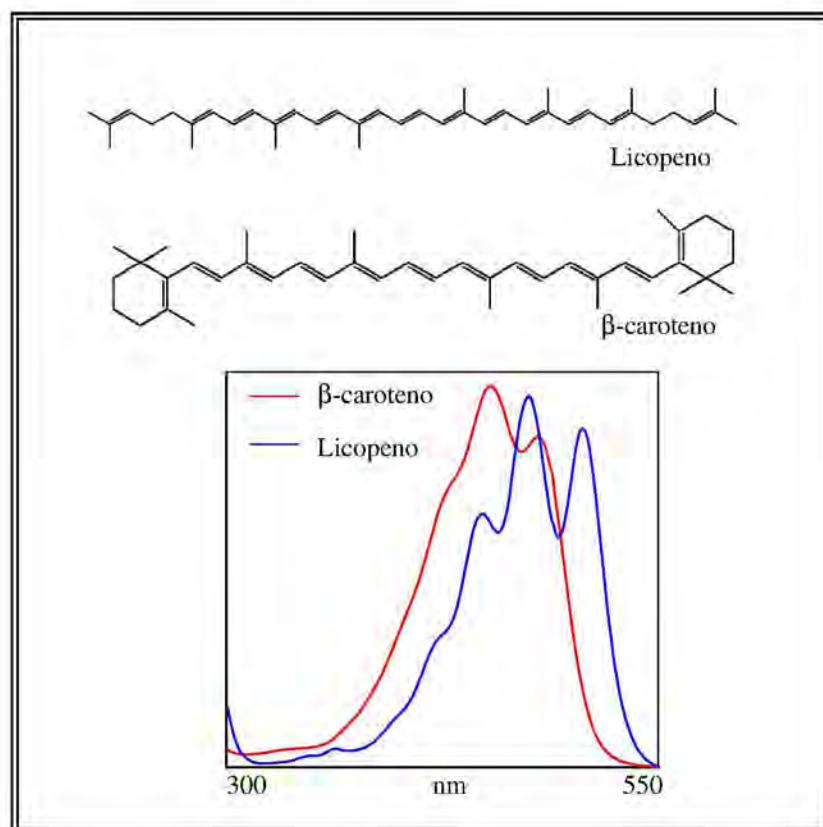


Figura 11 – Comparação dos espectros de licopeno e β -caroteno.

A presença de grupos hidroxila, que não estejam em conjugação com as DLC do restante da cadeia, não afeta o cromóforo da molécula, dessa maneira os espectros da β -criptoxantina e da zeaxantina são praticamente idênticos ao do β -caroteno (Figura 12) (SOLOMONS, 1992; MELÉNDEZ-MARTÍNEZ *et al.*, 2006).

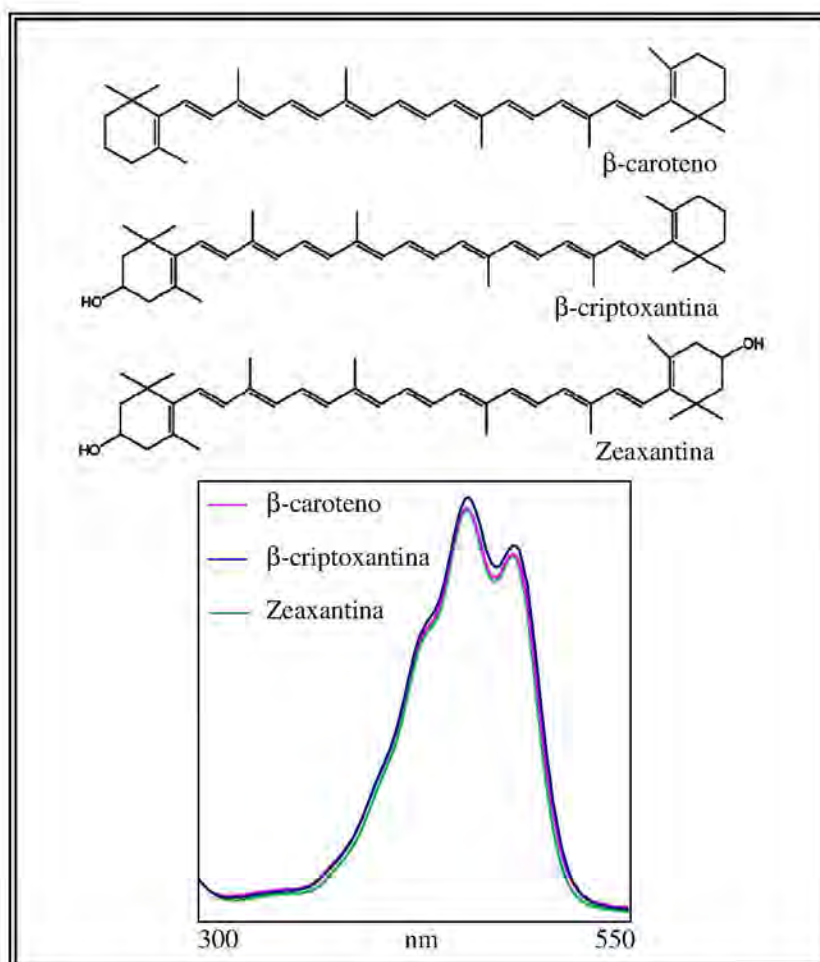


Figura 12 – Comparação dos espectros de β -caroteno, β -criptoxantina e Zeaxantina.

A análise dos espectros pode ainda fornecer informações qualitativas sobre a isomerização *cis* dos carotenóides. No caso destes isômeros o espectro característico apresenta uma nova banda de absorção próxima ou na região do ultravioleta (Figura 13), quanto mais na região central da molécula está a isomerização *cis*, mais intenso é este pico (RODRIGUEZ-AMAYA, 2001).

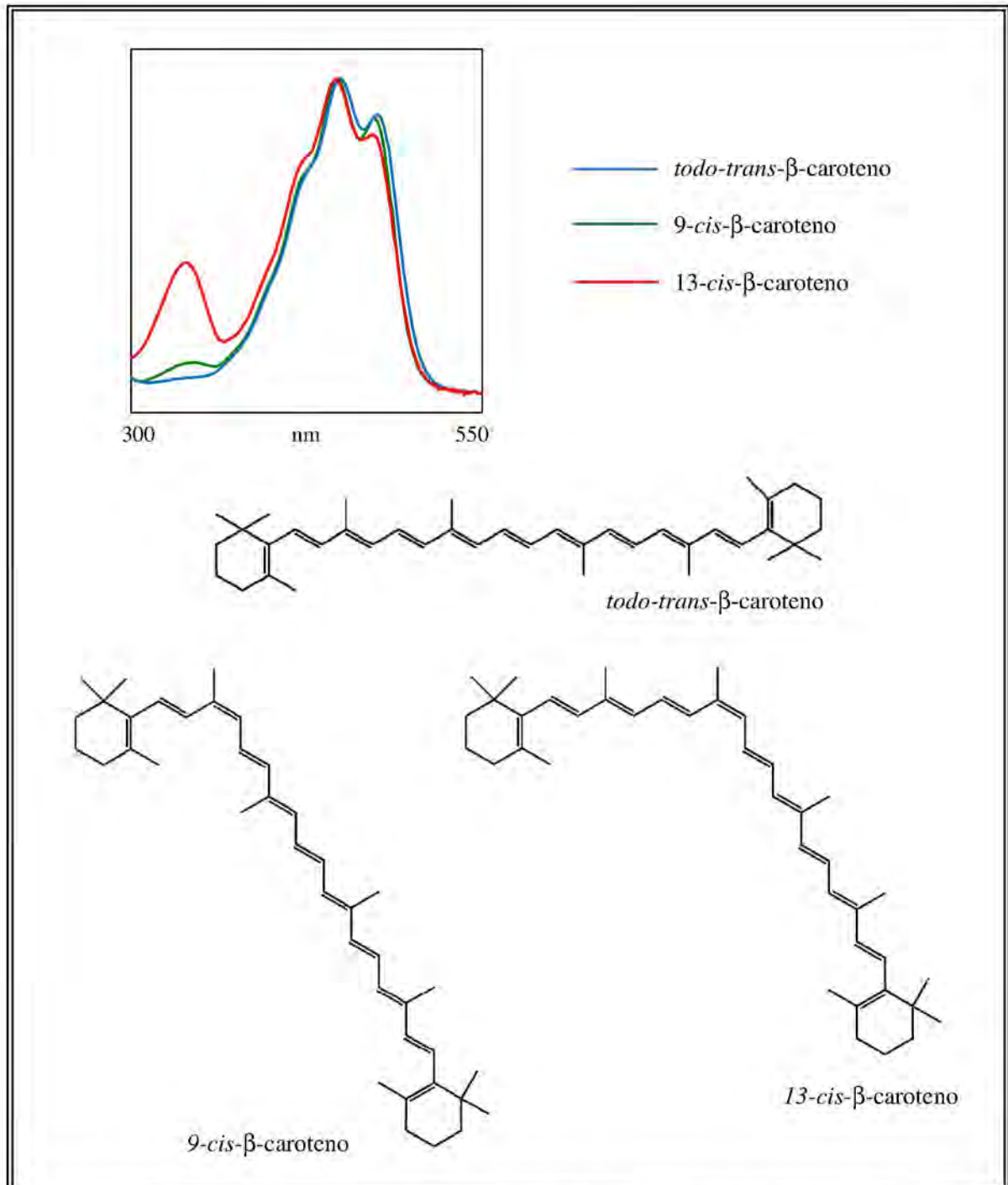


Figura 13 – Estruturas e comparação dos espectros de isômeros *cis-trans* de β -caroteno.

2.6 Diferenças de absorção dos carotenóides em diferentes solventes

Um grande desafio na análise dos carotenóides é o fato de existir uma grande variação de polaridade entre as substâncias, existindo desde carotenóides apolares até polares. Em um experimento de avaliação da variação espectral dos principais carotenóides em hexano e metanol, Lun-Yi Zang *et al.* (1997), demonstraram que a luteína apresenta espectro de absorção praticamente invariável nestes dois solventes, enquanto zeaxantina, licopeno e β -caroteno apresentam espectros diferentes em função do solvente utilizado.

Soluções de zeaxantina em hexano apresentaram valores de absorvância não lineares com o aumento da concentração, sugerindo baixa solubilidade que pode levar a zeaxantina a formar pequenos cristais ou polímeros nas concentrações mais altas.

A solubilidade da luteína em hexano é de 20mg/L, enquanto que em metanol é de 200mg/L. Para zeaxantina, a solubilidade em hexano é de apenas 2mg/L. É interessante verificar esta grande diferença de solubilidade entre estes dois carotenóides que diferem entre si apenas pela posição de uma dupla ligação.

Os autores demonstraram ainda que o β -caroteno é capaz de formar microcristais em concentrações de 3mg/L em metanol, valor este bem abaixo da solubilidade reportada para este carotenóide que é de 10mg/L em metanol (ZANG *et al.*, 1997).

2.7 A oxidação dos carotenóides em substâncias de aroma

Em estudo com baixas doses de radiação γ em cenouras (LIMA *et al.*, 2004) foram identificados, por CG-EM, 12 compostos voláteis componentes do aroma característico de cenoura. Dentre estes compostos estavam as α e β -iononas.

A oxidação e quebra das ligações dos carotenóides majoritários da cenoura podem dar origem a estes compostos. A figura 14 mostra uma rota de degradação do α -caroteno em compostos de aroma, sugerida pelos autores.

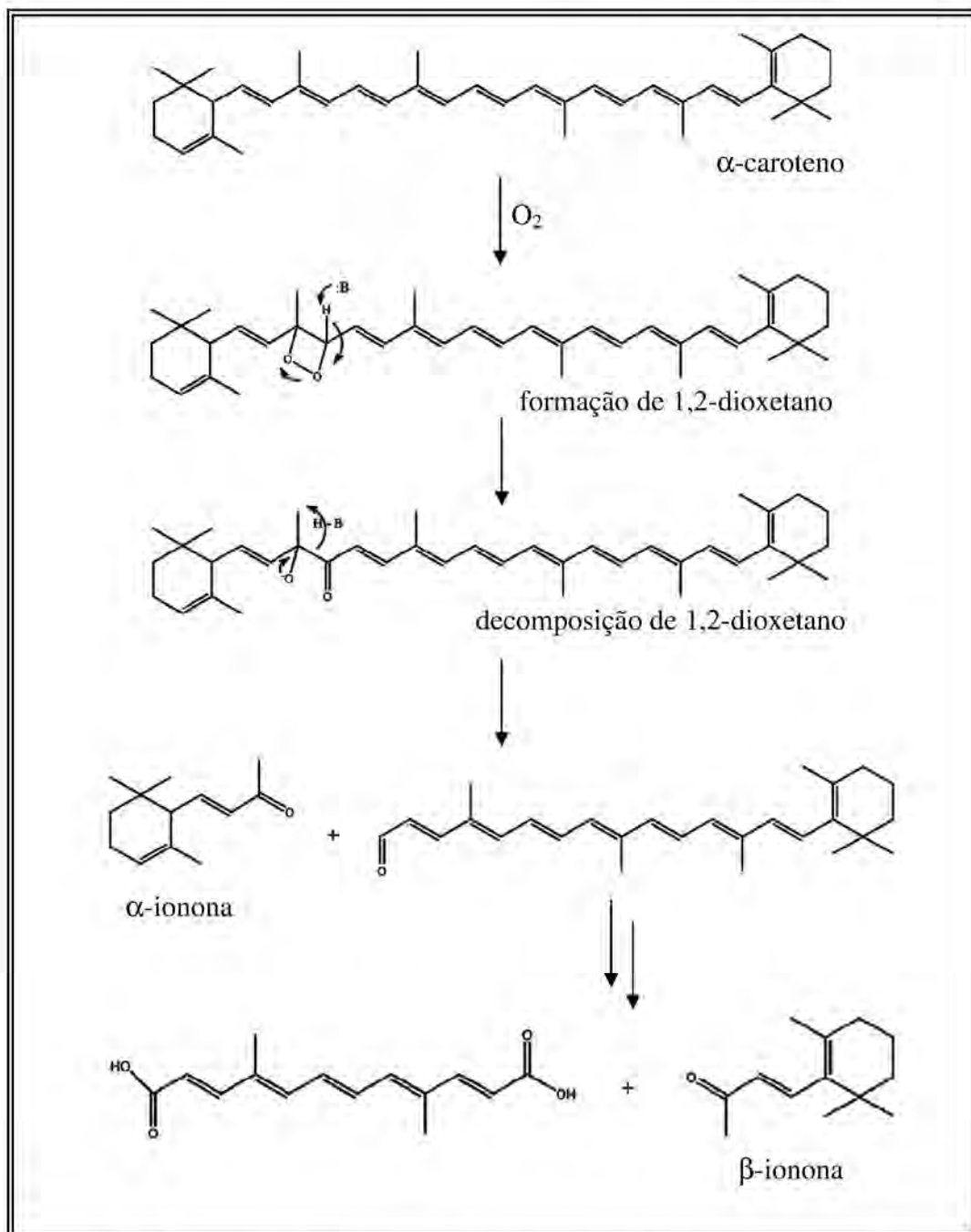


Figura 14– Rota sugerida de degradação de carotenóides em compostos de aroma.

2.8 Vitamina A

A deficiência de vitamina A (retinol) é o maior problema nutricional em populações subdesenvolvidas e suas consequências são: cegueira, morte prematura especialmente em crianças e xerofthalmia ou olho seco, que é uma doença caracterizada pela não produção de lágrimas e dificuldades de visão. A vitamina A é também importante na manutenção do crescimento, na eficiência reprodutiva, na manutenção dos tecidos epiteliais e na prevenção de queratinização, além de uma importante ação na resposta imunológica.

O problema nas populações subdesenvolvidas e carentes resulta da ingestão deficiente de vitamina A pré-formada em fontes animais, devido ao baixo consumo de carnes, ovos, leite e derivados. Nesses casos, a fonte primária de vitamina A é a pró-vitamina A na forma dos carotenóides, vindos da ingestão de frutas e vegetais (SCOTT & RODRIGUEZ-AMAYA, 2000).

A recomendação diária de ingestão de frutas e vegetais é de cinco ou mais porções, o que é suficiente para prover de 3 a 6mg/dia de β -caroteno (IOM, 2000).

2.8.1 Conversão de carotenóides em Vitamina A

Os carotenóides dividem-se em dois grupos, os precursores de vitamina A e os que não podem ser usados na síntese do retinol. Dentre os carotenóides conhecidos, existem apenas aproximadamente 30 que são considerados pró-vitamina A. Em frutas e vegetais as fontes de pró-vitamina A mais comuns são o β -caroteno, α -caroteno e a β -criptoxantina.

O que determina a atividade vitamínica na estrutura do carotenóide é a presença do anel β -ionona. O *todo-trans*- β -caroteno apresenta duas dessas estruturas, enquanto todos os demais carotenóides pró-vitamina A apresentam apenas uma. Deste modo, o β -caroteno é o metabólito vegetal mais importante como fonte de vitamina A, equivalendo a duas moléculas de retinol (Figura 15) (THURNHAM, 2007).

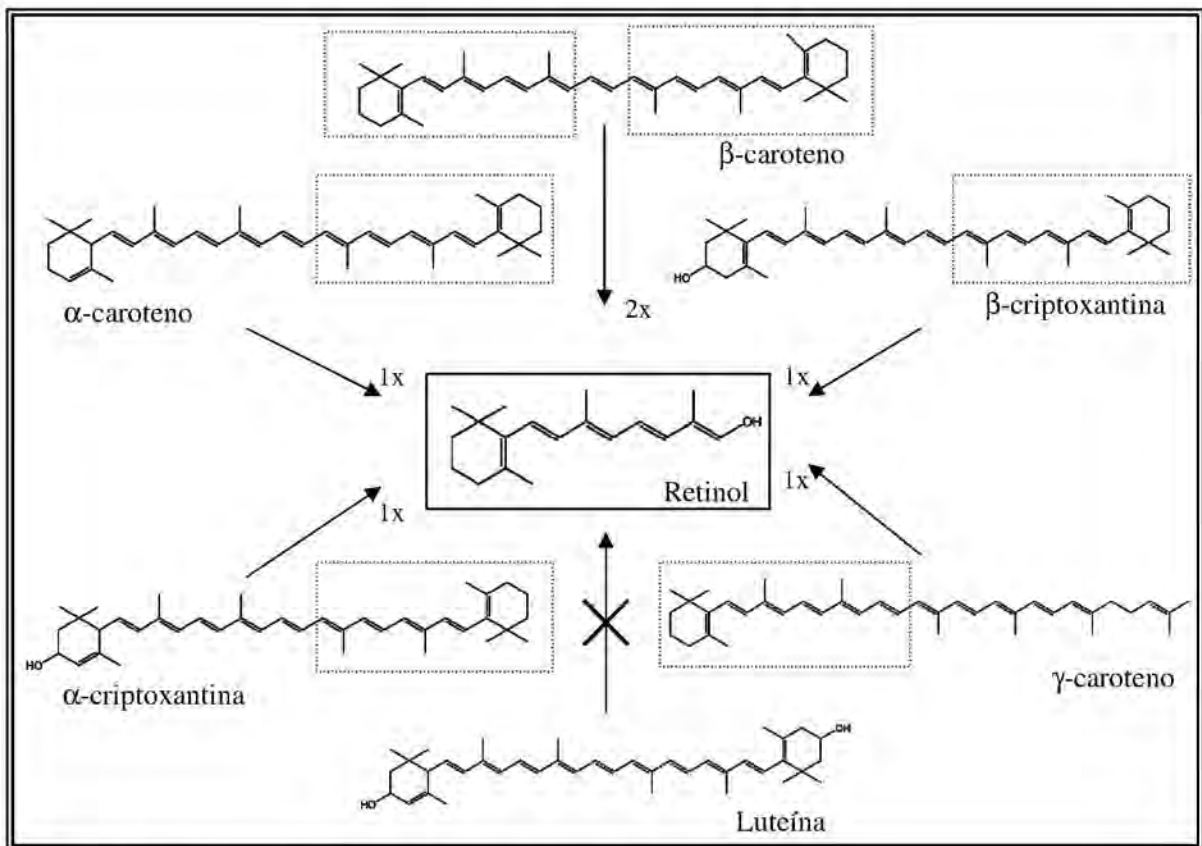


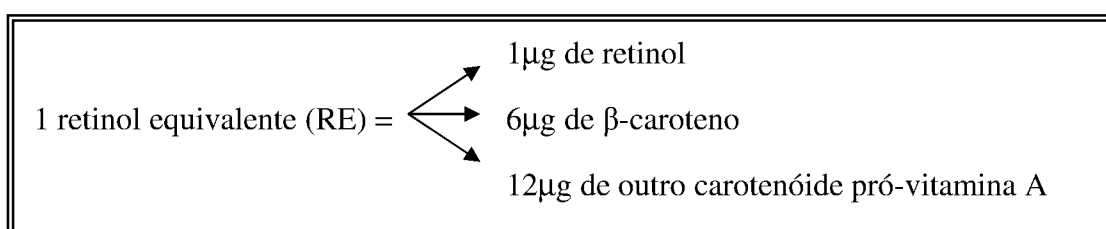
Figura 15– Carotenóides precursores de vitamina A.

A síntese da vitamina A dá-se através da ação da enzima β -caroteno-15,15'-dioxigenase, que em mamíferos tem sua máxima atividade na mucosa intestinal. O retinol então formado é absorvido juntamente com o retinol pré-formado ingerido com a dieta. Como uma molécula de β -caroteno quebra enzimaticamente forma duas moléculas de retinol, $1\mu\text{g}$ de β -caroteno corresponde, em teoria, a $1\mu\text{g}$ de retinol (SCOTT & RODRIGUEZ-AMAYA, 2000).

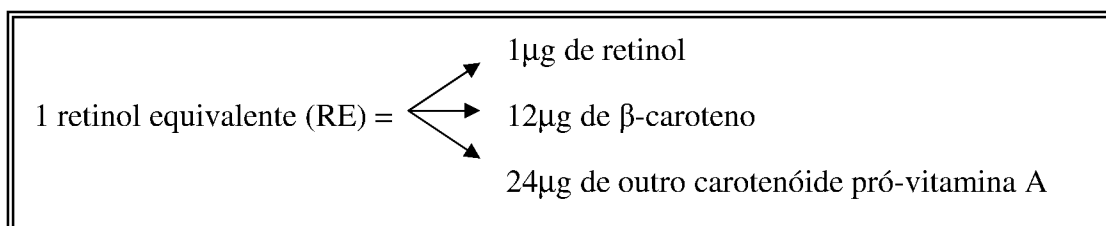
2.8.2 Retinol equivalente (RE) e os fatores de conversão

Em 1967, a Organização Mundial de Saúde (FAO/WHO) recomendou que, na ausência de dados mais específicos para alimentos, a disponibilidade de β -caroteno para absorção deve ser tomada como um terço da ingestão deste carotenóide. A eficiência de utilização em humanos deve ser tomada com um sexto, assumindo ainda uma taxa de conversão para retinol de 50%. Desta maneira, 1mg de β -caroteno na dieta deveria ser tomado como tendo a mesma atividade biológica de 0,083mg de retinol (SCOTT & RODRIGUEZ-AMAYA, 2000).

Em 1974, a Academia Nacional de Ciências e o Conselho Nacional de Pesquisa (NAS/NRC) propuseram que em adição a qualquer expressão como unidade de atividade internacional, vitamina A deve também ser fornecida em termos de retinol equivalente, definido da seguinte maneira:



Esses valores foram revisados e atualmente os valores aceitos para 1 RE são:



No entanto, a maioria dos trabalhos publicados atualmente ainda utiliza a equivalência anterior.

Em 1986, Simpson e Tsou consideraram que as equivalências, propostas pela NAS/NRC foram tomadas de maneira conservadora. Em 1988, a FAO/WHO sugeriram novos fatores baseados nos teores de ingestão de β -caroteno:

Ingestão de β -caroteno (μ g)	1µg RE é igual a
< 1000	4µg β -caroteno
1000-4000	6µg β -caroteno
> 4000	10µg β -caroteno

Os fatores de conversão dos carotenóides em retinol equivalente ainda são polêmicos e existem muitas considerações a serem discutidas antes de utilizá-los. A simples presença dos

carotenóides em um alimento não é garantia de que esse carotenóide estará disponível para absorção e conversão em retinol. Muitos estudos estão em andamento a fim de se estabelecer a biodisponibilidade dos carotenóides presentes nas matrizes alimentares.

Os carotenóides em geral são lipossolúveis e a presença de lipídios na dieta é fundamental para uma ótima absorção.

Nas folhas das plantas os carotenóides estão presentes nas células dentro dos cloroplastos, desta maneira outro importante pré-requisito para a utilização satisfatória desses carotenóides é que a estrutura celulósica da parede celular seja rompida. Essa ruptura é obtida geralmente através da cocção e mastigação do alimento.

No caso de frutas, a estrutura da parede celular é normalmente muito mais fraca que nas folhas. Além disso, os carotenóides são encontrados nas gotas de lipídios, quando presentes, e nos cromoplastos. De modo geral, os carotenóides de frutas são mais biodisponíveis que os carotenóides de folhas.

Os carotenóides liberados durante a alimentação são distribuídos na fase lipídica que, sob a ação de enzimas e ácidos digestivos, é convertida em micelas. Na fase aquosa as micelas são distribuídas na forma de uma suspensão estável. Transportados à mucosa intestinal, uma fração dos carotenóides sofre a ação da enzima responsável pela conversão em retinol que é então absorvido e transportado até o fígado onde é armazenado.

A atividade enzimática ainda depende de outros fatores, evidências sugerem que é aumentada pela deficiência de vitamina A e reduzida pela deficiência de proteínas. Estudos ainda demonstram que a enzima é seletiva, pois na presença de β -caroteno e α -caroteno ela metaboliza preferencialmente o β -caroteno (THURNHAM, 2007).

Além disso, a variação da concentração dos carotenóides nos alimentos é muito grande, mesmo quando se tratando do mesmo tipo de alimento. Há alterações devido às diferenças de variedades, estágio de maturação, condições climáticas, condições de cultivo, tipo de processamento empregado, etc.

A eficiência da absorção dos carotenóides ainda é afetada pela quantidade ingerida do carotenóide, tipo de processamento utilizado (cozimento, etc.), presença de outros componentes que podem estimular (lipídios) ou inibir (fibras) a absorção, efeitos de matriz, interações entre os carotenóides, características individuais, estado de saúde (infestação parasitária), estado nutricional, etc.

Borel *et al.* (1998) estudaram o efeito do alimento preparado com adição de 120mg de β -caroteno em óleo fornecido a voluntários saudáveis. Concluíram que a eficiência da absorção intestinal do β -caroteno nos voluntários é altamente variável, no entanto, parece ser uma característica constante em cada indivíduo.

Desta maneira conclui-se que a equivalência do β -caroteno em retinol varia grandemente entre indivíduos. Os autores sugerem que enquanto novos dados sobre o potencial de absorção de carotenóides não sejam conhecidos, qualquer valor calculado de retinol equivalente dos pró-vitâmicos deva ser tratado com cuidado (SCOTT & RODRIGUEZ-AMAYA, 2000).

As grandes variações de teores dos carotenóides em uma mesma matriz, as variações de capacidade de absorção dos carotenóides de cada indivíduo e a grande variação de biodisponibilidade das matrizes, demonstram que simples fatores de conversão são inapropriados. Desta maneira alguns autores sugerem que o uso de dados em equivalentes de retinol devam ser abandonados, e as tabelas de composição de alimentos devam reportar apenas os teores de retinol e os teores dos carotenóides individuais presentes no alimento (SCOTT & RODRIGUEZ-AMAYA, 2000).

No entanto os fatores de conversão são largamente utilizados na área de saúde e o seu simples abandono deixaria tais profissionais sem estas importantes referências.

2.9 Importância dos carotenóides na dieta humana

2.9.1 Relação com processos inflamatórios

O β -caroteno e outros carotenóides pró-vitamínicos podem ser encontrados no plasma, desta forma estima-se que a quantidade dos carotenóides da dieta esteja em excesso em relação à atividade da enzima β -caroteno-15,15'-dioxigenase. Os carotenóides do plasma não podem ser convertidos em retinol, dessa maneira sugere-se a participação destes carotenóides em outros processos biológicos que não apenas a produção de retinol (THURNHAM, 2007).

A presença de β -caroteno no plasma de indivíduos com baixas concentrações plasmáticas de retinol indica que, neste caso, o baixo nível de retinol não é causado por deficiência de ingestão de carotenóides. Já foi correlacionada a queda da concentração sanguínea de retinol com situações que não a deficiência de ingestão, como por exemplo, a presença de inflamação (THURNHAM, 2007).

A concentração dos carotenóides no plasma sanguíneo também é influenciada por estados inflamatórios. Estudos demonstraram que a concentração sanguínea de carotenóides em crianças com infecção caiu para 20% da concentração normal, 24 a 72 horas após o início da infecção (CSER *et al.*, 2004).

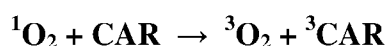
Em estudo com galinhas, a concentração sanguínea de luteína foi reduzida em 71% quatro dias após a instalação de quadros infecciosos, continuando a decrescer nos tecidos 10 dias após o término do quadro infeccioso (TYCZKOWSKI *et al.*, 1991; JENKINS *et al.*, 2008).

Essas alterações nas concentrações dos carotenóides do sangue, durante processos infecciosos, estão diretamente ligadas à resposta do organismo à inflamação, e sugerem sua participação na imunoproteção (THURNHAM, 2007).

2.9.2 Atividade antioxidante e pró-oxidante

Após a comprovação da propriedade de fotoproteção promovida pelos carotenóides em plantas, surgiram vários estudos a fim de avaliar também os efeitos antioxidantes dos carotenóides em animais. No entanto, existem resultados tratando os carotenóides como antioxidantes e também como pró-oxidantes. Este comportamento ambíguo deve-se às diferentes metodologias empregadas para a determinação destas propriedades, em geral a avaliação da capacidade antioxidante realizada *in vitro*. Provavelmente não exista sistema ideal para a determinação desta capacidade antioxidante dos carotenóides (KRINSKY & JOHNSON, 2005).

A melhor proposta para a explicação da ação antioxidante dos carotenóides envolve sua habilidade em sequestrar ou inativar oxigênio singlete ativado. A reação envolve uma transferência de energia eletrônica entre o oxigênio e o carotenóide, conforme a seguinte reação:



O carotenóide formado pode então retornar ao estado fundamental através da dissipação da energia via interações rotacionais e vibracionais com o meio, conforme abaixo:



No entanto os carotenóides não são catalisadores perfeitos como sugerem estas equações simples, muitas reações com o oxigênio podem gerar subprodutos oxigenados.

Estudos realizados com humanos são difíceis de serem avaliados, pois apesar de doses altas de carotenóides poderem ser ministradas e absorvidas pelos indivíduos, é difícil mensurar seu estado de estresse oxidativo. Desta maneira alguns estudos sugerem que não existam evidências fortes da ação antioxidante dos carotenóides, enquanto outros apresentam resultados que merecem discussões. Pode-se concluir que os estudos nessa linha demonstram que existe ação antioxidante dos carotenóides quando avaliados em animais. Em humanos, carotenóides adicionados em alimentos, ou como suplementos alimentares, ainda não mostraram clara ação antioxidante (KRINSKY & JOHNSON, 2005).

O conceito da ação pró-oxidante dos carotenóides foi postulado após um estudo demonstrar que sob altas tensões de oxigênio (não fisiológica) e em altas concentrações, o β -caroteno comporta-se como um pró-oxidante. No entanto os autores concluíram que sob as condições de baixas tensões de oxigênio, observadas nos tecidos de mamíferos, o β -caroteno tem potencial de agir como antioxidante (KRINSKY & JOHNSON, 2005).

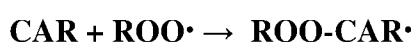
Em um estudo com fumaça de cigarro, considerada pró-oxidante, foi sugerido que na presença de altas concentrações de β -caroteno, a fumaça pode levar à destruição oxidativa deste carotenóide, resultando na formação de metabólitos que poderiam facilitar a carcinogênese. O mesmo efeito não foi observado para o licopeno, que ao contrário mostrou efeitos protetores (KRINSKY & JOHNSON, 2005).

2.9.3 Reação com espécies radicalares

Sabe-se que soluções de carotenóides clareiam ou perdem totalmente a sua cor característica ao serem expostas a radicais livres e compostos oxidantes. Isto pode ser justificado pela reação que promove a interrupção do sistema de duplas ligações conjugadas, que pode ocorrer através de quebra da cadeia carbônica ou por uma reação de adição a uma dupla ligação. Tais reações podem ser comprovadas através da caracterização dos produtos formados. Existem ao menos três possíveis mecanismos de reação dos carotenóides com espécies radicalares: 1) adição radicalar, 2) transferência de elétron ao radical e 3) abstração de hidrogênio alílico (KRINSKY & JOHNSON, 2005).



Um exemplo da primeira reação é a adição de um radical lipídico peroxil ($\text{ROO}\cdot$), em qualquer posição da cadeia do carotenóide, formando um radical que é estabilizado por ressonância ($\text{ROO-CAR}\cdot$). Como este radical pode ser bastante estável, pode interferir na propagação da peroxidação lipídica. Esta explicação justifica os vários exemplos do efeito antioxidante dos carotenóides em solução. As reações subsequentes do radical formado, no entanto, permanecem pouco compreendidas.



Já o mecanismo de transferência eletrônica resulta na formação do cátion radicalar do carotenóide, que foi detectado por técnicas espectroscópicas rápidas. Este mecanismo é o proposto na fotoproteção.

Foi demonstrado ainda o sinergismo entre os radicais de carotenóides com outros compostos antioxidantes, tanto em compartimento lipofílico quanto hidrofílico do plasma humano. Estudos mostram que há interação dos radicais dos carotenóides com o α -tocoferol e também com o ácido ascórbico (vitamina C) (KRINSKY & JOHNSON, 2005).

2.9.4 Efeitos dos carotenóides em processos celulares

Os resultados mais interessantes sobre a ação dos carotenóides em animais surgiram com as técnicas de culturas celulares suplementadas com carotenóides. Diferentes ações fisiológicas puderam ser avaliadas deste modo a fim de descobrir se há alterações com a adição de carotenóides. A dificuldade associada a essas técnicas deve-se ao fato que os carotenóides são insolúveis em meio aquoso e não podem ser adicionados diretamente às culturas de células. Normalmente, a adição é realizada com a dissolução dos carotenóides em solventes orgânicos, em micelas ou em formulações próprias para dispersão em água (KRINSKY & JOHNSON, 2005).

A ação mais interessante dos carotenóides em células descoberta dessa maneira, provavelmente seja a sua habilidade de alterar os padrões de crescimento celulares, em especial a inibição do crescimento de culturas de células tumorais. Muitos estudos estão em andamento com a expectativa de que os carotenóides apresentem as mesmas propriedades de inibição do crescimento de tumores *in vivo* (KRINSKY & JOHNSON, 2005).

Dentre os estudos *in vitro* vários resultados se destacam, como por exemplo, a ação do β -caroteno e da cantaxantina, que na concentração de 70 μ M, promoveram a inibição da proliferação de células cancerígenas humanas, ao mesmo tempo em que não tiveram efeito sobre o crescimento de células normais (KRINSKY & JOHNSON, 2005).

Resultados similares foram obtidos com o uso de uma emulsão de óleo de dendê, rico em carotenóides, que ao ser adicionado em uma série de culturas celulares tumorais promoveram a inibição do crescimento celular, dentre as quais, culturas de células cancerígenas de pâncreas, estômago e células de neuroblastoma. Na concentração de 15 μ M de carotenóides totais do óleo de dendê obteve-se 50% de inibição do crescimento celular. Nesse estudo, o α -caroteno mostrou-se ser o carotenóide componente do óleo de dendê mais ativo na inibição do crescimento, sendo dez vezes mais eficiente que o β -caroteno (KRINSKY & JOHNSON, 2005).

Alguns carotenóides também demonstraram efeito positivo sobre células não tumorais, a cantaxantina em concentrações altas (100 μ M), ao mesmo tempo em que inibiu o crescimento de três linhagens de células de tumor, estimulou o crescimento de linhagens não tumorais (KRINSKY & JOHNSON, 2005).

Muitos estudos ainda vem sendo realizados com o licopeno, que apesar de não apresentar atividade pró-vitamínica é um dos carotenóides com maior atividade antioxidante. Com células tumorais mamárias, do endométrio e do fígado, o licopeno (1-2 μ M) mostrou-se 4 a 10 vezes mais efetivo na inibição do crescimento celular do que o α -caroteno e o β -caroteno. O seu efeito no crescimento celular de células de tumor de próstata tornou-se particularmente intrigante quando um estudo constatou uma relação inversa entre o consumo de tomates e seus derivados com risco de câncer de próstata (KRINSKY & JOHNSON, 2005).

Outros carotenóides, além do licopeno, também se mostraram eficientes na inibição do crescimento de culturas celulares de tumor de próstata, dentre estes o β -caroteno, a neoxantina, fucoxantina, fitoflueno e o ζ -caroteno. Já o fitoeno, a cantaxantina, zeaxantina e a β -criptoxantina não apresentaram efeito algum (KRINSKY & JOHNSON, 2005).

Alguns carotenóides aparentemente reduzem a viabilidade celular de células tumorais através de um mecanismo de indução de apoptose (forma de morte celular programada que ocorre em organismos multicelulares). A apoptose induzida acaba sendo um meio eficiente de regulação do crescimento celular. Outros carotenóides como a luteína, por exemplo, apresentaram ainda um efeito protetor contra a apoptose em células normais, ao mesmo tempo em que não tem o mesmo efeito sobre células transformadas. Esta característica da luteína pode ser uma potencial forma terapêutica. (KRINSKY & JOHNSON, 2005).

A capacidade do β -caroteno promover a apoptose também foi investigada em diversas culturas celulares tumorais de cólon. Os resultados sugerem que o β -caroteno possa ser usado no tratamento deste tipo de câncer (KRINSKY & JOHNSON, 2005).

Alguns estudos ainda avaliaram a ação antimutagênica dos carotenóides. Com o desenvolvimento de cepas de *Salmonella typhimurium* modificadas de modo a sofrerem mutações sob o efeito de uma série de substâncias mutagênicas foi possível a avaliação da ação da adição de carotenóides. A ação antimutagênica dos carotenóides foi confirmada contra vários agentes, como a luz ultravioleta A (340-400nm) e a aflatoxina B₁. Ainda foi demonstrado que o β -caroteno e a cantaxantina podem inibir transformações malignas induzidas por irradiação de raios X (KRINSKY & JOHNSON, 2005).

Acredita-se que o mecanismo de inibição do desenvolvimento de culturas de células tumorais apresentado pelos carotenóides tenha relação com a comunicação entre as células. Sabe-se que a comunicação celular é de grande importância para a regulação do crescimento celular e que consiste em um sistema que envolve o contato entre as células através de junções porosas. Esta estrutura permite que moléculas de massa molecular abaixo de 1000 daltons difundam entre as conexões celulares. As células de tumor são extremamente deficientes dessas estruturas de junção. Os retinóis e os carotenóides tem a capacidade de aumentar o número destas junções de comunicação celulares, e isto pode explicar os resultados de inibição do crescimento celular de culturas deste tipo de células (KRINSKY & JOHNSON, 2005).

2.9.5 Carotenóides e o câncer

Apesar de estudos epidemiológicos, que avaliam os fatores determinantes das enfermidades, não proverem evidências da relação causal, estes vem demonstrando o possível efeito protetor dos alimentos ou dos componentes alimentares na prevenção de doenças. Dados consistentes vem mostrando que pessoas que consomem altos níveis de frutas e vegetais apresentam menores riscos de desenvolverem certos tipos de câncer.

Resultados de 10 estudos, de um total de 17, demonstraram que um alto consumo de frutas e vegetais, ricos em carotenóides, está associado com a diminuição do risco de câncer, em especial câncer de pulmão e estômago. A relação entre o consumo desses alimentos com o risco de câncer de pulmão sugere um real efeito das frutas e vegetais na prevenção deste tipo de câncer. Evidências de que o β -caroteno seja o agente protetor em frutas e vegetais contra o risco de câncer de pulmão foi demonstrado em 11 de 15 estudos epidemiológicos, onde o nível plasmático de β -caroteno teve relação inversa com o risco de câncer (KRINSKY & JOHNSON, 2005).

No entanto, vale salientar que o β -caroteno vem servindo como marcador do aumento do consumo de frutas e verduras e, conseqüentemente, do aumento do consumo de outros componentes presentes nesses alimentos que apresentam propriedades preventivas contra o câncer, como vitamina C, ácido fólico, além de outros carotenóides e flavonóides.

Em relação ao licopeno, estudos recentes vem examinando a relação de alto consumo de tomates e seus derivados com o risco de câncer. Os resultados demonstram que o alto

consumo de tomates está associado a 40% de redução de risco de câncer de esôfago, esta ação protetora foi também relacionada com câncer gástrico (KRINSKY & JOHNSON, 2005).

Outro estudo avaliou a relação de diversos fatores com o risco de câncer de próstata, os resultados indicaram o aumento da idade e problemas prévios de próstata como os principais fatores de risco, o fumo e o consumo de álcool curiosamente não se mostraram relevantes. Dentre os fatores alimentares, o consumo de tomates e seus derivados, cinco ou mais tomates por semana, foi associado a uma significativa redução do risco de câncer de próstata. Ficou demonstrado que a alta ingestão de licopeno e não apenas de frutas e vegetais, tem relação inversa com o risco de câncer de próstata. Os melhores resultados de diminuição do risco foram obtidos com molhos de tomate (ketchup), seguidos por tomates e pizza. Não foi encontrada relação de redução do risco com o consumo de suco de tomate, o que pode ser explicado pela baixa disponibilidade do licopeno em sucos não processados (KRINSKY & JOHNSON, 2005).

Na tentativa de entender o mecanismo de ação do licopeno contra o câncer de próstata descobriu-se que a concentração deste carotenóide é relativamente alta no tecido da próstata, sugerindo que ele possa exercer efeitos biológicos que possam estar relacionados com a prevenção do câncer. Foram identificados de 14 a 18 diferentes isômeros de licopeno. Aproximadamente 80% do teor de licopeno total encontrado é composto por isômeros *cis*; no sangue este valor representa 50% e apenas 5 a 10% nos alimentos. Os efeitos biológicos desta constatação ainda são desconhecidos, já que por diferirem da forma *trans* devam apresentar metabolismo diferenciado (KRINSKY & JOHNSON, 2005).

2.9.6 Carotenóides e doenças cardiovasculares

Devido a sua capacidade antioxidante, sugere-se que os carotenóides sejam agentes protetores contra doenças coronarianas. Sabe-se que a oxidação das lipoproteínas de baixa densidade (LDL) é um fator contribuinte para as doenças coronarianas. O fato das LDL serem o principal transportador do β -caroteno e do licopeno na circulação, além desses carotenóides terem a habilidade de reagir com radicais peroxil, dão força a tese do seu efeito protetor.

Estudos epidemiológicos mostraram existir relação entre o consumo de alimentos ricos em carotenóides e outros antioxidantes com a redução do risco de doenças cardiovasculares.

Por outro lado, estudos mostraram que a suplementação apenas com β -caroteno, ou em combinação com vitamina E e/ou selênio, não reduziram os riscos de doenças cardiovasculares (KRINSKY & JOHNSON, 2005).

2.9.7 Carotenóides como pigmentos maculares

Data de 1782 o primeiro relato documentado sobre a cor amarela da região central da retina denominada mácula ou mácula lútea, do latim *mácula* (ponto) + *lútea* (amarelo). Em 1945, estudos mostraram que a absorção de luz do pigmento macular era característica dos carotenóides, mais especificamente das xantofilas.

Apenas em 1985 foram realizadas as primeiras separações destes pigmentos usando cromatografia líquida o que acabou revelando a existência de duas substâncias. Tais substâncias foram então denominadas MP1 e MP2. Análises dos espectros e testes químicos confirmaram tratar-se das xantofilas luteína e zeaxantina (DAVIES & MORLAND, 2004).

Assim como os demais carotenóides, a luteína e a zeaxantina não são sintetizadas pelo organismo, sendo absorvidas através da dieta. Estudos mostraram que macacos alimentados com uma dieta ausente de carotenóides não apresentam pigmentação amarela da mácula. Humanos com suplementação oral dos dois carotenóides apresentaram um aumento desta pigmentação (DAVIES & MORLAND, 2004).

A mácula, com aproximadamente 7mm^2 , é a região central da retina e varia muito de tamanho entre indivíduos. É nesta região que se encontra a fóvea, região central da visão onde se encontram em grande densidade os cones, fotorreceptores responsáveis pela percepção das cores (Figura 16). A imagem formada nesta região é de grande resolução espacial, ou seja, de grande nitidez e voltada para a percepção das cores (DAVIES & MORLAND, 2004).

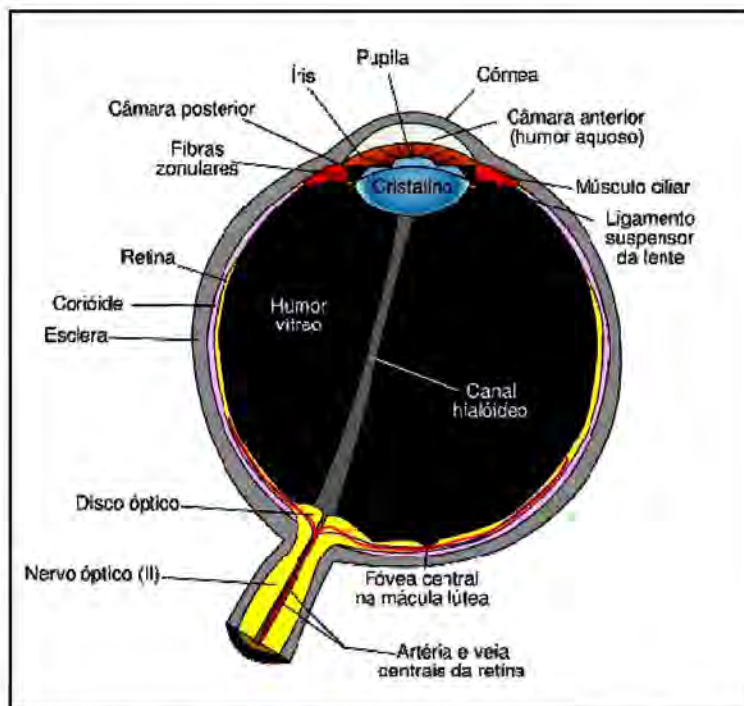


Figura 16 – Olho humano mostrando a localização da fóvea

Os pigmentos maculares apresentam absorção seletiva de luz do espectro visível e essa absorção ocorre antes da incidência da luz nos fotorreceptores localizados na fóvea. Sendo assim, pode-se dizer que tais pigmentos alteram a distribuição espectral da luz que incide na córnea e que chega à retina (DAVIES & MORLAND, 2004).

A retina está posicionada de maneira que seu centro está focado na luz de comprimento de onda de 560nm , por este motivo o verde, que é a cor referente a este comprimento de onda, é o máximo de sensibilidade do olho humano.

A linha verde da Figura 17 representa a sensibilidade do olho humano aos comprimentos de onda do espectro visível, sendo 560nm o ponto máximo. Por serem focados nos extremos da retina, os comprimentos de onda referentes ao azul e ao vermelho são os de menor sensibilidade.

Os espectros de absorção de luz da luteína e zeaxantina também estão representados na Figura 16, onde se pode notar que a soma dos dois espectros gera uma zona de absorção bastante eficiente para a faixa de 400 a 500nm (faixa de baixa sensibilidade do olho). Percebe-se que o pico de maior intensidade de absorção da zeaxantina coincide com o vale entre os picos de absorção da luteína, da mesma maneira que o segundo pico de absorção da luteína coincide com o vale entre os picos da zeaxantina. Na prática, a presença dessas substâncias funciona como um filtro para a luz azul, de alta energia, que chega à retina e que apresenta baixa resposta visual.

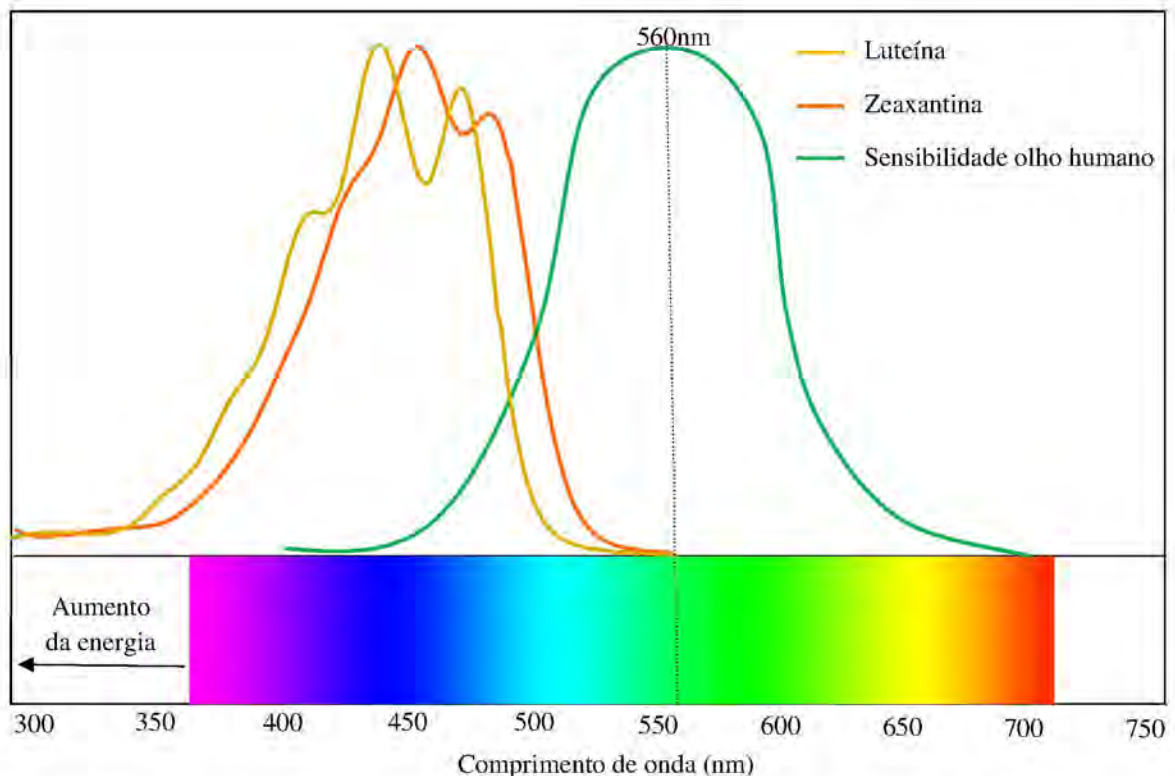


Figura 17 – Espectros de absorção da luteína e zeaxantina e sensibilidade do olho humano

A luz que atravessa o meio ocular sofre dispersões devido às diferenças de índice de refração entre os meios. Estes efeitos são denominados aberrações cromáticas e podem ser longitudinais e/ou transversais. A aberração longitudinal ocorre devido às dispersões características do meio ocular, de modo que comprimentos de onda baixos são focados anteriormente à retina e comprimentos de onda altos são focados posteriormente.

Como efeito prático ocorre formação de penumbra na retina nos comprimentos de onda referentes ao azul e vermelho.

A aberração cromática transversal resulta dos desvios de comprimentos de onda baixos de maneira menos intensa que comprimentos de onda altos. Desta maneira, a imagem formada apresenta embaçamento do vermelho nos seus limites. Juntas as duas aberrações cromáticas resultam na presença de uma penumbra púrpura na imagem.

Estudos demonstraram que esse efeito pode ser reduzido a níveis de traço com o uso de filtros que absorvem comprimentos de onda baixos. Os filtros adequados apresentaram faixa espectral similar à faixa de absorção dos pigmentos maculares. Essa descoberta levou à hipótese de que a função dos pigmentos maculares é reduzir a quantidade de luz de baixo comprimento de onda e, conseqüentemente, o embaçamento cromático, resultando em melhora da visão espacial.

Estudos com filtros em diversos indivíduos demonstraram que existe grande variabilidade, ou seja, alguns indivíduos mostraram grande melhora visual enquanto outros não experimentaram diferenças ou até sofreram detrimento visual.

A hipótese para explicar tais resultados é que indivíduos com altos níveis de pigmentos maculares experimentariam pouca ou nenhuma melhora visual, enquanto indivíduos com baixos níveis de pigmentos experimentariam grande efeitos. Esta hipótese da

melhora visual através da redução do efeito da aberração cromática ainda requer estudos para ser confirmada (DAVIES & MORLAND, 2004).

Outra proposta para explicar como os pigmentos maculares promovem a melhora visual foi recentemente formulada. O fenômeno do espalhamento da luz visível ocorre de tal maneira que a luz de baixos comprimentos de onda é espalhada mais intensamente que a luz com altos comprimentos de onda. O espalhamento ocorre devido às moléculas do ar e à presença de partículas na atmosfera. Esse espalhamento é responsável pelo azul do céu e pela névoa azulada associada aos objetos distantes.

O uso de filtro amarelo também é eficiente para melhorar a visualização de objetos distantes. Isto é devido à absorção da luz azul espalhada com consequente redução do embaçamento da imagem (DAVIES & MORLAND, 2004).

A Figura 18 ilustra este efeito neutralizante. O uso de um filtro amarelo (quadrado c) sobre uma imagem com o tom azul incrementado recompõe a coloração original da imagem.

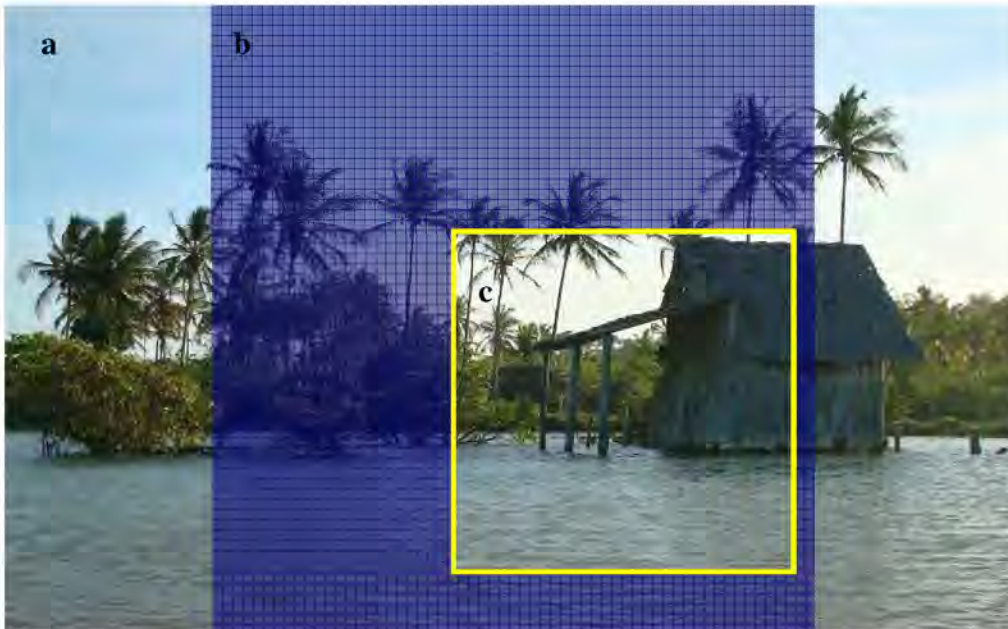


Figura 18 – a. foto com cores reais, b. filtro azul e c. filtro amarelo sobre o azul.

A ação antioxidante dos carotenóides ainda sugere que os pigmentos maculares possam exercer uma função protetora da retina.

A retina é um tecido bastante delicado, assim como todos os tecidos neurais esta não tem a habilidade de regeneração após danos. Por tratar-se de um transdutor do principal órgão dos sentidos apresenta função vital. Também é o tecido do organismo com a maior atividade metabólica, sendo a camada fotorreceptora mantida altamente oxigenada e com grande concentração de ácidos graxos poliinsaturados.

Este ambiente está sujeito a danos que podem ser de duas fontes: danos causados pela radiação incidente e danos por processos internos, ambos com liberação de espécies reativas de oxigênio (DAVIES & MORLAND, 2004).

Estudos com macacos mostraram que o efeito da radiação luminosa incidente é de 70 a 1000 vezes mais danosa para a retina em 441nm do que em 1064nm. Desta maneira, os pigmentos maculares podem atuar como barreira aos comprimentos de onda mais danosos, reduzindo a quantidade de luz de baixos comprimentos de onda que atingem os fotorreceptores.

Por outro lado, os pigmentos ainda podem atuar como antioxidantes, neutralizando espécies reativas geradas pela ação da luz ou pelos mecanismos internos (DAVIES & MORLAND, 2004).

2.9.8 Relação da zeaxantina e luteína com a catarata

Da mesma maneira que na mácula, a zeaxantina e a luteína são encontradas no cristalino. Do mesmo modo acredita-se estarem relacionadas à proteção desta lente contra a ação oxidativa da radiação UV e da radiação azul.

De fato, já foi observado que a alta ingestão desses carotenóides, através de alimentos com altos teores como espinafre e outras verduras, promoveu redução do risco de catarata de 22% em mulheres e 19% em homens (KRINSKY & JOHNSON, 2005).

2.10 Métodos de análise dos carotenóides

Como já mencionado, as primeiras separações dos carotenóides são creditadas ao botânico russo Tswett (1906, 1911) que, ao realizar tais separações em colunas abertas de carbonato de cálcio, acabou por inventar a cromatografia líquida (FRANK *et al.*, 2004).

As separações eram realizadas em colunas abertas à pressão atmosférica e esta metodologia requer grandes quantidades de amostra e de solventes. Apesar das desvantagens pode fornecer boa separação de amostras com composições complexas de carotenóides e, até os dias de hoje, vem sendo utilizadas na pré-purificação de amostras complexas e na preparação de padrões analíticos (RODRÍGUEZ-BERNALDO *et al.*, 2006).

Com o desenvolvimento da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), numerosos métodos em fase normal e reversa foram desenvolvidos para a separação de xantofilas e carotenos. O detector mais utilizado é o ultravioleta-visível (UV-Vis), e mais recentemente o detector de arranjo de fotodiodos (DAD), que permite a coleta contínua de dados espectrofotométricos durante as análises.

Quando alta sensibilidade é requerida o detector eletroquímico é uma boa alternativa. Nos casos de matrizes complexas, onde o DAD não é suficiente para a identificação devido a interferências espectrais, o detector de espectrometria de massas vem sendo utilizado (RODRÍGUEZ-BERNALDO *et al.*, 2006).

2.10.1 Extração

Devido a suas estruturas complexas e a grande variabilidade de composição dos carotenóides presentes em vegetais e frutas, existem diversos métodos para sua extração.

Numerosos solventes são utilizados como, por exemplo, acetona, tetraidrofurano, hexano, pentano, etanol, metanol e clorofórmio. Assim como diversas misturas de solventes, como diclorometano:metanol, acetona:éter de petróleo, metanol:tetraidrofurano, hexano:tolueno, hexano:acetona, 2-propanol:diclorometano, hexano:acetato de etila, hexano:acetona:etanol, etc. (RODRÍGUEZ-BERNALDO *et al.*, 2006).

De modo geral, recomenda-se que a extração dos carotenóides seja rápida, evitando a exposição à luz, oxigênio, altas temperaturas e metais oxidantes como ferro e cobre, afim de minimizar a oxidação e isomerizações *cis-trans*.

Para prevenir perdas durante a extração alguns antioxidantes são utilizados, como o hidroxitolueno butilado (BHT), ácido ascórbico e piragalol. Carbonatos de magnésio e cálcio também são utilizados a fim de neutralizar traços de ácidos orgânicos naturalmente presentes nas amostras.

No caso da análise dos carotenóides no plasma humano, a extração com solvente orgânico imiscível é feita após a precipitação das proteínas com etanol (RODRÍGUEZ-BERNALDO *et al.*, 2006).

A extração propriamente dita dos carotenóides da matriz dá-se através da homogeneização da amostra com o solvente de extração. Substâncias abrasivas, como celite, são empregadas com a finalidade de facilitar o rompimento das estruturas celulares e liberação dos carotenóides e após a extração o extrato obtido é filtrado. Este procedimento deve ser repetido até que o filtrado torne-se incolor, não havendo mais carotenóides a serem extraídos.

O filtrado combinado é então particionado para solvente orgânico, que pode ser concentrado ou completamente removido para posterior dissolução em solvente apropriado. Em alguns estudos, técnicas de extração em fase sólida são utilizadas antes da análise, a fim de promover uma melhor purificação do analito (RODRÍGUEZ-BERNALDO *et al.*, 2006).

A extração com fluido supercrítico também é utilizada com sucesso em substituição à extração líquido-líquido. Algumas vantagens no seu uso são: maior rapidez de extração, não há etapa de evaporação, o dióxido de carbono não é tóxico, é barato, não é inflamável e ambientalmente aceitável. Além disso, sua temperatura crítica de 31°C o torna ideal para extração de compostos termoinstáveis. No entanto, apresenta baixa polaridade o que torna a extração dos carotenóides polares difícil, sendo necessária a utilização de modificadores como metanol e etanol (RODRÍGUEZ-BERNALDO *et al.*, 2006).

2.10.2 Saponificação

A fim de simplificar a separação cromatográfica, um procedimento de saponificação é utilizado para a remoção de substâncias interferentes, como clorofila e lipídios, que podem atrapalhar na determinação cromatográfica.

Além disto, informações valiosas da natureza e distribuição dos carotenóides presentes na amostra podem ser obtidas com o processo de saponificação. Através da obtenção do perfil cromatográfico, antes e após o tratamento com álcali, a presença de carotenóides esterificados pode ser verificada. Durante a saponificação ocorre a hidrólise dos ésteres dos carotenóides, liberando o carotenóide anteriormente ligado. No entanto muitos trabalhos reportam a perda de carotenóides devido à saponificação, em especial das xantofilas e epoxicarotenóides, sendo recomendada sua utilização apenas nos casos onde se faça realmente necessária.

Para a saponificação geralmente são utilizadas solução de hidróxido de potássio em metanol, em geral na concentração de 30%(m/v), para amostras com teores elevados de lipídios e 10% para amostras com baixo teores. As amostras devem ser mantidas no escuro e sob atmosfera de nitrogênio, a fim de reduzir a degradação dos carotenóides. O tempo da reação em geral varia de 1 a 16 horas.

Após a saponificação, o extrato deve ser tratado para a eliminação da base e novamente é utilizada a extração líquido-líquido com éter de petróleo, hexano ou éter etílico e sucessivas lavagens com água (RODRÍGUEZ-BERNALDO *et al.*, 2006).

2.10.3 Análise cromatográfica

Dentre as fontes naturais de carotenóides usadas na alimentação, muitos isômeros *cis-trans* ocorrem naturalmente, ou então são formados durante o processamento dos alimentos. Os isômeros *cis* são convertidos em vitamina A de forma menos eficiente quando comparados com as formas *trans*. Metabolismos diferentes também são reportados aos diferentes isômeros, deste modo estudos nutricionais de alimentos, tecidos e sangue dependem de

métodos que sejam capazes de separar e quantificar os isômeros geométricos dos carotenóides (EMENHISER *et al.*, 1995).

A cromatografia de fase reversa é bem conhecida e muito utilizada para a separação dos carotenóides, no entanto não é muito eficiente na resolução dos isômeros *cis-trans*. Excelentes resultados na separação dos isômeros são conseguidos utilizando-se fase normal com colunas de hidróxido de cálcio, no entanto essas colunas não existem comercialmente e sua preparação apresenta sérios problemas de reprodutibilidade. Fases poliméricas reversas C₃₀ foram desenvolvidas e otimizadas para a separação dos carotenóides e seus isômeros (EMENHISER *et al.*, 1995).

Devido ao fato dos carotenóides serem moléculas maiores que a cadeia das fases estacionárias das colunas C₁₈, aproximadamente 30 Å contra 21 Å, imaginou-se que interações mais extensivas deveriam ocorrer com fases estacionárias com cadeias mais longas. As fases C₃₀ foram preparadas com base neste pressuposto e as separações dos isômeros obtidas foram melhores que nas fases C₁₈ (SANDER *et al.*, 2000).

O comportamento de alguns carotenóides mostrou-se muito interessante, em especial o do licopeno que tem sua retenção variando drasticamente de acordo com as propriedades da fase estacionária. Em colunas C₁₈ monoméricas o licopeno elui geralmente antes do α e do β -caroteno, enquanto que em colunas C₁₈ poliméricas e na C₃₀ o licopeno é fortemente retido e elui somente após estes carotenóides.

A seletividade também é fortemente dependente de modificadores na fase móvel. A seletividade dos isômeros do β -caroteno, por exemplo, difere com o uso de metanol ou acetonitrila.

A separação de carotenóides polares é também influenciada pela presença de água, sendo os carotenóides apolares relativamente insensíveis a sua presença. Separações completas podem ser obtidas com gradientes de fases não aquosas de metanol e éter metil-*tert*-butílico (MTBE). O MTBE é utilizado como modificador para facilitar a eluição do licopeno, que é fortemente retido em fases metanólicas e a acetona também pode ser utilizada com o mesmo propósito (SANDER *et al.*, 2000).

Mudanças na seletividade de colunas C₃₀ também foram investigadas e mudanças não usuais de tempo de retenção foram reportadas para certos intervalos de temperatura. Os tempos de retenção do α e β -caroteno aumentaram em temperaturas de coluna acima de 35°C. Mudanças de temperatura influenciam a seletividade de maneira equivalente às mudanças de composição de fase móvel. Devido a esta sensibilidade dos tempos de retenção dos carotenóides às mudanças de temperatura, é recomendável o controle da temperatura da coluna para garantir a reprodutibilidade. O controle ainda é útil para a otimização da seletividade durante o desenvolvimento de métodos (SANDER *et al.*, 2000).

As fases C₃₀ foram capazes de resolver completamente nove formas *cis-trans* de luteína, cinco de β -criptoxantina, seis de α -caroteno, quatro de zeaxantina, dezoito de licopeno com clareza única e em nenhuma fase reversa C₁₈ os isômeros de β -caroteno foram tão bem resolvidos com picos tão finos.

A fase polimérica C₃₀ apresentou seletividade para os seis carotenóides mencionados e seus isômeros, fornecendo retenção adequada para resolução de carotenóides polares. Desta maneira, seu uso garante maior exatidão na determinação do conteúdo pró-vitaminico em alimentos, tecidos e sangue, além de maior precisão nas determinações da pureza de padrões (EMENHISER *et al.*, 1995).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material

3.1.1 Material de consumo e equipamentos

Para a realização dos experimentos foram utilizadas as seguintes vidrarias, material de consumo e reagentes:

- ✓ Ponteiras para pipetador automático com capacidade para 10 a 100 μ L – Brand[®]
- ✓ Ponteiras para pipetador automático com capacidade para 100 a 1000 μ L – Brand[®]
- ✓ Ponteiras para pipetador automático com capacidade para 0,5 a 5mL – Brand[®]
- ✓ Papel alumínio laminado
- ✓ Balões volumétricos âmbar com capacidade para 25, 50, 100 e 200mL
- ✓ Graal e pistilo de porcelana com 10cm de diâmetro
- ✓ Dosador de celite (3 gramas)
- ✓ Filtro com placa de vidro sinterizado de porosidade 4 e capacidade de 150mL
- ✓ Kitassatos com capacidade para 125, 250 e 500mL
- ✓ Funis de separação com capacidade para 150, 250, 500 e 1000mL
- ✓ Funis raiados de vidro com 10cm de diâmetro
- ✓ Funil de vidro para sólidos com 15cm de diâmetro
- ✓ Bastão de vidro com 30cm de comprimento
- ✓ Espátula de aço inox com 40cm de comprimento
- ✓ Béqueres com capacidade para 50, 100, 250 e 500mL
- ✓ Erlenmeyer âmbar de 125mL com tampa
- ✓ Solução de saponificação - KOH 10% (m/v) em metanol
- ✓ Balão âmbar de fundo redondo de 125, 250 e 500mL
- ✓ Dessecador de vidro com adaptador para vácuo
- ✓ Sílica gel azul - Quimex[®]
- ✓ Mixer vertical modelo SB40 – Black&Decker[®]
- ✓ Ampolas de borossilicato com capacidade para 20mL - Aliança[®]
- ✓ Coluna cromatográfica aberta de vidro - 30x2,5cm
- ✓ Adaptadores de borracha para filtros de vidro (Guko) - Thomas[®]
- ✓ Rolha de borracha furada
- ✓ Vials âmbar para injetor automático com capacidade para 1,8 e 4mL – Waters[®]
- ✓ Redutor de volume para vial com volume de 200 μ L
- ✓ Acetona grau HPLC – Tedia[®]
- ✓ Acetonitrila grau HPLC - Tedia[®]
- ✓ Éter de petróleo grau HPLC - Tedia[®]
- ✓ Éter etílico grau HPLC - Tedia[®]
- ✓ Metanol grau HPLC – Tedia
- ✓ Éter metil-*terc*-butílico grau HPLC – Tedia[®]
- ✓ Celite 545 – Tedia[®]
- ✓ Hidróxido de magnésio PA - Merck[®]
- ✓ Sulfato de sódio anidro - Quimex[®]
- ✓ Cloreto de sódio PA - Quimex[®]
- ✓ Hidroxitolueno butilado (BHT) granular - Spectrum[®]
- ✓ Acenafteno 99% – Sigma-Aldrich[®]
- ✓ Lã de vidro fibra média - Proquimios[®]

- ✓ Hidróxido de potássio PA – Merck[®]
- ✓ Água ultrapura (18,2MΩ) – Milli-Q[®]
- ✓ Nitrogênio grau 4.6 – White Martins[®]
- ✓ Ar comprimido
- ✓ Gás liquefeito de petróleo - GLP

E os seguintes equipamentos:

- ✓ Pipetador automático com capacidade para 10 a 100μL – Brand[®]
- ✓ Pipetador automático com capacidade para 100 a 1000μL – Brand[®]
- ✓ Pipetador automático com capacidade para 0,5 a 5mL – Brand[®]
- ✓ Balança analítica (0,1mg) modelo 2104 – Bel Engineering[®]
- ✓ Homogeneizador ultra Turrax T18 Basic – Ika[®]
- ✓ Agitador tipo vórtex modelo Genie 2 – Scientific Industries[®]
- ✓ Evaporador rotativo modelo Rotavapor-RE – Büchi[®]
- ✓ Termômetro com faixa de leitura de -10 a 260°C - Arba[®]
- ✓ Termômetro de máxima e mínima - Incoterm[®] – calibrado pela empresa Visomes (RBC)
- ✓ Sistema de purificação de água modelo Ellix/Rios 5 e Milli-Q A10 – Millipore[®]
- ✓ Sistema de selagem de ampolas com maçarico, com adaptação para vácuo e nitrogênio
- ✓ Cromatógrafo líquido modular modelo W600 – Waters[®]
- ✓ Injetor automático modelo 717 *plus* - Waters[®]
- ✓ Cromatógrafo líquido modelo Alliance[®] 2695 – Waters[®]
- ✓ Detetor de arranjo de fotodiodos modelo W26996 – Waters[®]
- ✓ Coluna cromatográfica YMC[®] C₃₀ *Carotenoid* (250x4,6xmm; 3μm) - Waters[®]
- ✓ Espectrofotômetro Modelo UV-1800 – Shimadzu[®]
- ✓ Microcomputador modelo Optiplex GX 240 – Dell[®]
- ✓ Software de controle e aquisição de dados Empower[®] – Waters[®]
- ✓ Geladeira modelo DF45 - Eletrolux[®]
- ✓ Geladeira modelo DF47 - Eletrolux[®]
- ✓ Banho de aquecimento com areia - Ika[®]
- ✓ Estufa modelo WTB - Binder[®]

3.1.2 Cromatógrafos e condições cromatográficas

Todas as análises cromatográficas desse trabalho foram realizadas em dois sistemas cromatográficos, conforme a disponibilidade para o uso. Ambos os cromatógrafos são da fabricante Waters® e apresentavam as seguintes configurações:

Sistema 1 – Bomba analítica W600 com forno para colunas, degaseificador em linha, injetor automático 717 *plus* e detector de arranjo de diodos PDA 2996 (Figura 19).

Sistema 2 – Modulo de separação Alliance® 2695, composto por bomba analítica, injetor automático, degaseificador e forno para colunas. O detector utilizado foi o mesmo do sistema 1, (PDA 2996) (Figura 18).

Ambos os cromatógrafos foram controlados por um microcomputador, através do *software* de controle e processamento de dados Empower®, também da Waters®.



Figura 19 – Sistema cromatográfico modular (direita), sistema cromatográfico Alliance® (centro) e sistema de aquisição de dados com *software* Empower®.

As condições cromatográficas utilizadas foram:

- Temperatura do forno da coluna cromatográfica em 33°C
- Fluxo da fase móvel a 0,8mL/minuto
- Volume de injeção de 15µL
- Tempo de análise de 28 minutos
- Gradiente de eluição com as fases móveis A) Metanol e B) Éter metil-*terc*-butílico (Tabela 1)

Tabela 1 – Composição gradiente da fase móvel usada nas análises

Tempo Minutos	% Fase A	% Fase B
Inicial	80	20
0,50	75	25
15,00	15	85
15,05	10	90
16,50	10	90
16,55	80	20
28,00	80	20

3.1.3 Ampolas e sistema de selagem

O armazenamento dos padrões cromatográficos e das amostras não analisadas imediatamente após o preparo foi feito em ampolas de borosilicato seladas sob vácuo.

Para a selagem das ampolas foi utilizado o sistema de selagem montado no laboratório de cromatografia líquida da Embrapa Agroindústria de Alimentos. O sistema consiste de conexões com mangueiras plásticas para as ampolas (que permitem a opção de aplicação de vácuo ou nitrogênio), um maçarico alimentado com GLP/ar comprimido e um sistema de exaustão de gases (Figura 20).

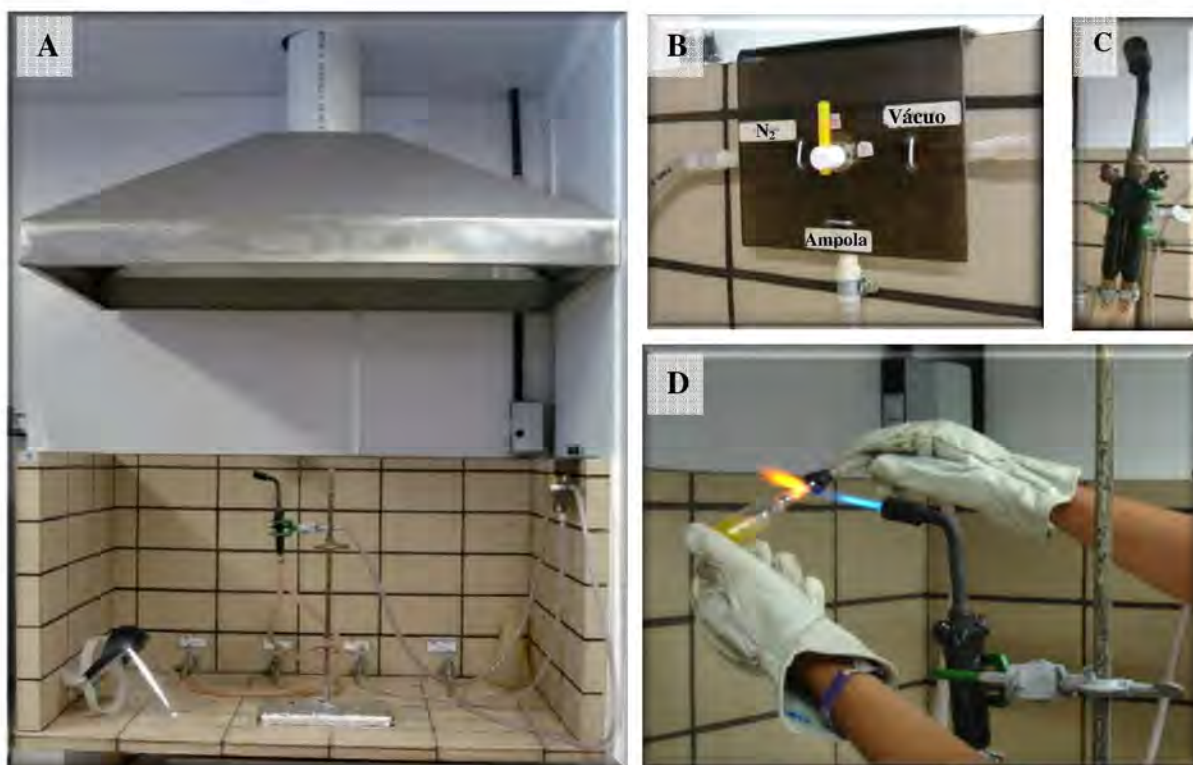


Figura 20 – Sistema de selamento de ampolas do laboratório da Embrapa Agroindústria de Alimentos. **A**-Visão geral, **B**- Seletor N₂/vácuo, **C**-Maçarico e **D**- Ampola sendo selada.

Para o selamento, as ampolas foram conectadas à mangueira com o auxílio de um adaptador de borracha e em seguida alterna-se dez vezes a aplicação de vácuo e nitrogênio, de modo a garantir a completa remoção do oxigênio do interior da ampola. Por fim a ampola é mantida sob vácuo enquanto ocorre o selamento por aquecimento do vidro na chama do maçarico.

3.2 Métodos

A metodologia analítica para a análise e preparação dos padrões cromatográficos dos carotenóides pode ser resumida no seguinte fluxograma:

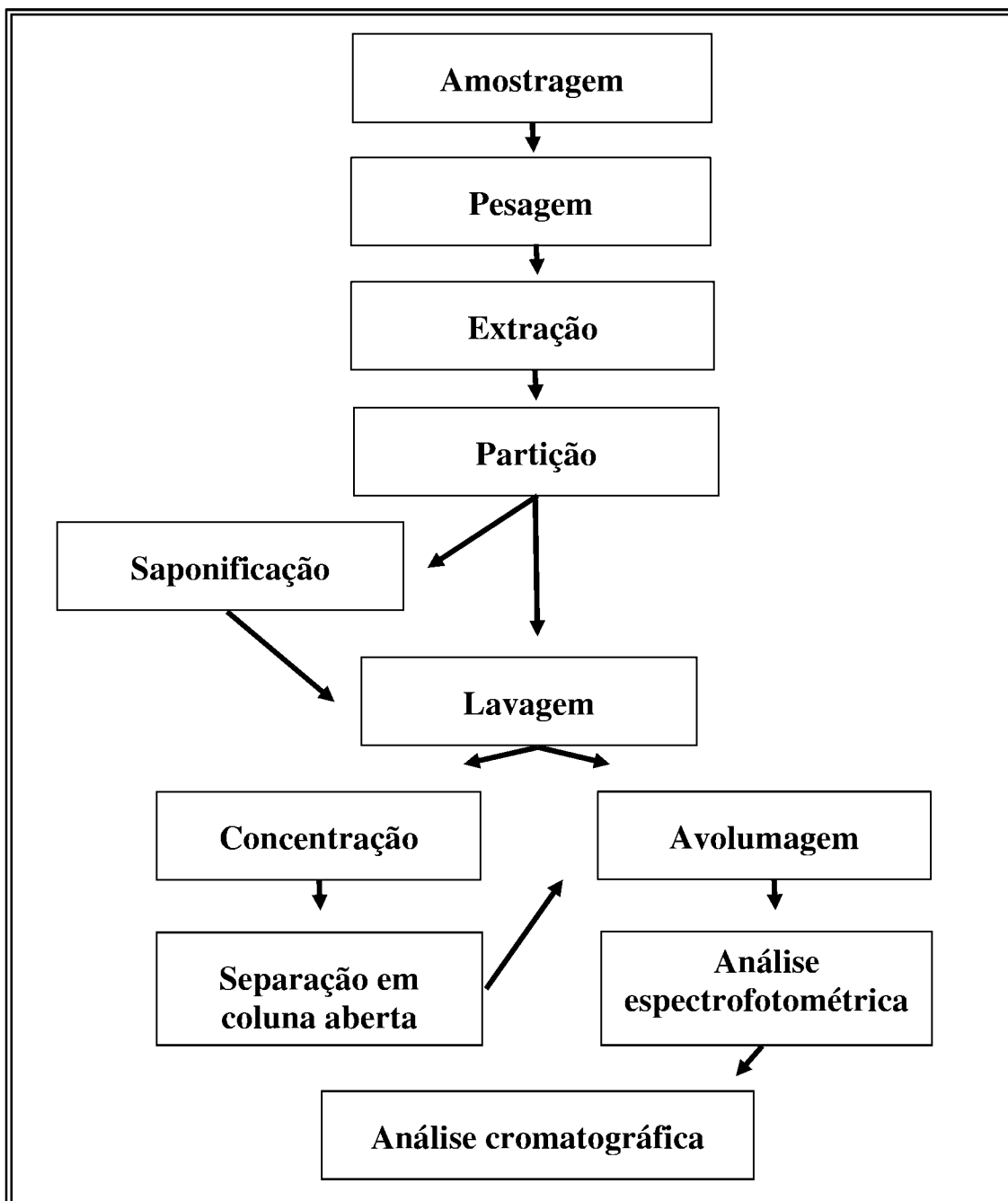


Figura 21 – Fluxograma para a análise de carotenóides e preparação de padrões cromatográficos.

3.2.1 Extração dos carotenóides

A extração dos carotenóides foi realizada segundo Rodriguez-Amaya (2001). Basicamente consistiu em descascar a matriz, quando necessário e em seguida triturar em mixer vertical até a obtenção de uma massa homogênea. Uma fração de 1-15g, conforme teor aparente de carotenóides, foi então pesada em balança analítica.

A porção pesada foi transferida para graal de porcelana e adicionou-se uma medida de celite (3g) com o auxílio do dosador de celite.

O solvente utilizado para a extração dos carotenóides foi acetona resfriada (4°C) em volume suficiente para cobrir a mistura (20 a 50mL).

Em seguida, foi realizada a maceração com pistilo e a mistura obtida foi então filtrada a vácuo em funil de vidro com placa sinterizada conectado a kitassato de 500mL.

O sólido retido foi então retornado ao graal e nova extração realizada com outra porção de acetona resfriada. Este processo foi repetido até que não houvesse mais a percepção da cor característica dos carotenóides na matriz. Em geral foram necessárias três a cinco repetições.

O extrato líquido recolhido no kitassato foi então transferido lentamente para funil de separação de 250mL já contendo 40-50mL de éter de petróleo. A mistura foi então lentamente lavada com 200-300mL de água ultrapura e a fase inferior, aquosa, foi então descartada.

Sucessivas lavagens com água foram realizadas até que não fosse mais perceptível o cheiro característico de acetona na água de descarte. Normalmente 3 a 4 lavagens foram suficientes e no caso da formação de emulsão adicionou-se 20-30mL de solução concentrada de cloreto de sódio.

O extrato etéreo foi então filtrado através de funil de vidro raiado contendo uma camada de aproximadamente 3cm de sulfato de sódio anidro. O filtrado foi recolhido em balão âmbar de fundo redondo de 250mL, para posterior concentração em evaporador rotativo, ou em balão volumétrico para determinação espectrofotométrica (Figura 21).

3.2.2 Saponificação dos extratos de carotenóides

Quando necessário, procedeu-se a saponificação da amostra após a extração. Este procedimento faz-se necessário quando a amostra contém lipídios ou os carotenóides nela presentes estejam esterificados. Para verificação da necessidade de saponificação é feita uma injeção cromatográfica prévia para avaliar o perfil dos carotenóides presentes.

Para o procedimento de saponificação o extrato etéreo foi transferido para erlenmeyer âmbar de 125mL com tampa, adicionou-se então solução de saponificação em igual volume do extrato.

O frasco foi purgado com nitrogênio para remoção da atmosfera oxidante e adicionou-se BHT, em quantidade suficiente para atingir a concentração aproximada de 0,1%. O frasco foi então fechado e deixado ao abrigo da luz por aproximadamente 16 horas.

Após o tempo de reação, a mistura foi transferida para funil de separação de 250mL e a fase superior (etérea) separada e reservada em béquer de 100mL. A fase inferior foi lentamente retornada ao funil de separação contendo 30-40mL de éter etílico e lavada com água ultrapura, conforme procedimento descrito anteriormente. O procedimento de lavagem foi repetido mais três vezes para completa remoção da base.

A fase etérea (que estava reservada) foi então misturada à solução lavada e retornada ao funil de separação para mais quatro operações de lavagem com água ultrapura.

O extrato obtido foi filtrado através de funil de vidro contendo sulfato de sódio anidro e recolhido em balão de fundo redondo âmbar de 250mL, para posterior concentração em evaporador rotativo, ou em balão volumétrico para determinação espectrofotométrica.

3.2.3 Concentração e análise de carotenóides totais e perfil cromatográfico

Quando o objetivo da extração dos carotenóides era a preparação de padrões cromatográficos, o extrato foi transferido para balão de fundo redondo. Em seguida levado ao evaporador rotativo para redução de volume até atingir 2-3mL. A evaporação foi realizada sob vácuo e cuidado foi tomado para que a temperatura do banho não ultrapassasse 35°C.

Quando o objetivo da extração era a determinação de carotenóides totais, o extrato foi transferido para balão volumétrico âmbar de 25, 50 ou 100mL. Conforme a concentração aparente dos carotenóides na solução. O volume do balão foi então aferido com éter de petróleo e conduzido para determinação espectrofotométrica.

Para a determinação dos carotenóides totais, a absorvância da solução etérea foi lida em espectrofotômetro usando-se éter de petróleo como “branco”. O comprimento de onda utilizado foi 450nm.

O valor da leitura de absorvância deve sempre estar dentro da faixa de linearidade do espectrofotômetro que é de 0,2 a 0,8. No caso da absorvância estar com valor superior a 0,8, a solução foi diluída com éter de petróleo até que o valor estivesse dentro da faixa. No caso de valor inferior a 0,2, a extração foi repetida usando-se massa maior de amostra ou balão volumétrico de menor capacidade.

A concentração de carotenóides totais (em microgramas por 100 gramas de amostra) foi determinada conforme a equação da Figura 22.

$$\text{Concentração } (\mu\text{g}/100\text{g}) = \frac{\text{Abs.} \times \text{Dil.} \times \text{Vol.} \times 10000}{2592 \times \text{ma.}}$$

Onde:

- Abs.** = valor da leitura de absorvância
- Dil.** = diluição do extrato (quando usada para faixa de linearidade)
- Vol.** = volume do balão volumétrico utilizado (mL)
- ma.** = massa da amostra (g)

Figura 22 – Equação para o cálculo do valor de carotenóides totais

Na determinação cromatográfica dos carotenóides, uma alíquota de 0,5 a 2mL do extrato etéreo foi transferida para vial âmbar de 3mL. O valor da alíquota foi escolhido de acordo com o valor da concentração dos carotenóides totais, de tal modo que a resposta cromatográfica fique dentro da faixa de trabalho usada na curva de calibração (3.2.5).

O solvente foi então removido sob fluxo de nitrogênio até à secura. Ao resíduo foram adicionados 100µL de acetona e o vial foi então agitado em vórtex durante 10 segundos. Com auxílio de pipetador automático, a solução obtida foi transferida para vial com redutor de volume e realizou-se a análise cromatográfica.

3.2.4 Preparação dos padrões cromatográficos

A maior dificuldade na análise de carotenóides está na obtenção e conservação dos padrões cromatográficos. Os carotenóides são substâncias reativas, por isto devem ser mantidos sob baixas temperaturas, sob atmosfera inerte e ao abrigo da luz (KIMURA & RODRIGUEZ-AMAYA, 2002).

Aliado a isso, nem todos os carotenóides presentes em alimentos estão disponíveis comercialmente e quando disponíveis dependem de importação. A importação de reagentes, com os níveis de pureza exigidos para as calibrações, apresenta alto custo e não há ainda garantias de entrega sob as condições adequadas de armazenamento. Infelizmente, é uma realidade que pode comprometer todo o trabalho analítico.

Desta maneira, todos os padrões necessários para a elaboração deste trabalho foram preparados no próprio laboratório. Diversas fontes naturais foram avaliadas, com o objetivo de obterem-se padrões com as purezas exigidas pela técnica e em quantidade suficiente.

3.2.4.1 Preparação da coluna cromatográfica aberta

Para a preparação das colunas cromatográficas abertas, onde foram isolados os padrões, volumes iguais de óxido de magnésio e celite foram misturados, homogeneizados e então mantidos em estufa a 110°C durante quatro horas para ativação.

Após esfriar em dessecador a mistura foi transferida, com auxílio de funil para sólidos, para coluna de vidro até atingir aproximadamente dois terços de sua altura.

Com o auxílio de uma rolha furada de borracha, a coluna foi conectada a um kitassato de 250mL. Após o estabelecimento de vácuo no sistema, foi adicionado ao topo da coluna sulfato de sódio anidro suficiente para formar uma camada de um centímetro. A coluna foi mantida sob vácuo para uma melhor compactação durante uma hora, neste intervalo foram dadas pequenas batidas, com bastão de vidro revestido de borracha, para ajudar na compactação (Figura 23).



Figura 23 – Montagem da coluna aberta de vidro para separação dos padrões cromatográficos.

3.2.4.2 Aplicação e eluição na coluna aberta

Para a aplicação do extrato etéreo com os carotenóides concentrados (item 3.2.3), o vácuo foi desconectado do kitassato e com auxílio de um pipetador automático o volume total do extrato foi cuidadosamente aplicado no topo da coluna, sobre a camada de sulfato de sódio.

Após a completa absorção do líquido, o vácuo foi lentamente religado e adicionou-se então éter de petróleo para iniciar a eluição. O vácuo foi ajustado de modo a permitir um fluxo constante da fase móvel, mantendo um gotejamento da coluna de aproximadamente duas gotas por segundo a fase móvel foi adicionada constantemente de modo a não permitir a secagem do topo da coluna.

A eluição foi realizada conforme a composição dos carotenóides presentes na matriz, iniciando com éter de petróleo e em seguida, caso necessário, realizando gradiente crescente de acetona em éter de petróleo, sempre em alíquotas de 50mL. As condições específicas para cada matriz e carotenóide de interesse serão descritas nos resultados.

Após a separação da banda do carotenóide(s) de interesse na coluna, esta foi recolhida em kitassato de 125mL ao eluir.

Em alguns casos, de eluição demorada ou para evitar o alto consumo de fase móvel, a coluna foi removida do vácuo e a banda(s) cuidadosamente raspada(s) com auxílio de uma espátula de aço inox, sempre desprezando-se o início e o final de cada banda a fim de obter a maior pureza possível.

A(s) banda(s) de interesse, quando raspada da coluna, foi transferida para graal de porcelana e extraída da fase estacionária conforme descrito em 3.2.1 (sem a necessidade da adição de celite).

Quando eluída da coluna, a banda dissolvida na fase móvel foi particionada em éter de petróleo, conforme descrito em 3.2.1.

O extrato etéreo do carotenóide isolado foi então transferido para balão volumétrico âmbar de 50-100mL, passando antes através de funil com sulfato de sódio anidro. Foi adicionado ao balão uma massa de BHT suficiente para obter-se a concentração de 0,1%. Por fim, o balão volumétrico foi avolumado com éter de petróleo.

3.2.4.3 Verificação da pureza cromatográfica do padrão isolado

Para ser considerado satisfatório, o padrão isolado deve apresentar pureza mínima de 90%. No caso de obtenção de padrão com pureza inferior, o carotenóide isolado foi descartado ou re-purificado em coluna aberta.

Para a determinação da pureza cromatográfica, uma alíquota de 2mL da solução do carotenóide foi transferida para vial âmbar de 3mL. O solvente foi então removido sob fluxo de nitrogênio até *secura*.

Ao resíduo foram adicionados 100µL de acetona e em seguida o vial foi agitado em vórtex durante 10 segundos. Com auxílio de pipetador automático a solução obtida foi transferida para vial com redutor de volume e levada para análise cromatográfica.

Com o auxílio do software Empower[®] gerou-se o cromatograma do carotenóide isolado. Usou-se a função *MAXPLOT*, onde todos os picos são obtidos no comprimento de onde de absorção máxima da substância. Desta maneira não se superestima a pureza do padrão devido a não visualização de outras substâncias, que possam vir a absorver luz em comprimento de onda máximo diferente. Com exceção do pico referente ao solvente, todos os picos foram integrados.

A área do pico do carotenóide de interesse, em porcentagem relativa à soma das áreas de todos os picos presentes, foi tomada como sendo a pureza cromatográfica do padrão isolado. (Figura 24).

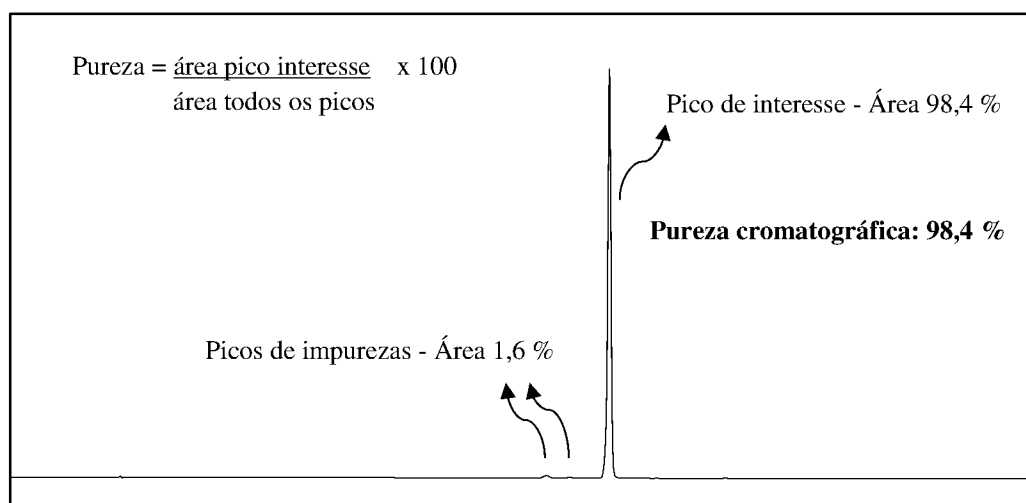


Figura 24 – Exemplo do cálculo da pureza cromatográfica do padrão purificado

3.2.4.4 Quantificação espectrofotométrica do padrão isolado

Os padrões obtidos com pureza satisfatória foram quantificados por espectrofotometria. A absorvância da solução do carotenóide isolado foi determinada em espectrofotômetro, no solvente e no comprimento de onda específico para o carotenóide em questão (Tabela 2).

Da mesma maneira que para as amostras, o valor da absorvância deve estar dentro da faixa de 0,2-0,8. As soluções que apresentaram leituras acima de 0,8 foram então diluídas com o mesmo solvente, até que o valor lido ficasse dentro da faixa.

No caso do solvente apropriado para a leitura não ser o éter de petróleo, uma alíquota de 3mL da solução etérea foi seca sob fluxo de nitrogênio e o resíduo obtido ressuspensionado com 3mL do solvente indicado para a determinação da absorvância (Tabela 2).

Tabela 2 – Valores de absorvidade molar, comprimento de onda e solvente adequados para quantificação dos padrões dos carotenóides (RODRIGUEZ-AMAYA, 2001).

Carotenóide	Solvente	Comprimento de onda	Absortividade molar
		nm	$A_{1\text{cm}}^{1\%}$
Violaxantina	Etanol	440	2550
Luteína	Etanol	445	2550
Zeaxantina	Éter de petróleo	449	2348
Zeinoxantina	Hexano	445	2636
β -criptoxantina	Éter de petróleo	449	2386
α -caroteno	Éter de petróleo	444	2800
β -caroteno	Éter de petróleo	450	2592
Licopeno	Éter de petróleo	470	3450

Para a determinação da concentração do carotenóide isolado e correção desta concentração pela sua pureza cromatográfica foi usada a equação da Figura 25.

$$\text{Concentração } (\mu\text{g/mL}) = \frac{\text{Abs.} \times \text{Dil.} \times 10000}{A_{1\text{cm}}^{1\%}} \times \frac{\text{Purz.}}{100}$$

Abs. = valor da leitura de absorvância
Dil. = diluição do extrato (se usada para faixa de linearidade)
A_{1cm}^{1%} = absortividade molar do carotenóide (Tabela 2)
Purz. = pureza cromatográfica (%)

Figura 25 – Equação para o cálculo da concentração corrigida do carotenóide isolado

3.2.4.5 Armazenamento em ampolas dos padrões isolados

Após a verificação da pureza cromatográfica e quantificação espectrofotométrica do padrão isolado, este foi distribuído em ampolas para armazenamento. O volume da alíquota adicionada em cada ampola foi calculado de modo que cada ampola contivesse um valor fixo de 50µg do carotenóide. Foi adicionado em cada ampola ainda um pequeno cristal do antioxidante BHT. Para o cálculo deste volume foi utilizada a equação da Figura 26.

$$\text{Volume (mL)} = \frac{50}{\text{Concentração } (\mu\text{g/mL})}$$

Figura 26 – Equação para cálculo do volume de solução padrão a ser adicionada na ampola

Para a tomada do volume calculado foram utilizadas pipetadores automáticos com resolução de 0,005mL.

O solvente da alíquota transferida foi então removido sob fluxo de nitrogênio mantendo-se as ampolas em banho de areia com aquecimento a 35°C, para que não ocorresse o resfriamento da ampola e conseqüentemente a condensação de água. Após a completa secagem as ampolas foram imediatamente seladas no sistema de selagem (Figura 20).

Para o armazenamento até o uso, as ampolas foram envolvidas com papel alumínio laminado e mantidas em freezer a -18°C. A figura 26 mostra o aspecto final do carotenóide isolado e cristalizado na ampola. A presença do BHT, adicionado à solução, ajuda na cristalização e na completa secagem do solvente.



Figura 26 – Padrão de carotenóide cristalizado e selado em ampola

3.2.4.6 Preparação de ampolas multi-padrão

Após isolar e preparar ao menos dez ampolas com 50 μ g cada uma com um dos carotenóides de interesse (violaxantina, luteína, zeaxantina, β -criptoxantina, α -caroteno, β -caroteno e licopeno), dez ampolas de cada carotenóide foram retiradas do freezer e abertas para o preparo de uma solução multi-padrão.

O sólido de cada uma das 70 ampolas foi então ressuscitado com éter de petróleo e então transferido quantitativamente para balão volumétrico de 200mL. As ampolas foram rinsadas com acetona e as soluções transferidas ao mesmo balão. O balão volumétrico foi então avolumado com éter de petróleo.

A solução resultante no balão volumétrico continha exatamente 500 μ g de cada carotenóide. Desta maneira, a concentração final da solução era de 2,5 μ g/mL de cada carotenóide.

Para a elaboração das ampolas multi-padrão, alíquotas de dois mililitros da mistura obtida foram transferidas, com pipetador automático, para aproximadamente 100 ampolas. O solvente então foi removido sob fluxo de nitrogênio em banho de areia (35°C).

As ampolas foram imediatamente seladas, envolvidas com papel alumínio laminado e mantidas em freezer (-18°C) até o seu uso. Deste modo cada ampola multi-padrão obtida continha 5 μ g de cada um dos sete padrões preparados.

3.2.5 Otimização do método analítico e construção da curva de calibração

Com a análise da mistura multi-padrões foi possível fazer o ajuste do método de análise, sendo otimizadas as condições analíticas de temperatura da coluna, fluxo da fase móvel e o gradiente de eluição.

Para a construção das curvas de calibração, uma ampola multi-padrão foi aberta e a mistura de carotenóides ressuscitada com um mililitro de acetona.

Após agitação em vórtex para completa solubilização, alíquotas da solução foram quantitativamente retiradas com pipetador automático, conforme Tabela 3, e transferidas para vials de 1,8mL. Cada alíquota representa um ponto da curva de calibração e apresenta uma quantidade conhecida de todos os sete carotenóides.

O solvente dos vials foi então evaporado, sob fluxo de nitrogênio e o sólido de cada vial ressuscitado com 100 μ L de acetona. Após agitação em vórtex, os 100 μ L de cada um

dos sete vials foram cuidadosamente transferidos para redutor de volume. Por fim, os vials contendo os redutores de volume foram levados para análise cromatográfica.

Cada ponto da curva de calibração foi injetado em triplicata, de modo a obter a construção da curva de calibração externa dos sete carotenóides com uma faixa de trabalho de sete pontos em triplicata.

Tabela 3 – Volumes das alíquotas retiradas da ampola multi-padrão e concentração final dos pontos da curva de calibração.

Ponto da Curva de calibração	Volume da alíquota μL	Concentração final $\mu\text{g/mL}$
1	10	0,5
2	30	1,5
3	50	2,5
4	70	3,5
5	100	5,0
6	130	6,5
7	160	8,0

3.2.6 Teste de estabilidade dos padrões cromatográficos

Devido ao fato dos carotenóides serem compostos capazes de serem degradados pelo oxigênio, calor e pela luz, foi realizado um estudo de estabilidade dos padrões preparados.

Para o estudo de estabilidade dos padrões, sob diferentes formas de armazenamento, foram utilizadas 90 ampolas multi-padrão, preparadas conforme descrito anteriormente (3.2.4.6). As ampolas foram divididas em 5 grupos de modo a ser avaliado o efeito de cada um dos agentes de degradação (oxigênio, luz e temperatura).

O primeiro grupo ficará sobre o efeito do oxigênio, da luz e em temperatura ambiente, o segundo estará na ausência de oxigênio, porém sob o efeito da temperatura e da luz. Deste modo, com a comparação dos resultados dos grupos 1 e 2 será possível a avaliação do efeito do oxigênio na estabilidade dos carotenóides. O terceiro grupo estará na ausência de oxigênio e luz, apenas sob o efeito da temperatura ambiente, sendo possível através da comparação com os resultados do grupo 2, a avaliação do efeito da luz. O quarto grupo, também na ausência de oxigênio e luz estará sob refrigeração, deste modo será possível a avaliação do efeito da redução de temperatura por comparação com os resultados do grupo 3. Por fim, o último grupo estará sob menor temperatura para a avaliação da estabilidade dos carotenóides sob as melhores condições de armazenamento disponíveis no laboratório.

- Grupo 1 –** As ampolas deste grupo foram mantidas abertas e sem refrigeração. Sob ação da temperatura ambiente, da luz e na presença de oxigênio.
- Grupo 2 –** As ampolas deste grupo foram seladas a vácuo, mas mantidas sem refrigeração. Sob ação da temperatura ambiente e da luz.
- Grupo 3 –** As ampolas deste grupo foram seladas a vácuo, mantidas sem refrigeração e no escuro. Sob ação da temperatura ambiente.
- Grupo 4 –** As ampolas deste grupo foram seladas a vácuo, mantidas sob refrigeração (4°C) e no escuro.
- Grupo 5 –** As ampolas deste grupo foram seladas a vácuo, mantidas em freezer (-18°C) e no escuro.

No dia do preparo, uma ampola foi aberta e o resíduo dissolvido com 1mL de acetona, a análise cromatográfica desta ampola foi denominada “dia zero”. No terceiro dia de armazenamento, uma ampola de cada grupo foi aberta, do mesmo modo o resíduo dissolvido com 1mL de acetona e levado para determinação cromatográfica. Análises subseqüentes foram realizadas com as ampolas de cada grupo de modo que o tempo mínimo do estudo foi de 120 e o máximo 370 dias após o “dia zero”. Ampolas remanescentes do grupo 5 ainda foram mantidas nas condições descritas para a continuidade do estudo após o término deste trabalho.

Sabe-se que a resposta do detector varia com o tempo, o que pode ser explicado pelo envelhecimento da lâmpada e conseqüente diminuição de sua energia emitida. Por esta razão uma solução de acenafteno (5mg/mL) em acetonitrila foi preparada, a fim de acompanhar a resposta do detector. A solução foi armazenada em freezer e analisada juntamente com cada lote de análise das ampolas do estudo de estabilidade.

Juntamente com todos os grupos de ampolas foi mantido um termômetro calibrado de registro de temperatura máxima e mínima, a fim de registrar as variações de temperatura pela qual cada grupo foi exposto.

3.2.7 Parâmetros de validação da metodologia analítica

Com base nas orientações do documento orientativo “Orientação sobre validação de métodos de ensaios químicos” de junho de 2007, do Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO), foi elaborado um protocolo de validação com base nas características da análise cromatográfica de carotenóides. Os seguintes parâmetros de validação foram estudados:

3.2.7.1 Especificidade e seletividade

Quando um método analítico avalia apenas um analito diz-se que ele é específico. A avaliação do pH de uma solução, por exemplo, é uma determinação específica.

O método cromatográfico de detecção e quantificação dos carotenóides, cujos padrões foram preparados, é capaz de distinguir a resposta de cada um dos carotenóides, mesmo quando a amostra é constituída por uma mistura deles. Neste caso, diz-se que o método é seletivo e este foi o parâmetro avaliado.

Avaliar a seletividade de um método é verificar se a resposta obtida é devida ao analito de interesse e não aos interferentes.

O efeito mais importante, que afeta a seletividade de um método, é o que se chama “efeito de matriz”. Trata-se de interferências que podem ser provocadas por substâncias diversas presentes na matriz estudada, de modo que podem ocorrer alterações na resposta da análise para as substâncias de interesse.

No caso específico da análise de carotenóides, por cromatografia líquida, o mais comum é ocorrerem coeluições destes interferentes com os analitos de interesse. Neste caso, a resposta à concentração seria superestimada, pois o resultado obtido seria a soma das concentrações do analito com o(s) interferente(s).

O efeito de matriz é avaliado, geralmente, através da adição dos analitos à matriz estudada com posterior comparação da concentração obtida com a concentração teórica. Outra maneira é através do uso de amostras de referência, onde os teores dos analitos sejam conhecidos. No entanto, amostras de referência para análise de carotenóides são discutíveis, já que os carotenóides não são substâncias estáveis.

Por não existirem amostras de referência para este estudo, a seletividade foi avaliada através da análise dos resultados nas matrizes mais comumente analisadas. Isto se deu através da comparação dos valores de tempo de retenção e dos espectros de UV/Vis, característicos de cada carotenóide, com os tempos de retenção e espectros dos padrões puros preparados.

Caso não existam diferenças significativas entre os tempos de retenção e espectros, será possível dizer que o método de extração e determinação de carotenóides, para as matrizes avaliadas, é seletivo e não sofre influencia de matriz.

As matrizes usadas para a avaliação da seletividade estão descritas na Tabela 4.

Tabela 4 – Matrizes utilizadas para o teste de seletividade (LORENZI, 2002; LORENZI, *et al.*, 2006).

nome comum	nome científico	parte utilizada
abóbora	<i>Cucurbita moschata</i> L.	polpa do fruto
açaí	<i>Euterpe oleracea</i> Mart.	polpa do fruto
acerola	<i>Malpighia glabra</i> L.	polpa do fruto
batata doce	<i>Ipomoea batatas</i> (L.) Lam.	raiz
buriti	<i>Mauritia flexuosa</i> L. f.	polpa do fruto
cajá mirim	<i>Spondias mombin</i> L.	polpa do fruto
caju	<i>Anacardium occidentale</i> L.	polpa do fruto
caqui	<i>Diospyros kaki</i> L.	polpa do fruto
cenoura	<i>Daucus carota</i> L.	raiz
espinafre	<i>Spinacia oleracea</i> L.	folhas
goiaba vermelha	<i>Psidium guajava</i> L.	polpa do fruto
jaca	<i>Artocarpus heterophyllus</i> Lam.	polpa do fruto
laranjinha de jardim	<i>Solanum pseudocapsicum</i> L.	polpa do fruto
mamão	<i>Carica papaya</i> L.	polpa do fruto
mandioca amarela	<i>Manihot esculenta</i> Crantz.	raiz
manga	<i>Mangifera indica</i> L.	polpa do fruto
maracujá	<i>Passiflora edulis</i> f. <i>falvicarpa</i>	polpa do fruto
melancia	<i>Citrullus vulgaris</i> Schrad.	polpa do fruto
melão de São Caetano	<i>Mormodica charantia</i> L.	arilo das sementes
milho verde	<i>Zea mays</i> L.	sementes
pimentão amarelo	<i>Capsicum annuum</i> L.	polpa do fruto
pimentão vermelho	<i>Capsicum annuum</i> L.	polpa do fruto
pupunha	<i>Bactris gasipaes</i> Kunth.	polpa do fruto
tangerina	<i>Citrus reticulata</i> Blanco	polpa do fruto
tomate	<i>Solanum lycopersicum</i> L.	polpa do fruto
tucumã	<i>Astrocaryum aculeatum</i> G. Meyer	polpa do fruto

3.2.7.2 Linearidade

A linearidade é a habilidade de um método analítico em produzir resultados que sejam diretamente proporcionais à concentração do analito, em uma dada faixa de concentração. A linearidade é obtida por padronização interna ou externa e formulada como expressão matemática usada para o cálculo da concentração do analito a ser determinado na amostra real (INMETRO 2007).

A linearidade foi obtida através dos resultados da curva de calibração para os sete carotenóides, construída conforme 3.2.5. Os valores relevantes para a avaliação da linearidade são: os valores dos coeficientes de correlação linear (r^2) que devem ser superiores a 0,95, as equações das retas e os gráficos de resíduos que não devem apresentar tendências.

3.2.7.3 Faixa de trabalho e faixa linear de trabalho

A faixa linear de trabalho de um método de ensaio é o intervalo entre os níveis inferior e superior de concentração do analito no qual foi demonstrado ser possível a determinação com a precisão, exatidão e linearidades exigidas, sob as condições especificadas para o ensaio. A faixa linear é definida como a faixa de concentrações na qual a sensibilidade pode ser considerada constante e é normalmente expressa nas mesmas unidades do resultado obtido pelo método analítico (INMETRO 2007).

A faixa de trabalho foi definida no item 3.2.5 e compreende sete pontos de concentração que variam de 0,5 a 8,0 $\mu\text{g/mL}$ (Tabela 3).

Em geral, a faixa de trabalho é determinada pela concentração média das amostras analisadas, no entanto, no caso particular da análise de carotenóides, a amostra pode ser ajustada de modo que o resultado obtido fique dentro da faixa de trabalho escolhida. Os ajustes para que isto ocorra são e podem ser realizados em três etapas da análise:

Na pesagem - A massa de amostra utilizada varia de acordo com o teor aparente (cor) de concentração dos carotenóides na amostra (3.2.1).

Na diluição - A escolha do volume do balão volumétrico utilizado para a avolumagem final é feito de modo que a leitura de absorvância fique dentro da faixa de linearidade do espectrofotômetro de 0,2 a 0,8 (3.2.3).

Na concentração - O volume da alíquota usada para a preparação da amostra a ser injetada no sistema cromatográfico é ajustado de modo que os valores de concentração dos analitos fiquem dentro da faixa de trabalho utilizada (3.2.5).

3.2.7.4 Sensibilidade

A sensibilidade é um parâmetro que demonstra a variação da resposta em função da concentração do analito. Ela pode ser expressa pela inclinação da reta de regressão da curva de calibração (INMETRO 2007). A sensibilidade para os sete carotenóides foi calculada a partir dos dados das curvas de calibração, de acordo com a equação da Figura 28.

$$S = \frac{dx}{dc}$$

Onde:
S = sensibilidade
dx = variação da resposta
dc = variação da concentração

Figura 28 – Equação para o cálculo da sensibilidade

Os dados utilizados para o cálculo da sensibilidade foram as médias das respostas (dx) dos padrões dos níveis 3 e 5.

3.2.7.5 Limite de detecção

Quando são realizadas medidas em amostras com baixos níveis do analito, como por exemplo análise de traços, é importante saber qual o menor valor de concentração do analito que pode ser detectado pelo método.

O limite de detecção do equipamento (LDE) é definido como a concentração do analito que produz um sinal de três a cinco vezes a razão sinal/ruído do equipamento. O limite de detecção do método (LD) é definido como a concentração mínima de uma substância medida e declarada com 95% ou 99% de confiança de que a concentração do analito é maior que zero (INMETRO 2007).

Apesar da análise de carotenóides não ser uma análise de traços o limite de detecção do equipamento foi estimado.

O valor obtido foi através da análise de diluições sucessivas do padrão de menor concentração da curva de calibração. Chegou-se a concentração mínima dos carotenóides que geraram sinal de 3 a 5 vezes maior que o ruído da linha base.

3.2.7.6 Limite de quantificação

O limite de quantificação (LQ) é a menor concentração do analito que pode ser determinada com um nível aceitável de exatidão e precisão. Na prática corresponde a concentração do padrão de calibração de menor concentração (INMETRO 2007).

3.2.7.7 Exatidão

Exatidão do método é definida como sendo a concordância entre o resultado de um ensaio e o valor de referência aceito como convencionalmente verdadeiro. Os processos normalmente utilizados para avaliar a exatidão de um método são: uso de materiais de referência, participações em comparações interlaboratoriais e realização de ensaios de recuperação (INMETRO 2007).

Novamente, devido às características dos analitos, existe dificuldade em se preparar material de referência. Deste modo, a avaliação da exatidão foi realizada através da adição de quantidades conhecidas de padrão dos carotenóides em uma matriz isenta de carotenóides. A razão entre a concentração teórica e a concentração lida, em porcentagem, é o que se chama de recuperação.

A matriz utilizada foi farinha branca de mandioca, os carotenóides foram adicionados em solução etérea diretamente ao graal de porcelana contendo 5g de farinha. A mistura foi homogeneizada e a extração procedeu-se conforme **3.2.1**. Foram preparadas três concentrações variando-se o volume adicionado da solução etérea de carotenóides. Os carotenóides avaliados foram a zeaxantina, β -criptoxantina, α -caroteno, e β -caroteno. Na Tabela 5 estão as concentrações adicionadas.

Tabela 5 – Concentrações adicionadas à amostra para determinação da recuperação

Carotenóide	Nível adicionado	Concentração teórica ($\mu\text{g/mL}$)
Zeaxantina	1	1,712
	2	5,992
	3	11,128
β-criptoxantina	1	1,983
	2	6,941
	3	12,890
α-caroteno	1	1,849
	2	6,472
	3	12,019
β-caroteno	1	2,079
	2	7,277
	3	13,514

3.2.7.8 Precisão

A precisão avalia a dispersão dos resultados obtidos da análise de amostras ou padrões semelhantes nas condições definidas. As duas formas mais comuns de expressá-la é por meio da repetitividade e a reprodutibilidade, sendo usualmente expressas pelo desvio-padrão (INMETRO 2007).

A precisão foi avaliada através da repetitividade obtida com as injeções das sete concentrações dos pontos da curva de calibração e foi expressa através do coeficiente de variação (CV%).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Preparação dos padrões cromatográficos

O isolamento dos carotenóides é trabalhoso, demanda tempo, prática e tem um consumo alto de solventes orgânicos. No entanto, não é uma metodologia difícil e pode ser realizada em qualquer laboratório de análise sem a necessidade de equipamentos especiais.

4.1.1 Preparação dos padrões de α -caroteno e β -caroteno

A matriz escolhida para o isolamento dos padrões de α -caroteno e β -caroteno foi a cenoura. Sabe-se que esta apresenta altas concentrações de ambos os carotenóides e é de fácil obtenção. Além disso, a cenoura é uma excelente fonte de α -caroteno que é um carotenóide não muito comum de ser encontrado.

A extração dos carotenóides da cenoura foi feita a partir de 15 gramas de massa de cenoura triturada. Como o α -caroteno e o β -caroteno não formam derivados esterificados, não houve necessidade de realizar o procedimento de saponificação.

A separação do α -caroteno e β -caroteno dá-se com eluição em éter de petróleo e após a separação das duas bandas pode-se acelerar a corrida mudando a fase móvel para éter etílico 2% em éter de petróleo.

Além dos carotenóides majoritários, foi possível perceber a separação dos carotenóides luteína, γ -caroteno e fitoflueno presentes em pequenas quantidades (Figura 29). O fitoflueno não é visível sob luz branca, mas apenas com aplicação de luz ultravioleta.

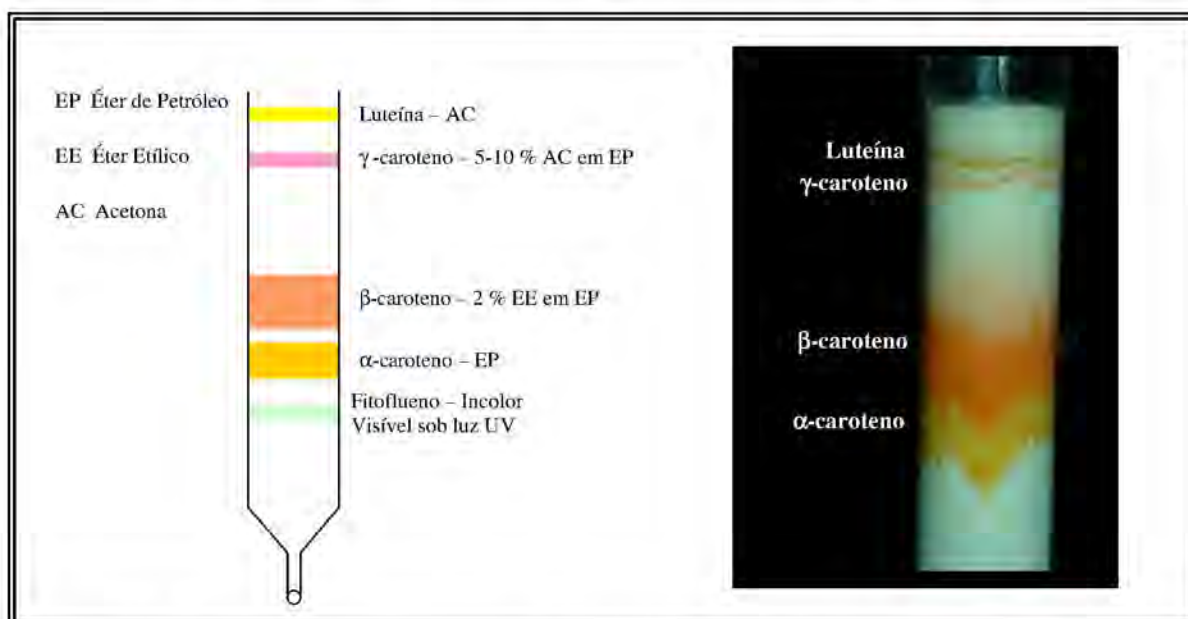


Figura 29 - Esquema e foto do perfil de eluição do α -caroteno e β -caroteno em coluna aberta.

Foi obtido em média, por cada coluna preparada, 250 μ g de α -caroteno e 400 μ g de β -caroteno. No entanto, esses valores sofreram bastante variações de acordo com a matriz utilizada.

As purezas obtidas para os padrões isolados foram 92-98,5% para o α -caroteno e 93-98,4% para o β -caroteno (Figura 30).

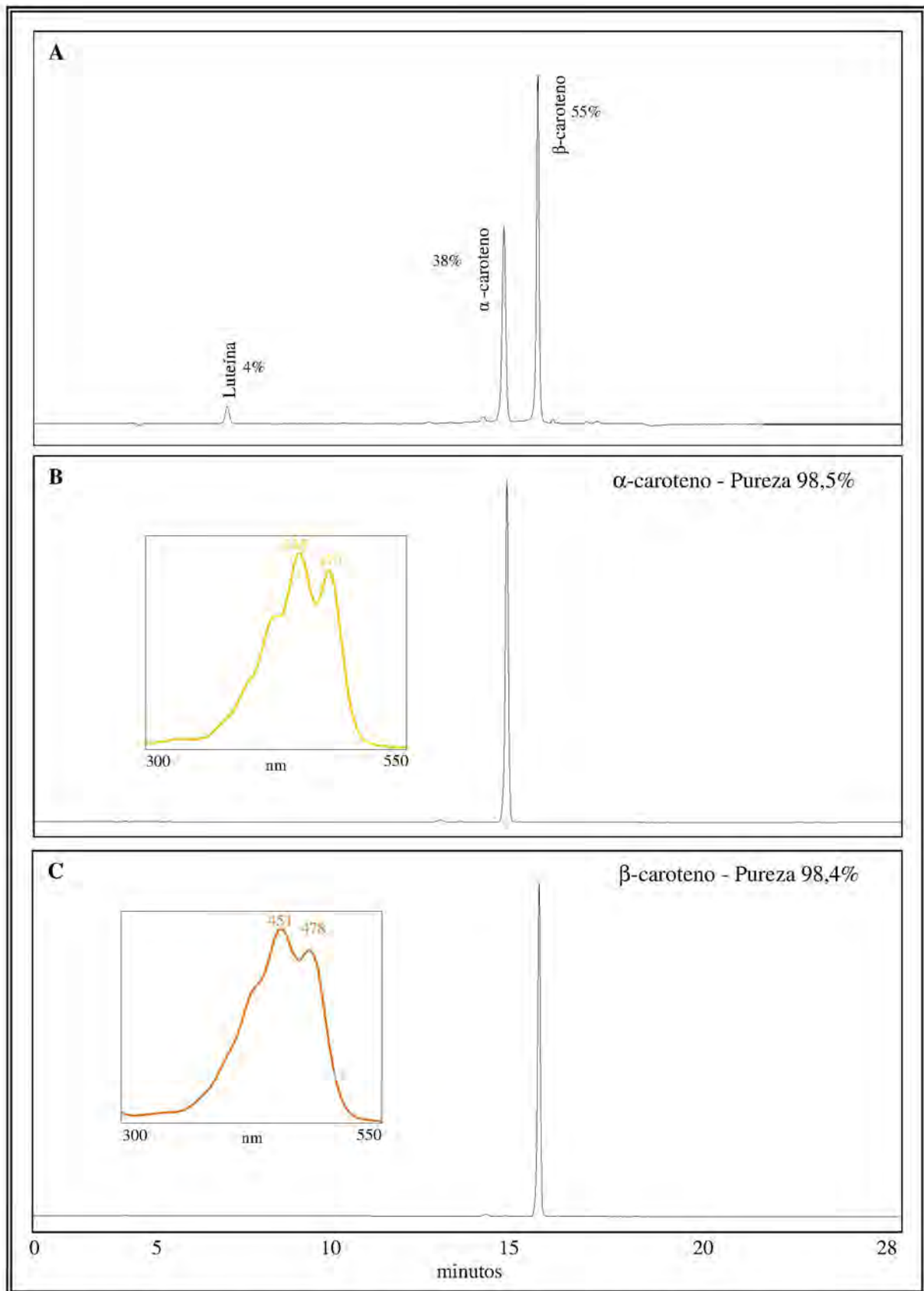


Figura 30 – Cromatogramas e espectros: **A**-perfil dos carotenóides de cenoura, **B**-padrão isolado de α -caroteno e **C**-padrão isolado de β -caroteno.

4.1.2 Preparação dos padrões de luteína e violaxantina

Para o isolamento de luteína e violaxantina foram utilizadas duas matrizes diferentes: folhas de espinafre e pimentão amarelo.

Com o espinafre a extração foi feita a partir de 50 gramas de folhas frescas e o extrato não foi saponificado.

Por serem carotenóides oxigenados, a luteína e a violaxantina são mais polares e conseqüentemente ficam retidos mais fortemente na fase estacionária. Deste modo, foi necessário o uso de um gradiente de eluição (acetona em éter de petróleo). O gradiente consistiu em aumentar a porcentagem de acetona de 0 até 24%, com alíquotas de 50mL e incremento de 2% na concentração da acetona em cada alíquota.

O espinafre contém grandes concentrações de clorofila que ficou fortemente retida na fase estacionária e não interferiu na separação (Figura 31).

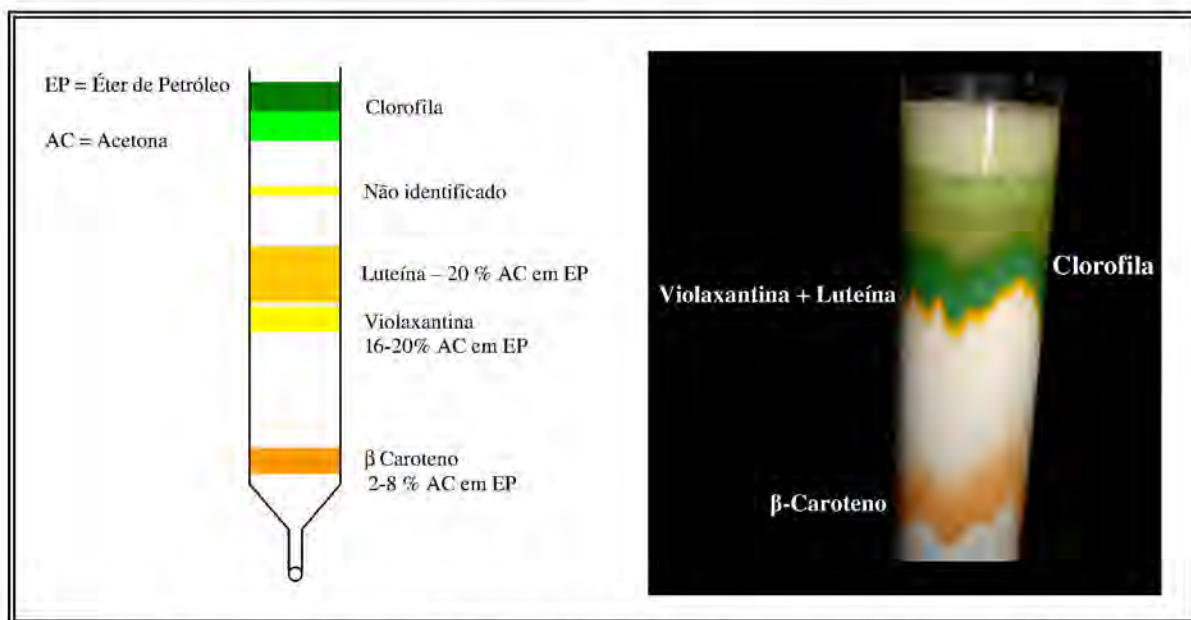


Figura 31 - Esquema e foto do perfil de eluição da violaxantina e luteína em coluna aberta.

Foram obtidos em média, 100µg de violaxantina e 450µg de luteína, para cada coluna preparada.

As purezas obtidas para os padrões isolados foram 95,8-97,6% para a luteína e 96,7-98,5% para a violaxantina (Figura 32).

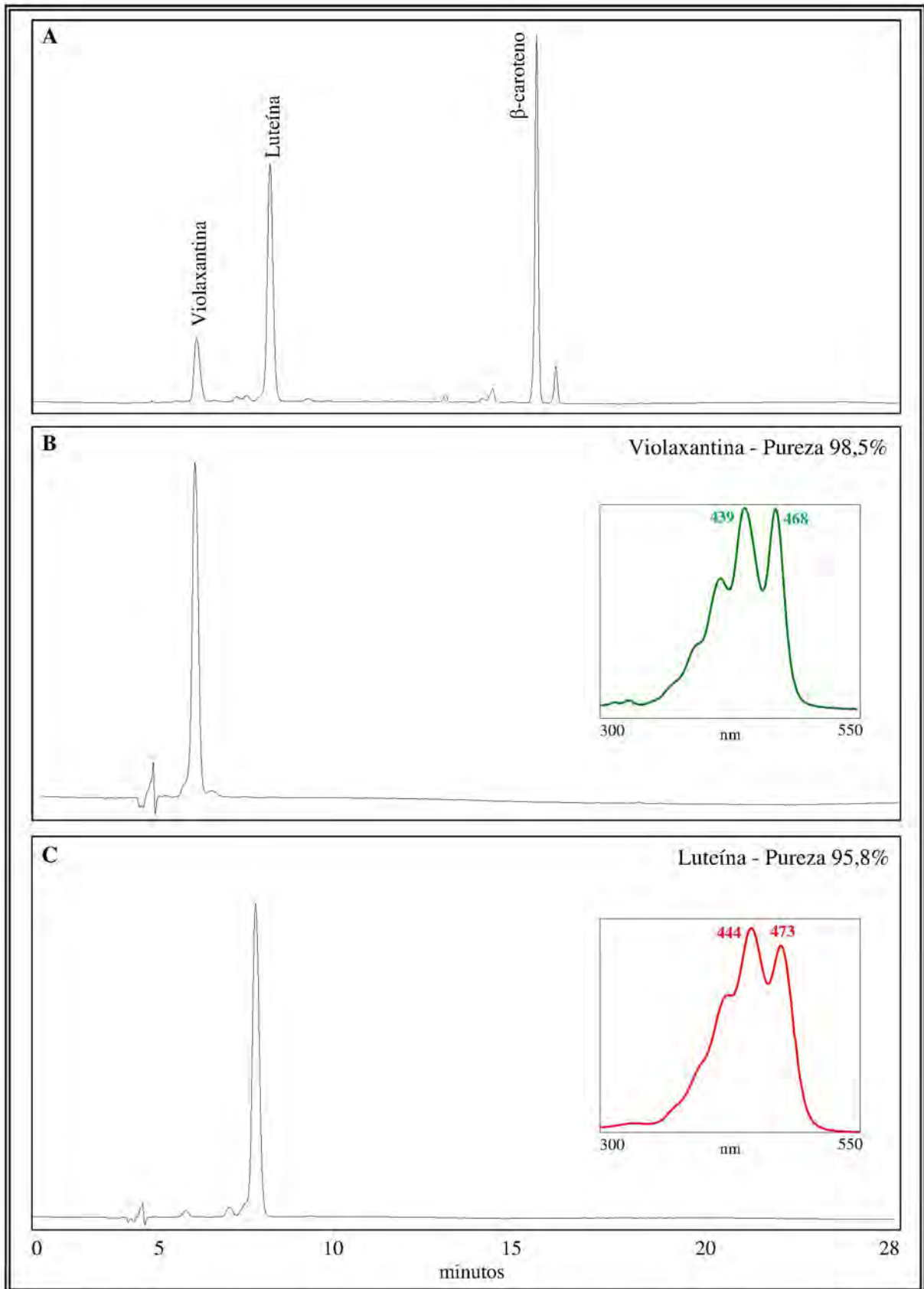


Figura 32 – Cromatogramas e espectros: **A**-perfil dos carotenóides de espinafre, **B**-padrão isolado de violaxantina e **C**-padrão isolado de luteína.

O espinafre apresentou uma concentração relativamente alta de β -caroteno, conforme demonstrou a análise cromatográfica (Figura 32 A). O extrato de espinafre também não contém outros carotenóides com eluição próxima ao β -caroteno em coluna aberta como, por exemplo, o que ocorre na purificação de extrato de cenoura, onde o α -caroteno elui logo a sua frente.

Desta maneira, esperava-se que o espinafre fosse uma ótima fonte para produção de padrão de β -caroteno, porém, o β -caroteno presente no espinafre é de difícil purificação, pois há a presença de isômeros *cis* em coeluição com a forma *trans*.

Isto comprometeu a pureza cromatográfica do isolado obtido (máximo 80,5%), impossibilitando sua utilização como padrão analítico (mínimo 90%) (Figura 33).

A presença dos isômeros *cis* de β -caroteno em vegetais verdes (alface, brócolis e pimentão verde) foi reportado por Burns *et al.*, (2003) ao avaliar qualitativamente e quantitativamente os carotenóides de frutas e vegetais comumente consumidos.

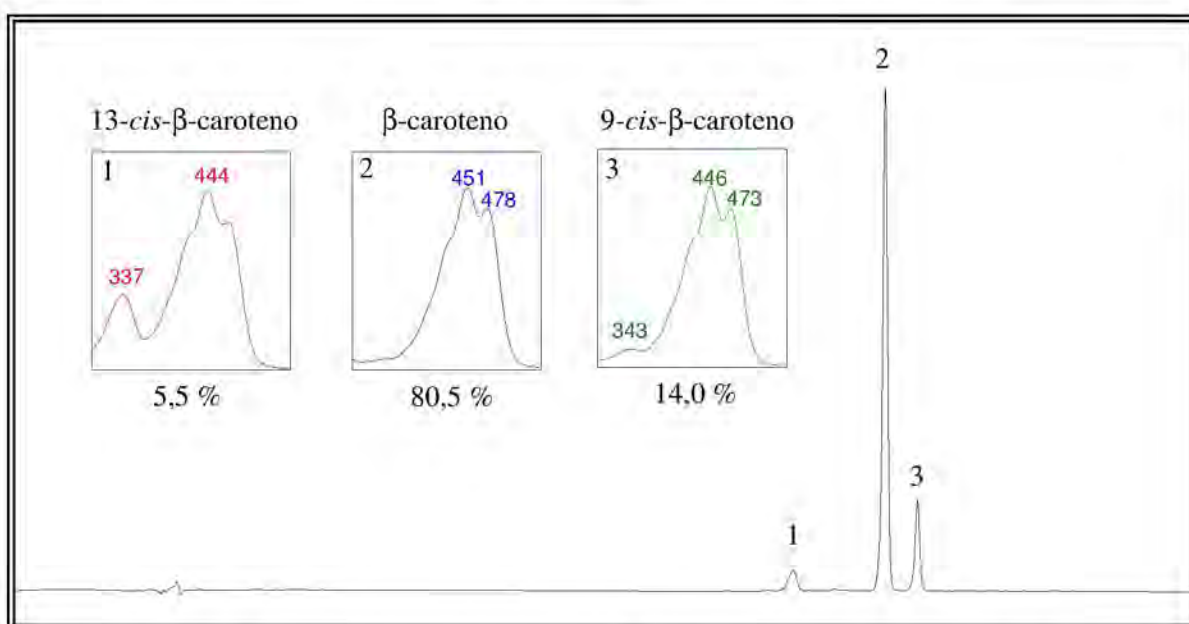


Figura 33 – Cromatograma e espectros de β -caroteno purificado de espinafre.

Apesar do espinafre ter-se mostrado uma excelente fonte de luteína, a concentração de violaxantina não é suficiente para obter uma boa quantidade de padrão deste carotenóide. Por esta razão, também foi usado como fonte de violaxantina o pimentão amarelo.

A extração foi feita a partir de 30 gramas do fruto maduro e o extrato passou pela etapa de saponificação. Do mesmo modo que para o espinafre, foi necessária a utilização de um gradiente de eluição nas mesmas condições usadas na separação dos carotenóides do espinafre (Figura 34).

Obteve-se 630 μ g de violaxantina com apenas uma coluna preparada, com pureza de 96,0% (Figura 35).

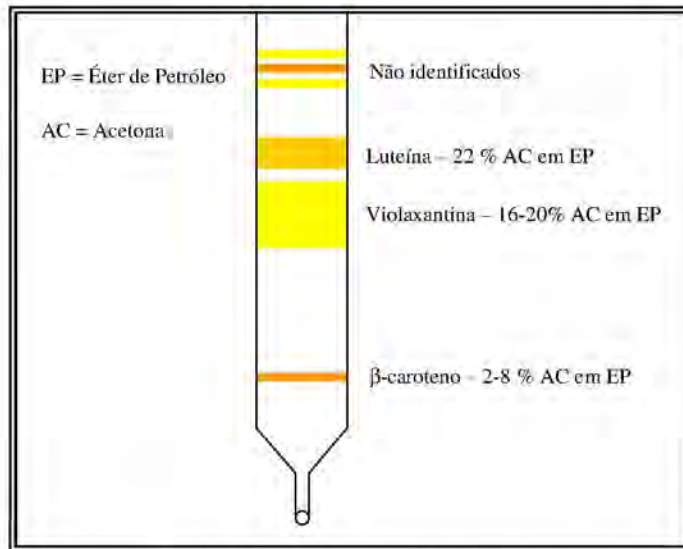


Figura 34 – Esquema do perfil de eluição da separação da violaxantina do pimentão amarelo.

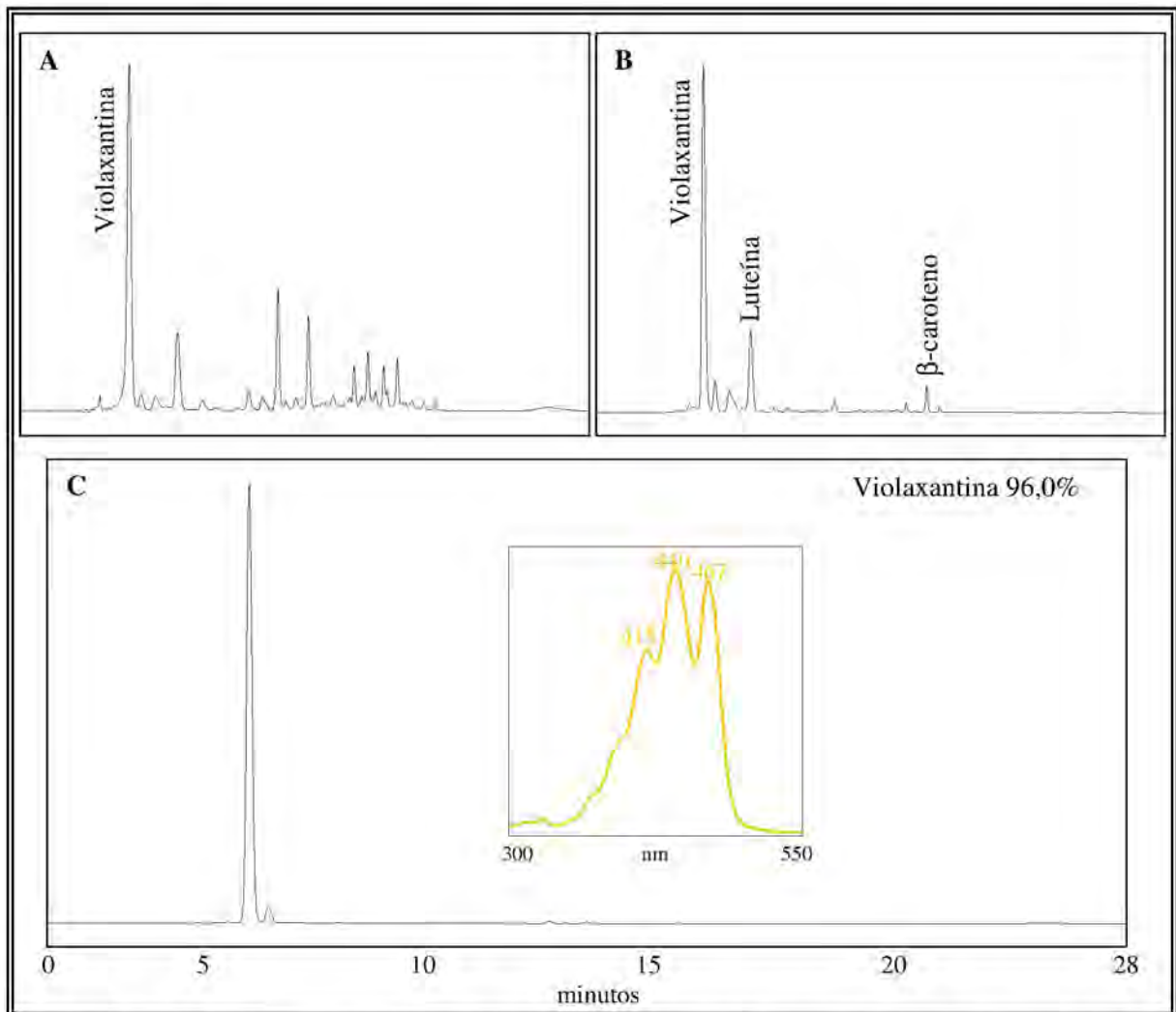


Figura 35 – Perfil cromatográfico do extrato de pimentão amarelo, antes (A) e após (B) saponificação e o padrão de violaxantina purificado (C).

4.1.3 Preparação dos padrões de β -criptoxantina e licopeno

Para o isolamento da β -criptoxantina e licopeno duas matrizes foram usadas: mamão variedade Golden e caqui variedade rama forte. Ambas apresentaram perfil cromatográfico muito semelhante e mostraram-se fontes viáveis para o preparo destes padrões.

No entanto, o caqui rama forte apresentou teores maiores de β -criptoxantina. A desvantagem do caqui como fonte está no fato de ser um fruto sazonal, enquanto o mamão está disponível o ano todo.

A extração foi feita a partir de 50 gramas de caqui rama forte e o extrato foi saponificado. A figura 36 mostra o esquema do gradiente de eluição utilizado.

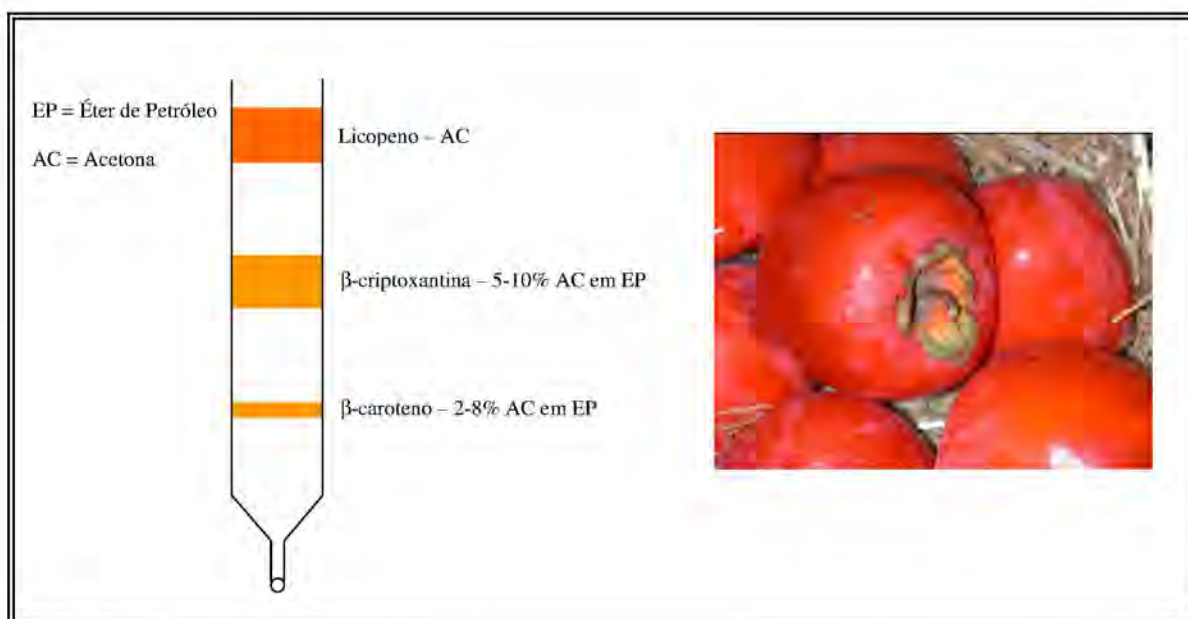


Figura 36 - Esquema do perfil de eluição da separação da β -criptoxantina e licopeno de caqui.

Obteve-se uma média de 300 μ g de β -criptoxantina e 350 μ g de licopeno para cada coluna preparada. A pureza foi de 90,8-92,8% para β -criptoxantina e de 97,5-97,8% para o licopeno (Figura 37).

De acordo com a avaliação dos perfis cromatográficos, o isolamento de licopeno é viável a partir de outras quatro matrizes estudadas: tomate, melancia, goiaba vermelha e melão de São Caetano (*Mormodica charantia* L.).

Os frutos do melão de São Caetano, quando maduros, abrem-se expondo suas sementes de arilo vermelho (Figura 38). No arilo encontra-se o licopeno em concentrações que chegam a 96% da concentração dos carotenóides totais (RODRIGUEZ *et al.*, 1975) (TRAN & RAYMUNDO, 1999). Desta maneira, uma simples extração, sem a necessidade de saponificação ou purificação em coluna aberta, foi suficiente para obter o licopeno em pureza aceitável para uso como padrão cromatográfico.

A concentração do licopeno encontrado no arilo do melão de São Caetano foi de 49,7-55,9mg/100g. Desta maneira, com apenas um fruto maduro retirou-se 1,1g de arilo, suficiente para a obtenção de 600 μ g deste carotenóide (Figura 38).

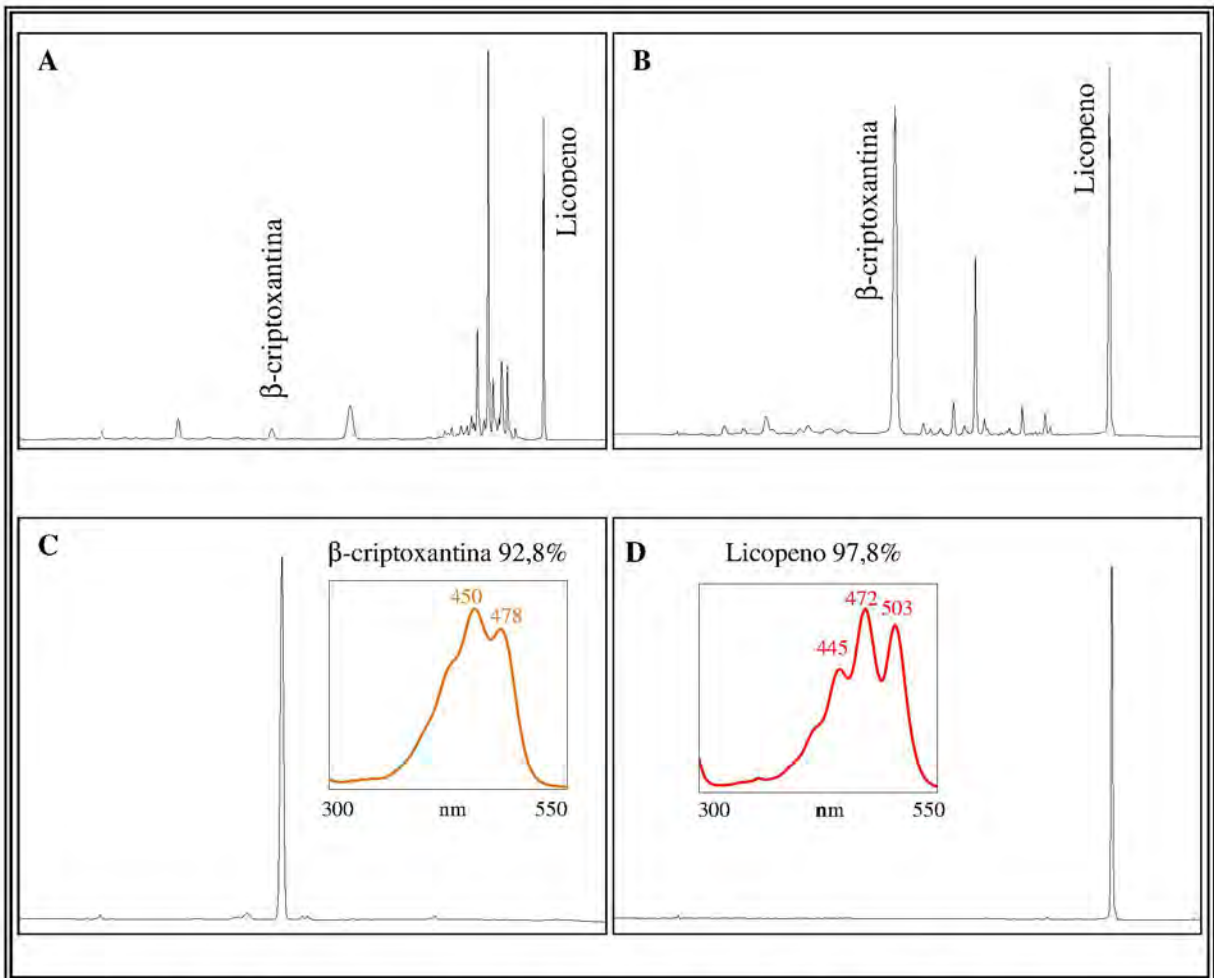


Figura 37 – Perfil cromatográfico do extrato de caqui antes (A) e após (B) saponificação e os padrões purificados de β -criptoxantina (C) e licopeno (D).

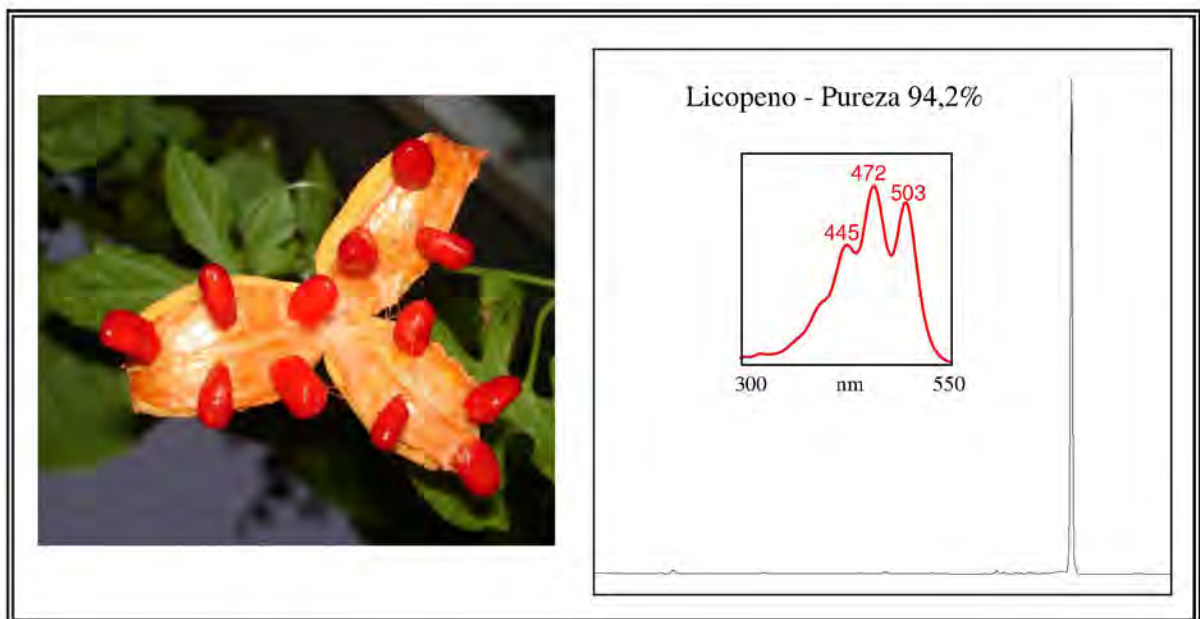


Figura 38 – Fruto aberto de melão de São Caetano e o perfil dos carotenóides do arilo.

4.1.4 Preparação do padrão de zeaxantina

A zeaxantina é um carotenóide minoritário, normalmente presente em baixas concentrações em folhas. A fonte mais utilizada para seu isolamento é o milho (*Zea mays* L.), sendo o carotenóide majoritário juntamente com a luteína. O isolamento a partir do grão de milho verde foi feito, porém o milho verde mostrou-se uma matriz complicada de se trabalhar. Devido à alta concentração de amido, ocorrem fortes emulsões durante a partição do extrato para o éter de petróleo.

Outra dificuldade está no fato das concentrações de zeaxantina no grão de milho serem relativamente baixas, de modo que se faz necessário o uso de massas elevadas para a extração. Mesmo usando-se massas superiores a 50g, as quantidades de padrão isolado não foram maiores que 20 μ g por coluna preparada.

Os frutos de laranjinha de jardim, uma solanácea (*Solanum pseudocapsicum* L.) muito utilizada como espécie ornamental (Figura 39), mostrou-se uma excelente fonte de zeaxantina. Com o uso de apenas 10g de frutos maduros foi possível o isolamento de 620 μ g de zeaxantina com pureza de 95,5%. Além da alta concentração de zeaxantina, a extração é simples e não apresenta as dificuldades encontradas com o milho verde.

Em ambos os casos, milho e laranjinha de jardim, os extratos foram saponificados e utilizou-se um gradiente de eluição, conforme Figura 40.



Figura 39 – Laranjinha de jardim (*Solanum pseudocapsicum* L.) com detalhe dos frutos cortados.

As purezas obtidas para o padrão isolado da laranjinha de jardim foram de 90,2-97,9% e para os padrões obtidos a partir do milho 80,4-95,1% (Figura 41).

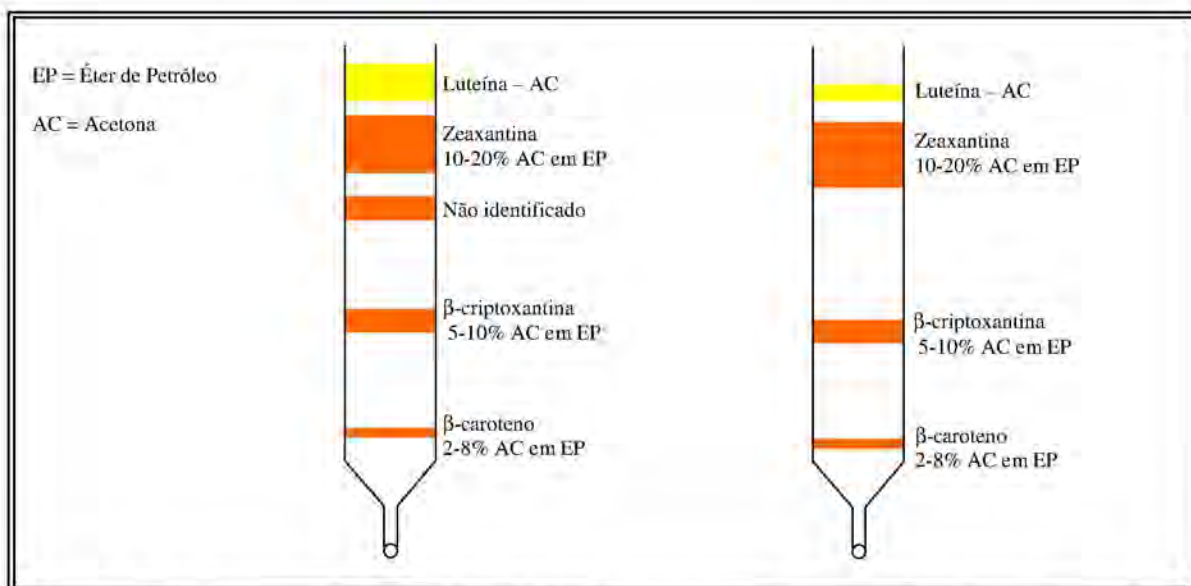


Figura 40 - Esquema do perfil de eluição da separação da zeaxantina do milho verde e da laranja de jardim.

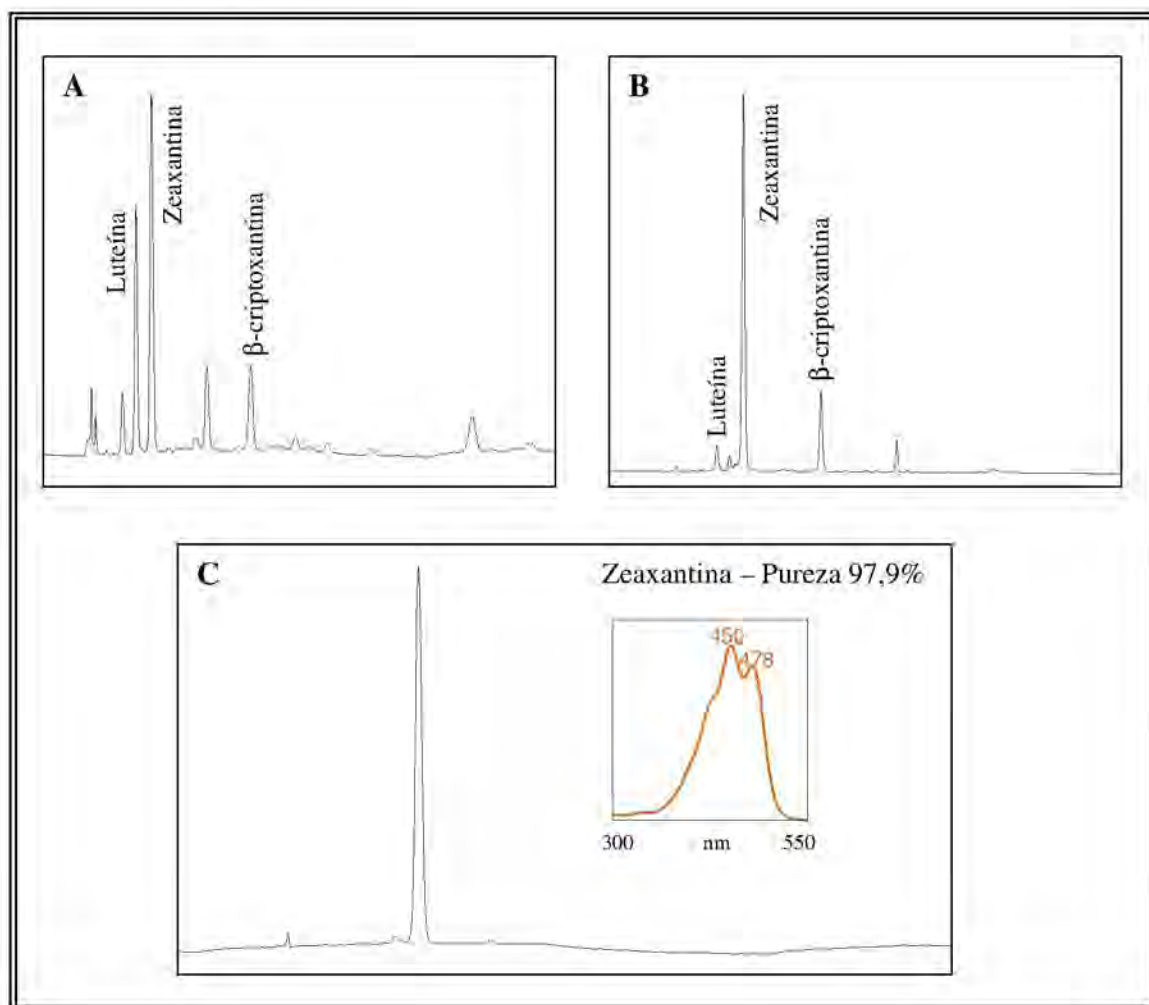


Figura 41 - Cromatogramas do extrato saponificado de milho verde (A), laranja de jardim (B) e do padrão de zeaxantina isolado (C).

4.1.5 Preparação de padrão de zeinoxantina

Para o isolamento de zeinoxantina utilizou-se polpa de cajá mirim (*Spondias mombin* L.). No entanto, não se obteve quantidades suficientes de padrão e, por tratar-se de um carotenóide minoritário e pouco comum, não foram preparadas ampolas de zeinoxantina para o estudo de estabilidade.

As condições utilizadas para a eluição gradiente estão no esquema da Figura 42. A pureza obtida para o padrão isolado foi de 91,4% (Figura 43).

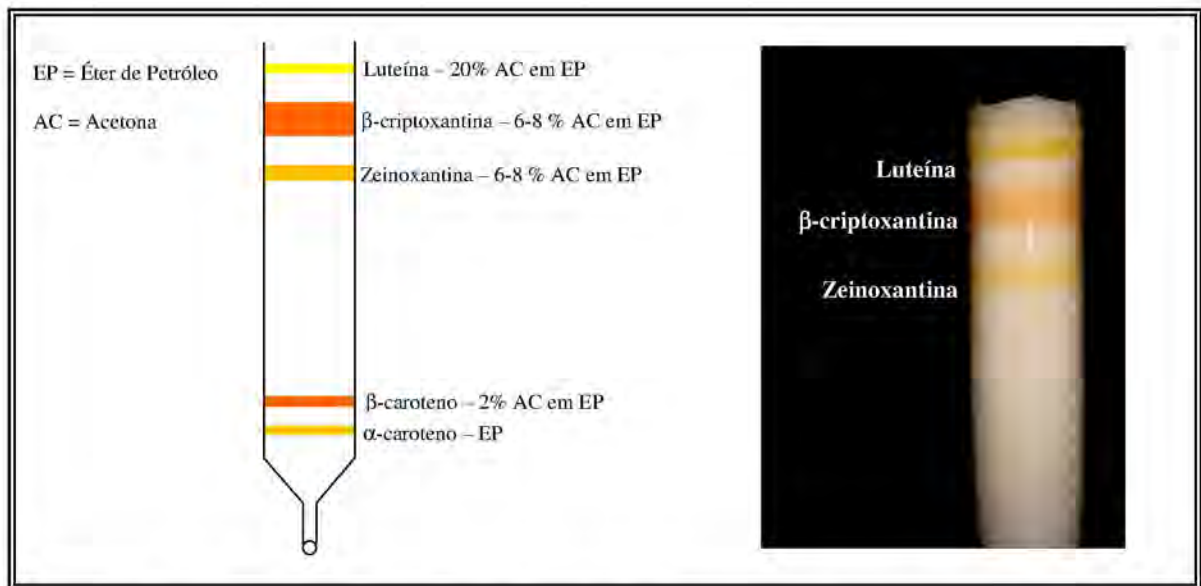


Figura 42 - Esquema e foto do perfil de eluição da separação de zeinoxantina de cajá mirim.

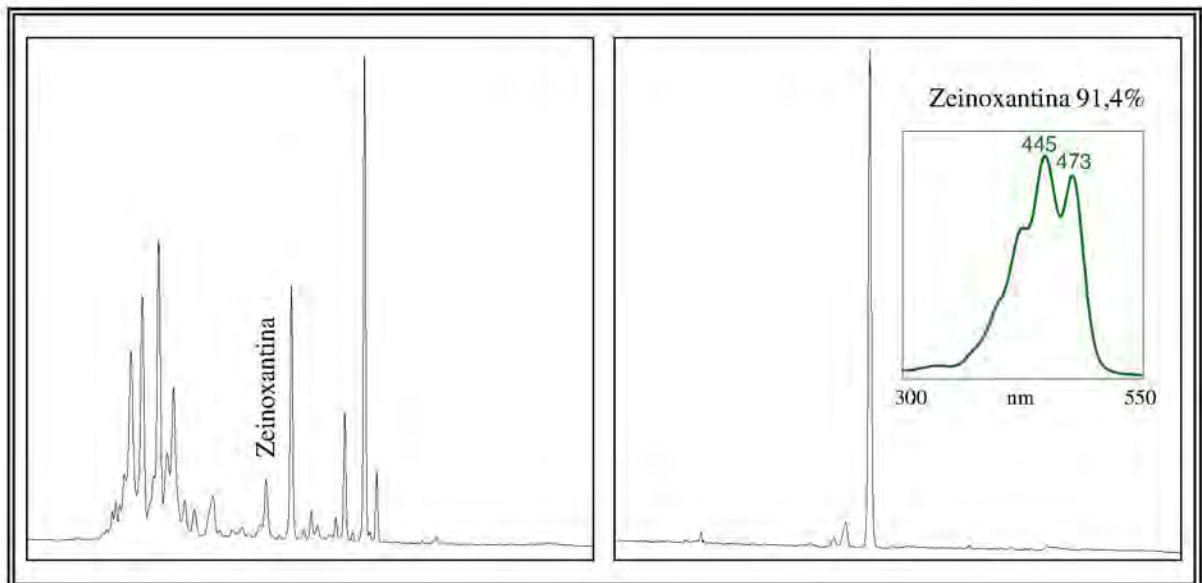


Figura 43 – Perfil dos carotenóides extraídos de cajá e o padrão de zeaxantina isolado.

4.2 Otimização do método cromatográfico de análise de carotenóides

Após o isolamento de todos os padrões de interesse, uma mistura com 5µg/mL de cada um dos carotenóides isolados foi preparada para a otimização do método analítico.

Quando o método de carotenóides foi implantado no laboratório tratava-se de uma eluição isocrática com metanol e éter metil-*terc*-butílico (80:20) a 0,8mL/min. Nessas condições a corrida cromatográfica demorava 45 minutos. O tempo de retenção para o β-caroteno era de 36 minutos e o licopeno não era analisado, pois ficava indeterminadamente retido na fase estacionária.

A Figura 44 corresponde a uma injeção de extrato de cenoura analisada nessas condições.

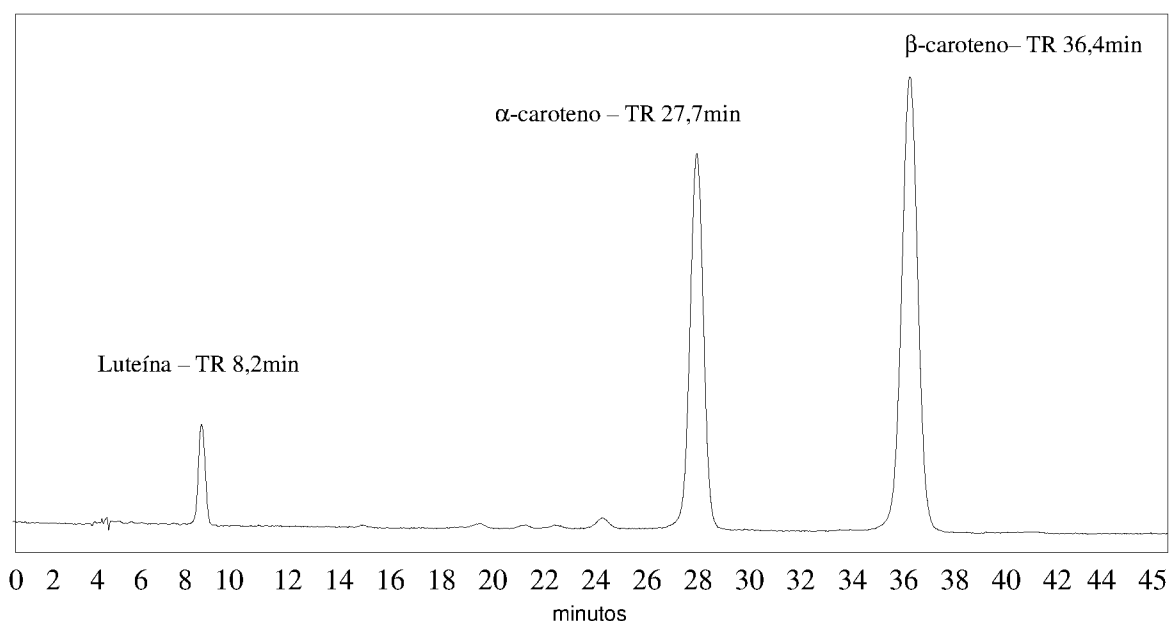


Figura 44 – Cromatograma do extrato de cenoura em eluição isocrática de metanol e éter metil-*terc*-butílico 80:20 (v/v).

Além de tratar-se de uma análise demorada, o fato da não eluição do licopeno foi determinante para a otimização da metodologia a partir do momento que amostras com este carotenóides fossem ser avaliadas.

A primeira alteração testada foi no modo de eluição, um gradiente com elevação gradual do teor do éter metil-*terc*-butílico foi proposto na tentativa de eluição do licopeno. Após uma série de tentativas estabeleceu-se o gradiente da Tabela 6.

Tabela 6 – Composição do gradiente proposto inicialmente para a análise dos carotenóides.

tempo (min)	% metanol	% Éter metil-<i>terc</i>-butílico
Inicial	80	20
05,00	80	20
20,00	15	85
25,00	15	85
25,05	80	20
30,00	80	20

Com esta mudança, o tempo da corrida cromatográfica foi de 36 minutos e a eluição do licopeno ocorreu em 32 minutos. Após a saída do licopeno era necessário aguardar 4 minutos para que houvesse a estabilização do sistema antes de uma nova injeção. Nessas condições já foi possível a separação de 7 carotenóides com excelente resolução cromatográfica (Figura 45).

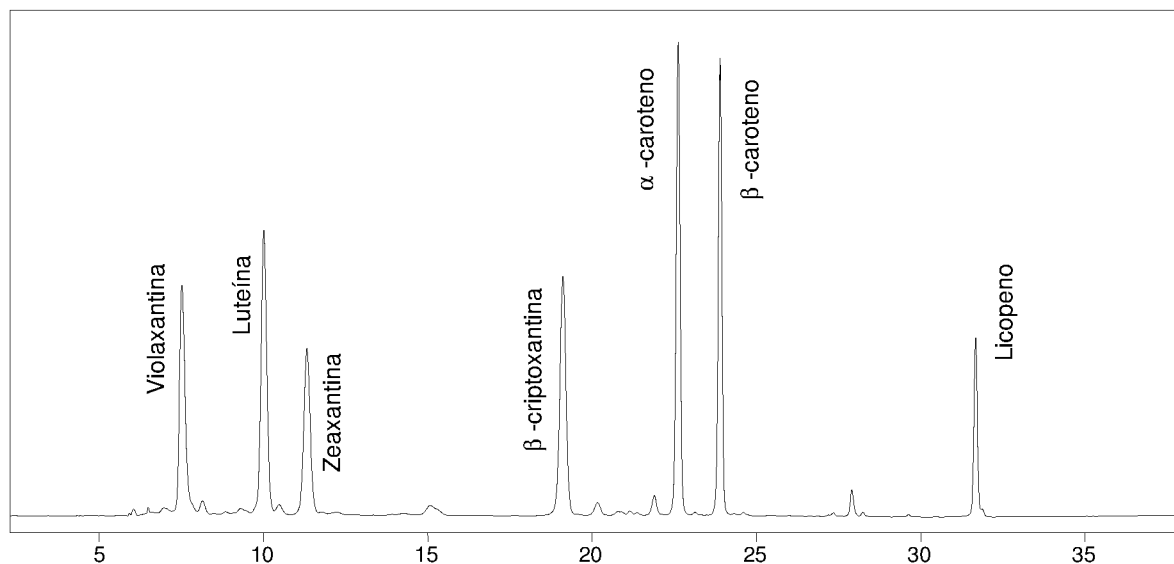


Figura 45 – Perfil cromatográfico dos carotenóides com o uso do modo gradiente de eluição.

Além da redução de quase 10 minutos no tempo de análise, outro evidente ganho foi na sensibilidade do método. Os picos tornaram-se mais finos, simétricos e intensos aumentando também a sensibilidade na detecção dos compostos de interesse.

Como a coluna cromatográfica não permanecia sob aquecimento, a alteração seguinte do método foi a colocação da mesma em forno com controlador de temperatura ajustado para 33°C.

Como os carotenóides são termolábeis, a temperatura escolhida foi relativamente baixa. Este ajuste foi feito com o intuito de manter as condições analíticas constantes, evitando o efeito da flutuação de temperatura do ambiente.

Na prática, houve uma diminuição de dois minutos no tempo de eluição do licopeno, porém o tempo total de análise não foi alterado, devido ao tempo de estabilização do gradiente necessário ao final da corrida.

Estas condições de análise foram usadas no trabalho de rotina, no entanto novos ajustes no gradiente da fase móvel foram realizados buscando reduzir o tempo de análise. A Tabela 1, descrita em materiais e métodos (3.1.2), apresenta o gradiente final estabelecido.

O método otimizado teve o tempo de análise reduzido para 28 minutos, o que representou um ganho de 37,8% em comparação com o método isocrático original. Consequentemente, o consumo de solventes da fase móvel foi reduzido na mesma proporção, o que gerou economia e um menor volume de resíduos químicos para descarte.

Com o término do gradiente e o retorno às condições iniciais da fase móvel em 16:55 minutos, foi possível a estabilização do sistema durante o restante da corrida. Dessa maneira, não há necessidade de nenhum tempo de espera (*delay*) entre as injeções, não prejudicando a eluição do licopeno.

A estabilização do sistema pode ser verificada pela monitoração da linha de base. A Figura 46 corresponde a uma corrida do gradiente de eluição sem injeção de amostra e demonstra a evolução do sinal da linha de base durante a corrida cromatográfica.

Percebe-se a elevação do sinal durante o desenvolvimento do gradiente como consequência do aumento da concentração do éter metil-*terc*-butílico que apresenta maior absorção de radiação UV (200nm) que o metanol. O retorno do sinal ao nível inicial pode ser verificado após a rápida queda no final da corrida, o que sugere que as condições iniciais estão restabelecidas e o sistema está pronto para uma nova injeção com 28 minutos de corrida.

A elevação do sinal da linha base não é percebida durante as corridas cromatográficas pois ambos as fases móveis não absorvem luz no comprimento de onda da leitura (450nm).

O retorno das condições iniciais em 28 minutos foi confirmado através de injeções sucessivas, os tempos de retenção dos carotenóides detectados não sofreram alterações significativas. Deste modo pode-se afirmar que a estabilização da coluna cromatográfica também ocorre em 28 minutos.

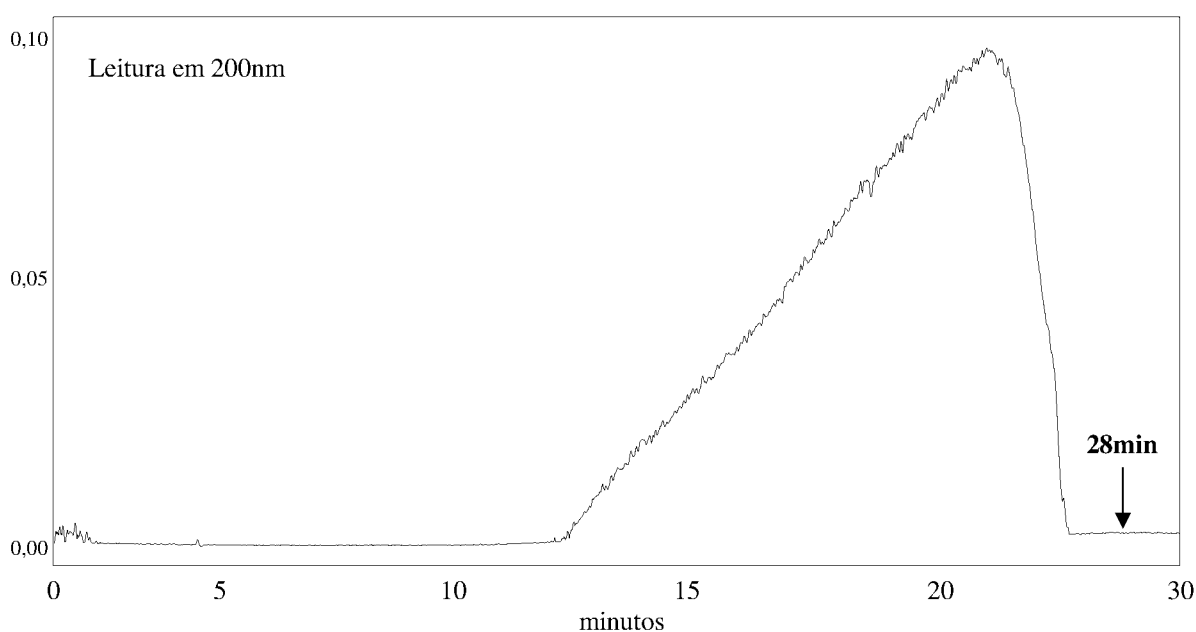


Figura 46 – Comportamento da linha base durante a evolução do gradiente de eluição.

Durante as tentativas de ajuste do gradiente, foi observado que alterações na concentração inicial de metanol afetavam sensivelmente a separação dos carotenóides oxigenados (Figura 47). Isto é particularmente útil no caso de separações de extratos que apresentem misturas complexas de carotenóides oxigenados.

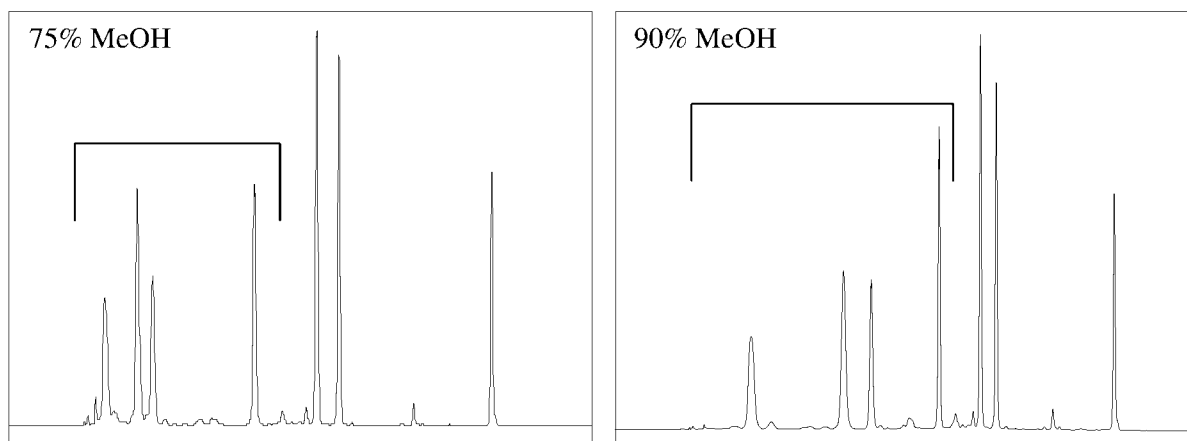


Figura 47 – Efeito da concentração inicial do metanol na separação dos carotenóides oxigenados (primeiros quatro picos).

Como o tempo de retenção dos carotenóides oxigenados aumentou com o aumento da concentração inicial do metanol (polar), pode-se afirmar que a parte apolar dos carotenóides é que está mais envolvida no mecanismo de separação. Sendo assim, o aumento da concentração de metanol aumenta a interação dos carotenóides com a fase estacionária e o éter metil-*terc*-butílico é quem promove sua eluição.

4.3 Verificação do perfil cromatográfico dos carotenóides isolados

Após o preparo das ampolas multi-padrões (3.2.4.6), uma ampola foi aberta, nesta ampola foi acrescentado o padrão de zeinoxantina e a mistura foi então injetada nas condições otimizadas. A Figura 48 apresenta o perfil cromatográfico e os espectros obtidos.

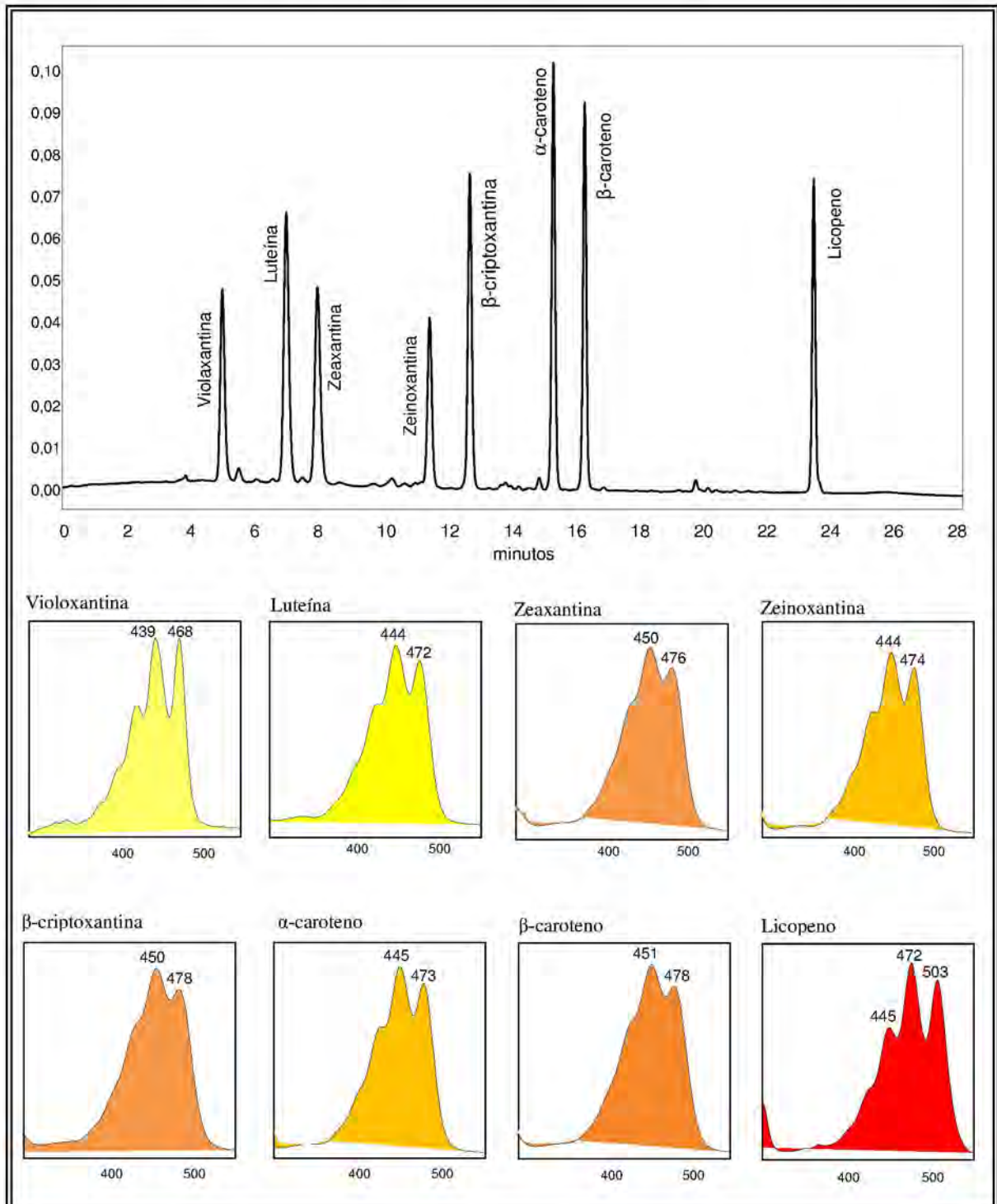


Figura 48 – Perfil cromatográfico dos carotenóides em uma mistura multi-padrões, acrescida de zeinoxantina, e os respectivos espectros de absorção UV/Vis.

4.4 Estudo de estabilidade dos padrões cromatográficos

4.4.1 Análise dos carotenóides do grupo 1

A Tabela 7 apresenta os dados de recuperação dos carotenóides do grupo 1. Foram realizadas 13 análises com tempo total de avaliação de 233 dias.

A Figura 49 representa a degradação dos carotenóides do grupo 1 que permaneceu exposto à luz, oxigênio e temperatura ambiente. Houve rápida degradação de todos os carotenóides estudados e em apenas 3 dias a violaxantina foi o carotenóide que apresentou a maior degradação (26,4%) e o licopeno a menor (7,8%).

Considerando a exigência de 90% de pureza mínima para a utilização do carotenóide como padrão analítico, pode-se dizer que em 3 dias de armazenamento nas condições do grupo 1, apenas a luteína, zeaxantina, β -criptoxantina e o licopeno estariam viáveis. Com 5 dias, os quatro carotenóides citados ainda estavam viáveis para uso, mas em 7 dias todos os carotenóides estudados apresentaram degradação superior a 10%.

O taxa de degradação dos carotenóides estudados no grupo 1 foi semelhante, com exceção da violaxantina que apresentou uma rápida degradação inicial (58,9% em 10 dias) e a partir de 60 dias praticamente estabilizou, ao passo que o licopeno apresentou a menor taxa inicial de degradação.

Ao final do estudo deste grupo (233 dias), todos os carotenóides estudados apresentaram degradação superior a 90%, sendo o α -caroteno (98,0%) e o β -caroteno (98,2%) os mais degradados. Luteína e a zeaxantina apresentaram a menor degradação 92,5%.

A variação de temperatura a qual este grupo ficou exposto foi de 19 a 31°C.

Tabela 7 – Recuperação dos carotenóides do grupo 1 (%).

Dias	Violaxantina	Luteína	Zeaxantina	β -criptoxantina	α -caroteno	β -caroteno	Licopeno
0	100	100	100	100	100	100	100
3	73,6	91,9	92,2	91,3	88,2	88,7	92,2
5	57,7	91,6	92,0	90,8	87,5	88,2	91,3
7	54,1	84,5	85,8	84,7	83,1	83,9	86,2
10	41,1	71,8	71,9	72,5	74,2	73,6	78,8
17	39,4	64,0	63,7	64,8	66,7	64,7	72,8
24	31,2	54,1	53,6	54,8	56,6	54,0	65,1
31	25,4	53,3	53,4	49,7	47,6	44,9	55,8
45	23,0	41,7	41,0	37,6	36,4	32,3	43,7
63	15,3	37,6	37,8	30,4	28,7	23,9	29,3
92	13,9	21,2	21,7	15,3	13,1	10,2	16,6
120	13,4	17,5	17,0	10,8	9,6	6,7	10,3
233	6,5	7,5	7,5	3,7	2,0	1,8	6,8

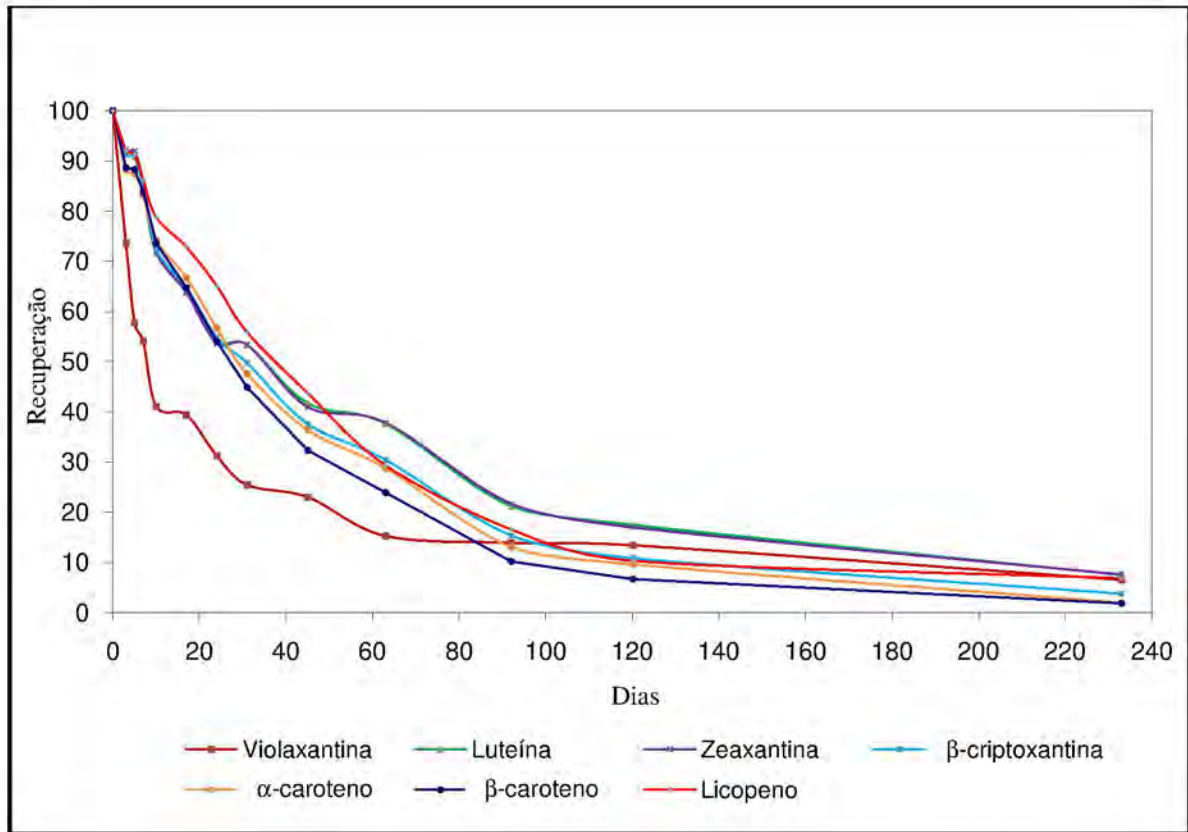


Figura 49 – Perfil de degradação dos carotenóides do grupo I ao longo do estudo.

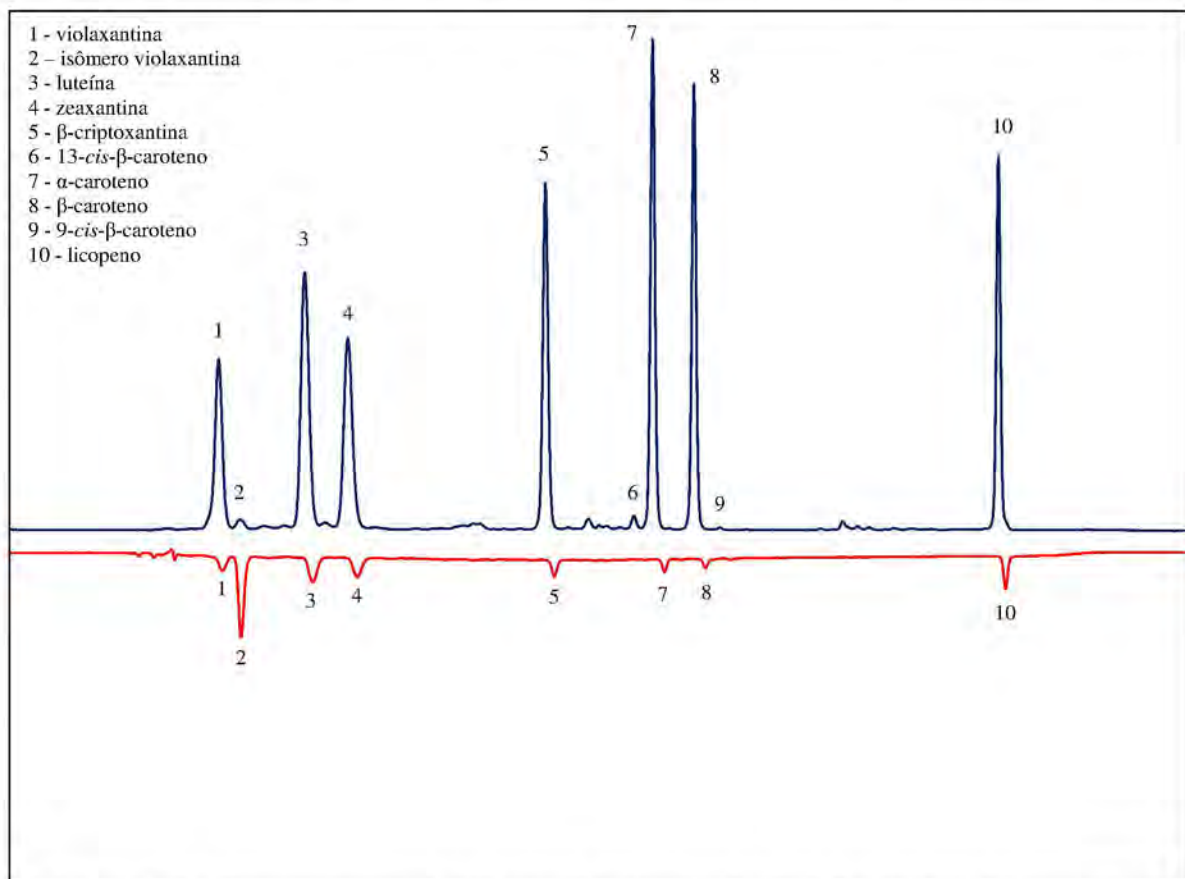


Figura 50 – Cromatograma do “dia zero” (acima) e do dia 233 (abaixo) do grupo 1.

Através da observação do perfil cromatográfico dos carotenóides do grupo 1, após 233 dias, é possível perceber que houve degradação e não isomerização dos carotenóides (Figura 50). A exceção é a violaxantina, que visivelmente foi convertida em seu isômero que elui logo a sua frente (pico 2).

A Figura 51 representa a conversão da violaxantina em seu isômero. No decorrer das análises, percebe-se que houve completa inversão da relação de áreas entre os dois picos.

A isomerização da violaxantina, somada à sua degradação, pode explicar a taxa de degradação exponencial mais acentuada da violaxantina em comparação com os demais carotenóides (Figura 49).

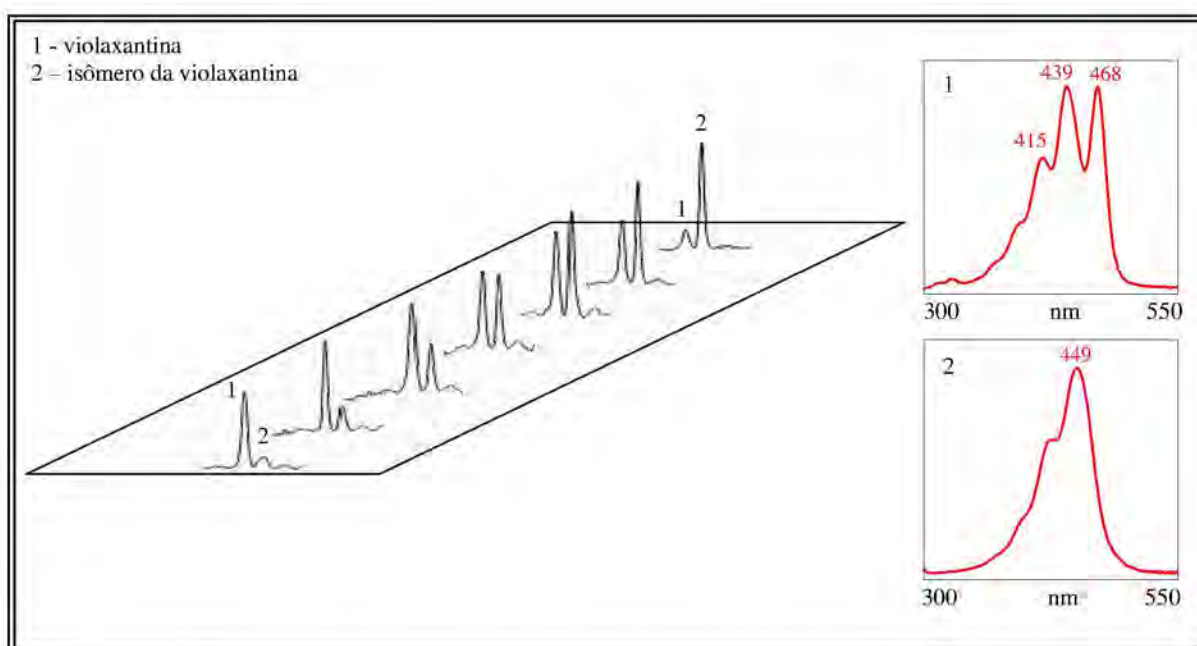


Figura 51 – Espectros e comportamento da violaxantina e seu isômero nas análises do grupo 1.

O espectro de UV característico da violaxantina (1) difere bastante do espectro do isômero (2), permitindo assim a correta identificação dos dois compostos apesar da proximidade do tempo de retenção de ambos.

4.4.2 Análise dos carotenóides do grupo 2

Para o grupo 2 foram realizadas 10 análises com tempo total de avaliação de 120 dias (Tabela 8).

A Figura 52 representa o perfil da degradação dos carotenóides deste grupo, que difere do primeiro pela ausência de oxigênio (ampolas seladas a vácuo).

A degradação de todos os carotenóides estudados foi sensivelmente menor, sendo que, ao final do estudo, novamente a violaxantina foi o carotenóide que apresentou a maior degradação (60,9%) e o licopeno a menor (22,3%), seguidos pela luteína (27,9%) e zeaxantina (27,1%).

A média de degradação dos carotenóides do grupo 1, em 120 dias, foi de 87,8%, enquanto que no grupo 2 foi de 36,0%. A remoção do oxigênio do sistema foi suficiente para aumentar a estabilidade dos carotenóides do grupo 2 em 51,8% em comparação ao grupo 1 no mesmo intervalo de tempo.

Novamente se considerarmos o limite máximo de degradação de 10% (90% de pureza), em 3 dias luteína, zeaxantina e licopeno estariam viáveis para o uso como padrão analítico. Após 7 dias, apenas o licopeno apresentou pureza acima de 90%, mantendo-se assim até o 17º dia.

A variação de temperatura a qual este grupo ficou exposta foi a mesma do grupo 1 (19-31°C).

Tabela 8 – Recuperação dos carotenóides do grupo 2 (%).

Dias	Violaxantina	Luteína	Zeaxantina	β -criptoxantina	α -caroteno	β -caroteno	Licopeno
0	100	100	100	100	100	100	100
3	71,6	90,3	90,4	88,7	81,9	82,3	95,0
7	61,3	88,3	89,2	86,7	78,8	79,8	96,0
10	54,3	86,6	87,4	85,5	78,2	79,0	94,9
17	49,2	84,3	85,5	81,2	74,5	74,7	93,7
24	49,1	80,1	81,8	77,7	70,6	72,7	89,9
31	48,4	82,1	83,4	78,3	71,6	73,6	89,0
63	41,0	72,4	74,7	68,9	62,0	64,7	79,9
92	40,3	75,6	78,6	70,4	63,5	66,4	86,2
120	39,1	72,1	72,9	64,9	60,1	61,4	77,7

A ordem crescente de estabilidade dos carotenóides estudados nesse grupo foi: violaxantina, α -caroteno e β -caroteno, β -criptoxantina, luteína e zeaxantina e por fim o licopeno (Figura 52).

O comportamento do α -caroteno e do β -caroteno, assim como o da luteína e zeaxantina, foi bastante semelhante, lembrando que tais moléculas diferem entre si apenas pela posição de uma dupla ligação.

A presença de grupos hidroxila na molécula parece promover uma maior estabilidade ao carotenóide, pois a ordem de estabilidade coincide com o aumento do número de hidroxilas presentes, ou seja: α -caroteno e β -caroteno (nenhuma hidroxila), β -criptoxantina (uma hidroxila) luteína e zeaxantina (duas hidroxilas). Já a presença de grupamento epóxido sugere efeito contrário, pois a violaxantina foi o carotenóide menos estável.

O licopeno, reportado como pouco estável em solução (HART & SCOTT, 1995), foi o mais estável nas condições de armazenamento deste grupo.

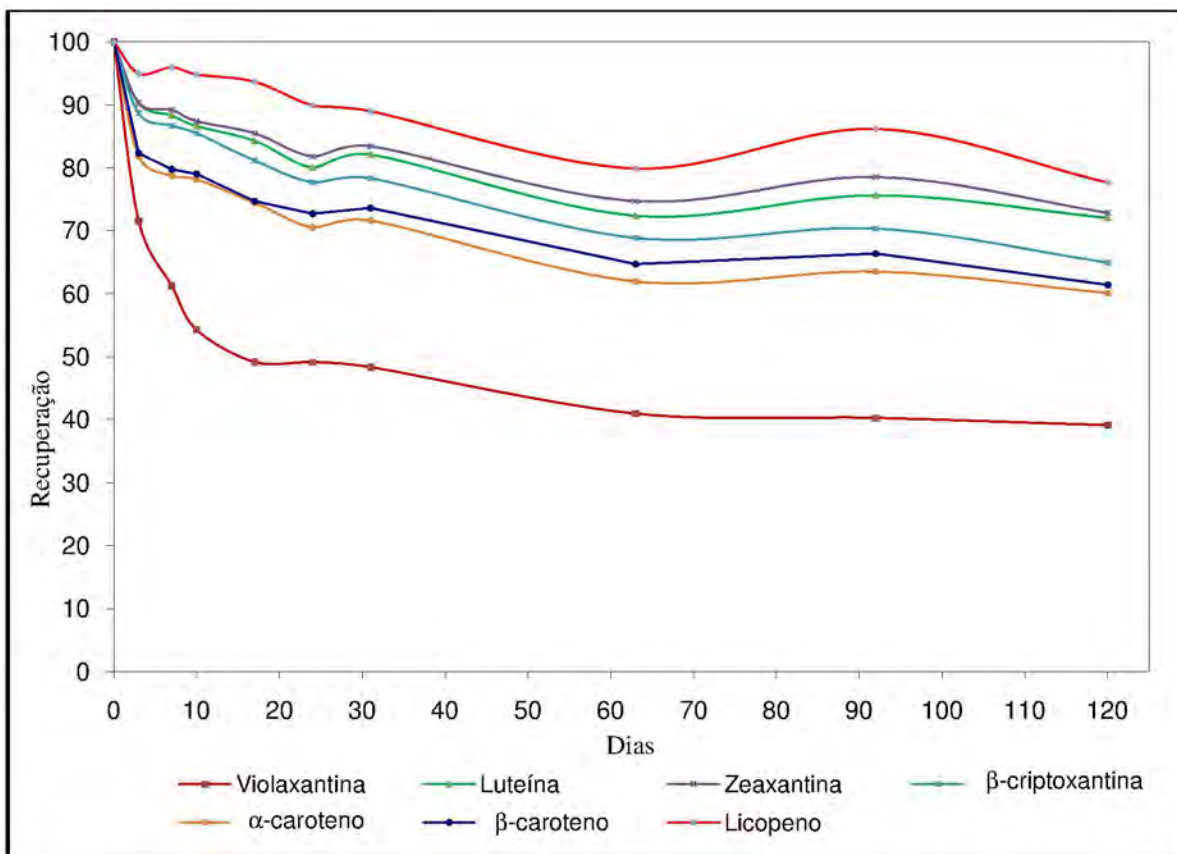


Figura 52 – Perfil de degradação dos carotenóides do grupo 2 ao longo do estudo.

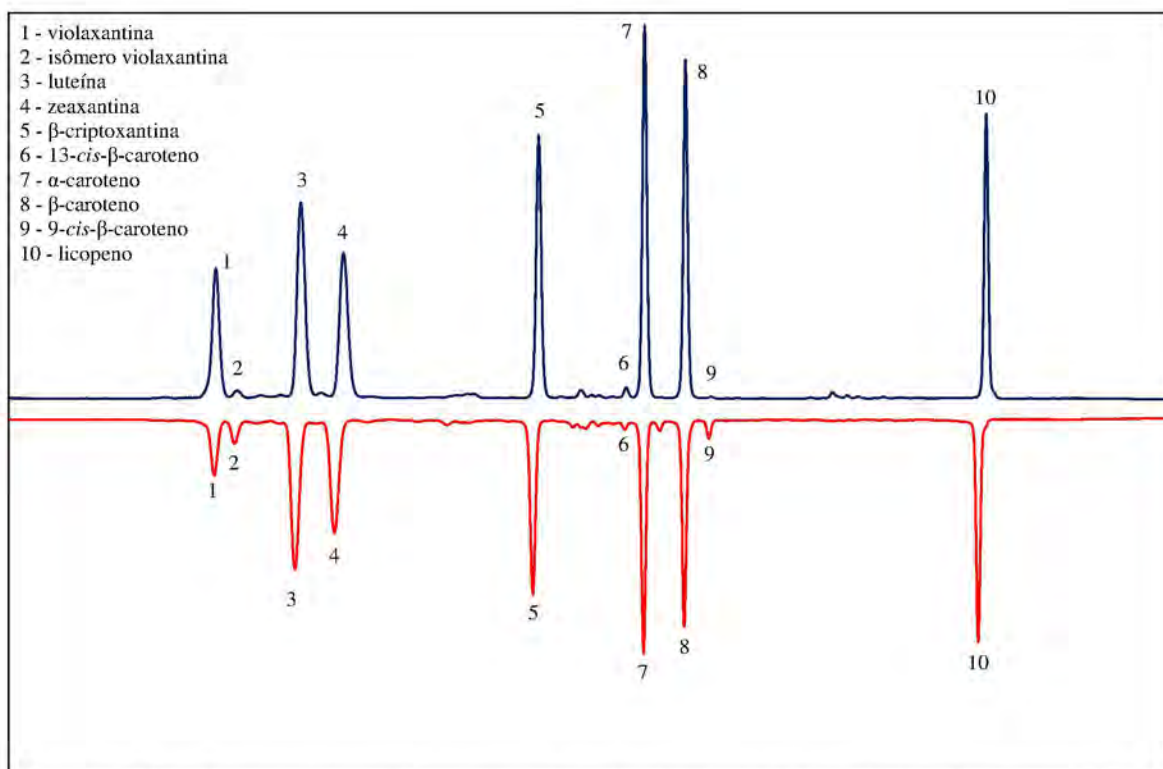


Figura 53 – Cromatograma do “dia zero” (acima) e do dia 120 (abaixo) do grupo 2.

Da mesma maneira que para o grupo 1, a violaxantina sofreu rápida degradação inicial (Figura 52), o que também pode ser explicado pela formação do seu isômero (pico 2 da Figura 52).

Neste grupo também foi possível verificar a formação do isômero 9-*cis*- β -caroteno (pico 9 da Figura 53).

4.4.3 Análise dos carotenóides do grupo 3

Para o grupo 3 foram realizadas 9 análises com tempo total de avaliação de 120 dias (Tabela 9).

A Figura 54 representa o perfil da degradação dos carotenóides deste grupo, que difere do grupo anterior apenas pela não exposição à luz (ampolas seladas a vácuo e mantidas no escuro).

Ao final dos 120 dias de estudo, novamente a violaxantina foi o carotenóide que apresentou a maior degradação (51,0%) e o licopeno a menor (17,5%), seguidos pela luteína (20,9%) e zeaxantina (20,9%).

A média de degradação dos carotenóides do grupo 3 foi de 30% em comparação com os 36% de degradação apresentado pelos carotenóides do grupo 2. A não exposição à luz contribuiu com a preservação dos carotenóides, 6,0% menos degradados.

Novamente, considerando o limite máximo de degradação como 10% (90% de pureza), em 5 dias apenas a violaxantina não estaria viável para uso como padrão. Após 7 dias, apenas o licopeno e a zeaxantina mantiveram-se acima de 90%, permanecendo assim até o 17º dia.

A variação de temperatura a qual este grupo ficou exposta foi de 21 a 29°C.

Tabela 9 – Recuperação dos carotenóides do grupo 3 (%).

Dias	Violaxantina	Luteína	Zeaxantina	β -criptoxantina	α -caroteno	β -caroteno	Licopeno
0	100	100	100	100	100	100	100
5	73,2	93,5	94,1	93,0	90,1	90,3	96,0
7	63,5	89,4	90,1	88,7	86,0	86,6	92,6
17	50,8	90,1	90,4	88,1	84,6	85,1	95,5
31	57,5	87,3	88,7	84,7	79,5	81,3	88,6
45	49,5	85,3	87,1	82,2	76,2	77,9	91,3
63	39,8	79,3	79,8	76,3	70,4	71,7	86,2
92	47,7	79,0	80,9	73,4	67,8	69,6	84,2
120	49,0	79,1	79,1	68,6	65,7	66,3	82,5

O mesmo comportamento da ordem de estabilidade observado no grupo 2 foi mantido no grupo 3, ou seja, em ordem decrescente de estabilidade tem-se: licopeno, luteína e zeaxantina, β -criptoxantina, α -caroteno e β -caroteno e violaxantina (Figura 54). Este fato reforça a evidência do efeito protetor da presença dos grupamentos hidroxila nas moléculas.

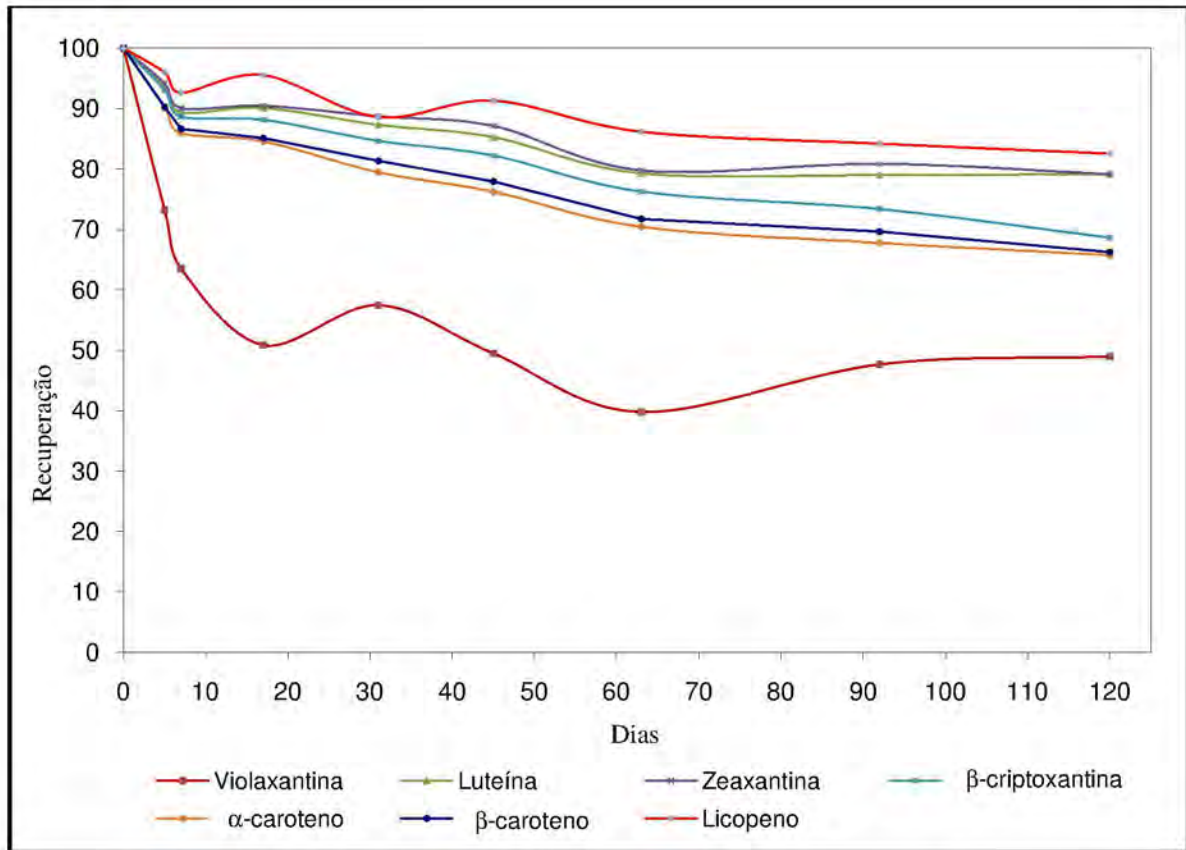


Figura 54 – Degradação dos carotenóides do grupo 3 ao longo do estudo.

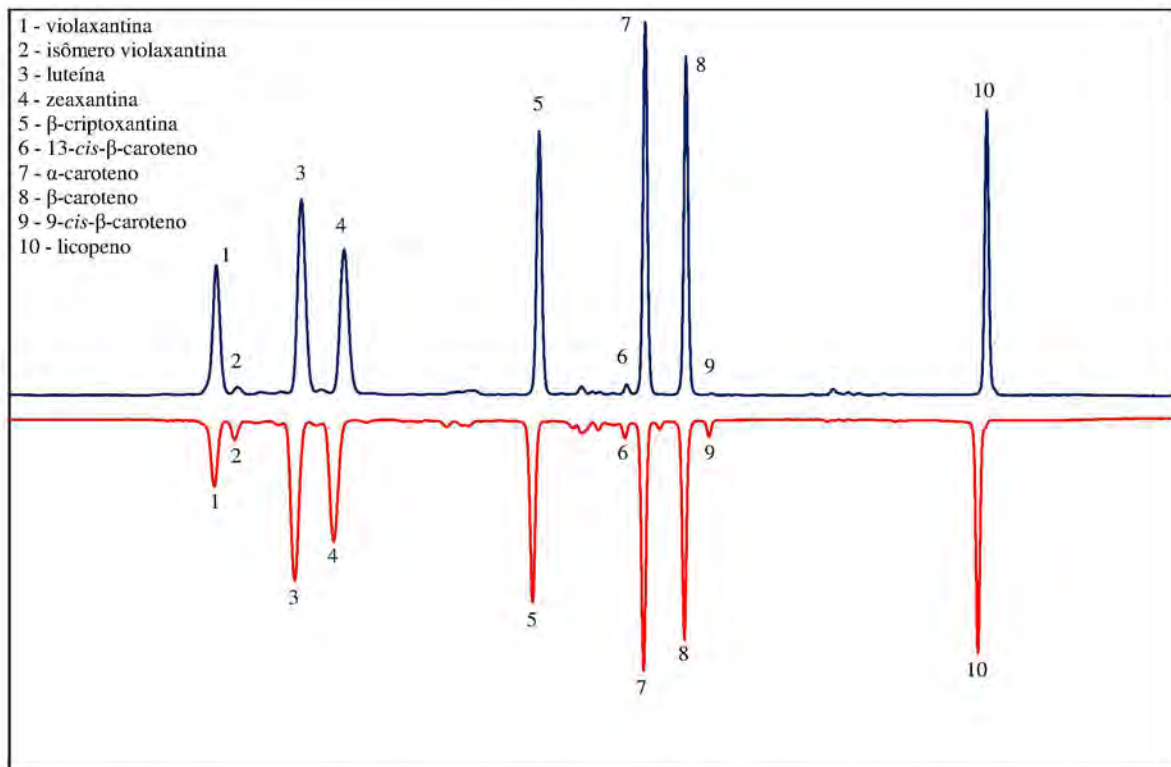


Figura 55 – Cromatograma do “dia zero” (acima) e do dia 120 (abaixo) do grupo 3.

4.4.4 Análise dos carotenóides do grupo 4

Para o grupo 4 foram realizadas 10 análises com tempo total de avaliação de 120 dias (Tabela 10).

A Figura 56 representa o perfil de degradação dos carotenóides deste grupo que difere do grupo anterior pela redução da temperatura (ampolas seladas mantidas sob refrigeração). A variação de temperatura a qual este grupo ficou exposto foi de -1 a 9°C.

Ao final dos 120 dias de estudo, novamente a violaxantina apresentou a maior degradação (32,4%) e a luteína a menor (5,6%), seguidas pela zeaxantina (9,5%).

A média de degradação dos carotenóides deste grupo foi de 13,7%. A redução da temperatura para o nível de refrigeração (4-8°C) contribuiu para a preservação dos carotenóides, com redução da degradação em 16,3% quando comparada aos carotenóides do grupo 3.

Sob essas condições de armazenamento, todos os carotenóides seriam viáveis por 3 dias e, com exceção da violaxantina, os demais estariam acima do limite de 90% até o 17º dia. Luteína e zeaxantina permaneceram viáveis durante todo o período do estudo (120 dias).

Tabela 10 – Recuperação dos carotenóides do grupo 4 (%).

Dias	Violaxantina	Luteína	Zeaxantina	β -criptoxantina	α -caroteno	β -caroteno	Licopeno
0	100	100	100	100	100	100	100
3	91,6	95,1	95,1	94,4	92,6	92,2	95,0
5	89,4	95,2	95,4	94,3	91,6	91,2	95,6
10	86,4	93,4	94,3	93,2	90,4	90,4	95,8
17	82,3	95,9	96,2	95,5	92,6	92,9	97,2
31	79,5	92,0	92,3	91,7	87,8	89,2	93,6
45	73,1	94,2	94,7	96,0	92,1	92,8	97,2
63	68,8	91,2	91,7	91,2	87,3	87,7	92,5
92	66,7	89,9	90,1	89,9	86,8	86,5	89,9
120	67,6	94,4	90,5	89,9	87,1	86,3	88,2

O comportamento da ordem de estabilidade observado nos grupos 2 e 3 foi mantido no grupo 4 até o 63º dia. A partir deste ponto o licopeno apresentou taxa de degradação maior que a luteína, zeaxantina e β -criptoxantina (Figura 56).

O perfil cromatográfico deste grupo ao final do estudo (Figura 57) mostra que a isomerização da violaxantina foi menos intensa, o que se confirma pelo perfil de degradação apresentado no gráfico da Figura 56, onde a degradação deixou de apresentar a característica exponencial. A isomerização do β -caroteno para 9-*cis*- β -caroteno também foi insignificante (pico 9 da Figura 57).

Estes resultados sugerem que dentre os fatores analisados, a temperatura seja a maior responsável pela isomerização dos carotenóides.

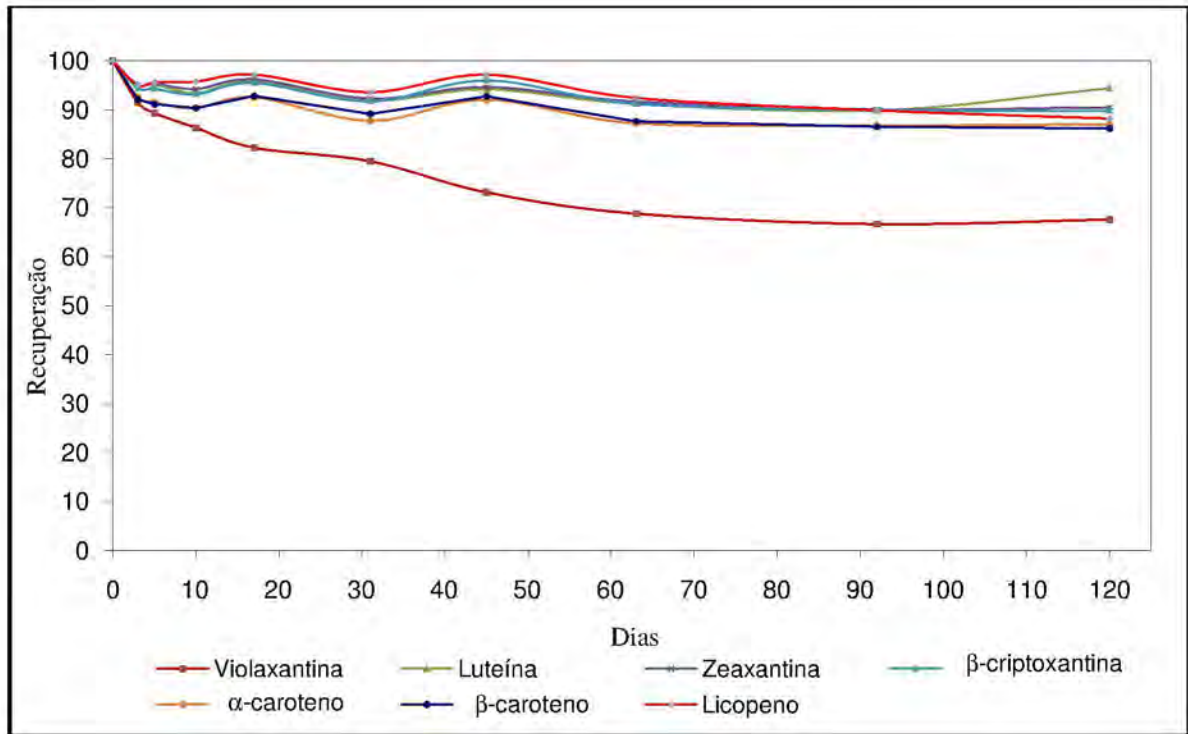


Figura 56 – Perfil da degradação dos carotenóides do grupo 4 ao longo do estudo.

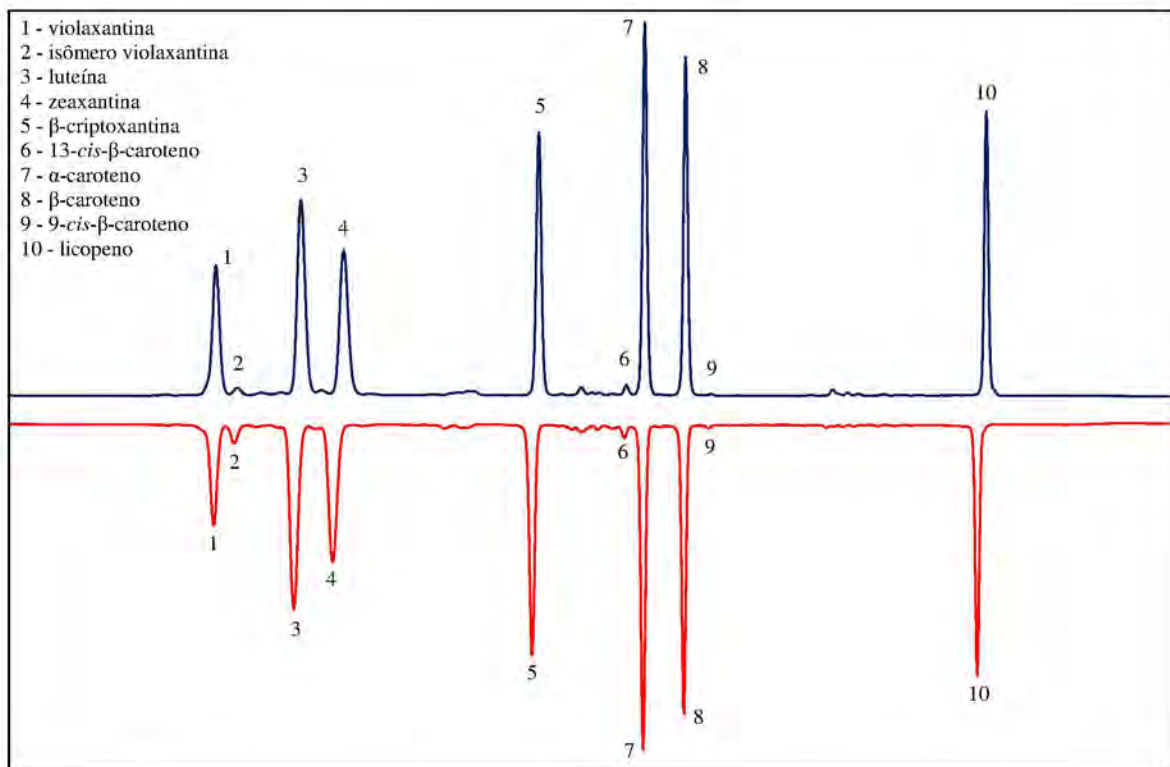


Figura 57 – Cromatograma do “dia zero” (acima) e do dia 120 (abaixo) do grupo 4.

4.4.5 Análise dos carotenóides do grupo 5

Para o grupo 5 foram realizadas 11 análises com tempo total de avaliação de 370 dias (Tabela 11). Quatro ampolas deste grupo ainda restaram para a continuação deste estudo após o período aqui descrito.

A Figura 58 representa o perfil de degradação dos carotenóides deste grupo, no qual as condições de armazenamento foram ampolas seladas a vácuo, mantidas em freezer e no escuro. A variação de temperatura a qual este grupo ficou exposta foi de -9 a -27°C.

Ao final dos 370 dias de estudo novamente a violaxantina apresentou a maior degradação (13,3%) e o licopeno a menor. Luteína e zeaxantina apresentaram índices de degradação de apenas 1,2 e 1,5%, respectivamente.

A média de degradação dos carotenóides deste grupo ao final dos 370 dias foi de apenas 4,5%.

A redução da temperatura para níveis mais baixos (-18°C) contribuiu com a preservação dos carotenóides, reduzindo a degradação em 9,2% em comparação ao grupo 4. Cabe ressaltar que o tempo de avaliação para o grupo 4 foi de 120 dias contra 370 do grupo 5.

Sob essas condições de armazenamento, todos os carotenóides avaliados seriam viáveis por 45 dias e, com exceção da violaxantina, estariam acima do limite de 90% de pureza até o último dia do estudo (370).

Os resultados para 92 e 120 dias mostraram valores de recuperação menores que 90% para a maioria dos carotenóides, indicando que pode ter havido problemas na análise ou na preparação dessas ampolas, uma vez que os resultados subsequentes voltaram a apresentar ótima recuperação.

Tabela 11 – Recuperação dos carotenóides do grupo 5 (%).

Dias	Violaxantina	Luteína	Zeaxantina	β -criptoxantina	α -caroteno	β -caroteno	Licopeno
0	100	100	100	100	100	100	100
3	92,1	95,8	95,6	95,6	94,4	94,3	96,0
5	93,8	95,8	95,9	95,4	93,4	93,1	96,1
7	93,6	95,4	95,6	95,1	92,4	92,5	97,3
17	94,5	96,4	97,1	97,0	96,2	97,2	96,6
45	94,3	96,5	96,7	97,9	96,4	97,5	96,1
63	86,5	93,0	92,8	94,2	93,0	93,5	91,5
92	85,2	90,3	90,1	91,0	89,8	89,7	88,3
120	85,6	90,7	88,2	88,2	85,9	84,1	84,4
233	82,0	92,5	92,6	92,8	91,6	92,6	92,4
370	86,7	98,8	98,5	96,4	93,3	93,1	101,5

O comportamento da ordem de estabilidade observado nos grupos anteriores foi mantido no grupo 5, tendo-se em ordem decrescente de estabilidade: licopeno, luteína, zeaxantina, β -criptoxantina, α -caroteno, β -caroteno e violaxantina (Figura 58).

Em solução, o licopeno tem menor estabilidade e segundo Hart & Scott (1995) as soluções de licopeno são instáveis e grandes perdas são observadas. Em avaliação da estabilidade do licopeno concluíram que uma solução do padrão em fase móvel armazenada em freezer (-18°C) e com adição de BHT não sofreu degradação em um período de 20 dias. Em estudo com os carotenóides misturados em solução concluíram que em 14 semanas não houve degradação, exceto para licopeno.

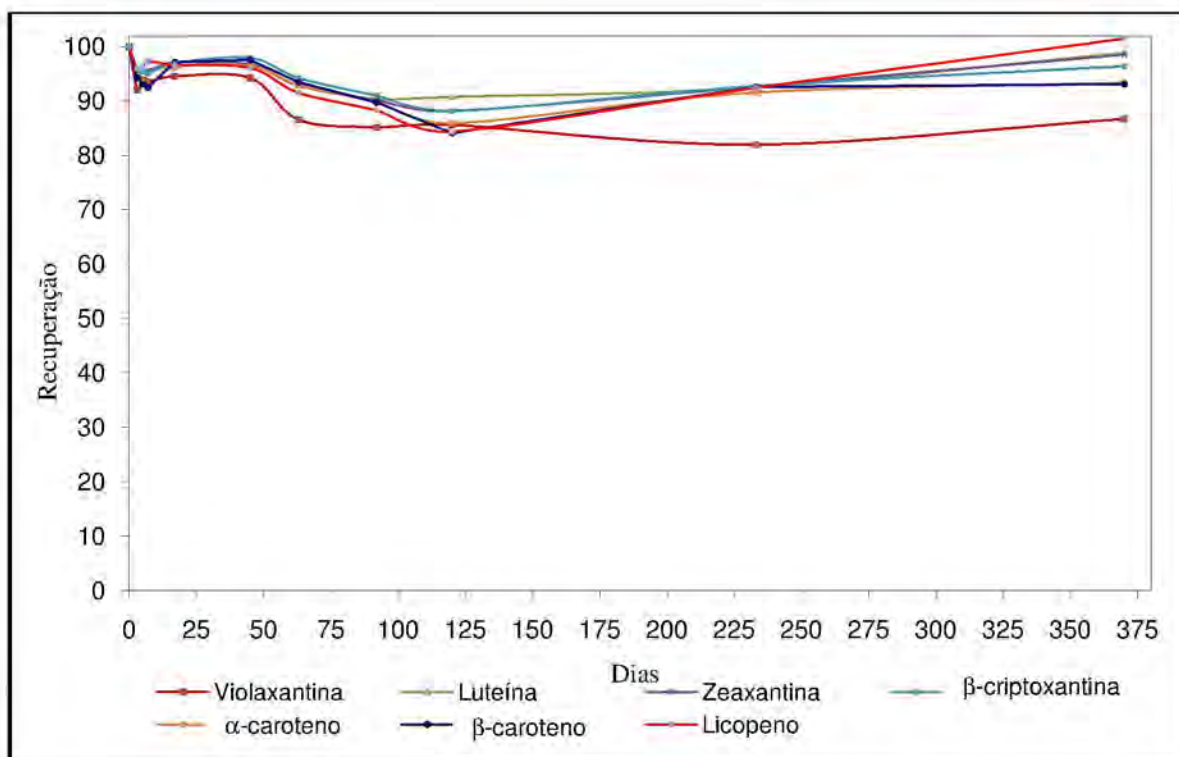


Figura 58 – Degradação dos carotenóides do grupo 5 ao longo do estudo.

Nos gráficos de degradação dos carotenóides de todos os grupos foi possível observar oscilações das curvas, como por exemplo, o ponto 45º dia da Figura 56 e o 31º dia da Figura 54. Tais oscilações podem ser justificadas por erros nos preparos das ampolas, volumes menores ou maiores de solução na ressuspensão das mesmas, ou ainda erros analíticos do próprio equipamento.

Sugere-se para estudos futuros de estabilidade o uso de padrões internos, dessa maneira seria possível a correção destes erros volumétricos pela resposta obtida com o padrão interno.

Uma substância para ser usada com este fim deve ser capaz de ser detectada no método analítico e não poderia coeluir com nenhum dos carotenóides estudados. Além disso, deve ser estável e não reagir com nenhuma substância utilizada.

O acenafteno pode ser uma opção, no entanto por não apresentar absorção no espectro visível deveria ser monitorado em outro comprimento de onda, o que é possível com a utilização de detectores de arranjos de diodo.

A figura 59 apresenta os cromatogramas do “dia zero” (acima) e do 370º dia do grupo 5 (abaixo). A comparação destes cromatogramas permite observar que houve poucas alterações no perfil cromatográfico. Os tempos de retenção sofreram pequenos acréscimos que podem ser justificados pelo desgaste da fase estacionária ou ainda por lotes diferentes de fases móveis usadas.

O perfil cromatográfico dos carotenóides do grupo 5 indica que ainda ocorreu isomerização, em especial da violaxantina (pico 2 da Figura 59) e do β -caroteno (picos 6 e 9).

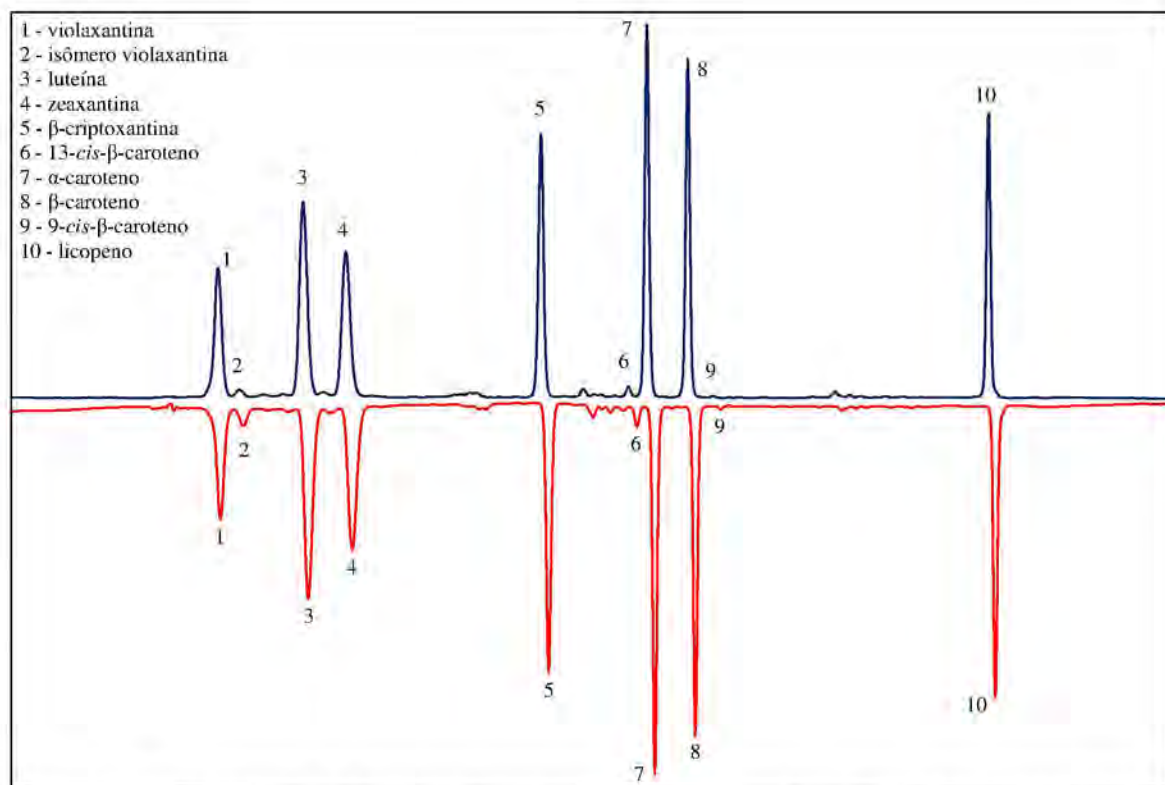


Figura 59 – Comparação dos cromatogramas do grupo 5 no “dia zero” (acima) e 370º dia (abaixo).

Durante todo o estudo de estabilidade foi utilizada apenas uma coluna cromatográfica, coluna esta que permanece em uso diário nas determinações de rotina do laboratório há quatro anos. Isto demonstra que a metodologia de extração e separação dos carotenóides é bastante eficiente para a remoção de interferentes e de compostos que poderiam danificar a fase estacionária.

Os cromatogramas da Figura 59 reforçam a característica seletiva da metodologia sendo possível observar que não houve perda de sensibilidade. Os picos permanecem com a mesma simetria e resolução, havendo apenas uma pequena alteração nos tempos de retenção. Estes resultados sugerem que a interferência da matriz, a ser avaliada no parâmetro de validação seletividade, não deve ser relevante para a metodologia de análise dos carotenóides.

4.4.6 Análise da solução de acenafteno

A Tabela 12 apresenta os resultados das análises da solução de acenafteno, (acompanhamento da variação do sinal do detector) realizadas juntamente com as análises dos carotenóides dos cinco grupos preparados.

Tabela 12 – Resultados das análises da solução de acenafteno.

Dias	Área pico	Área média	Coef. variação	Tempo de retenção (min)	Fator de resposta relativa (%)
0	3384962	3398614	0,85	9,454	100,0
	3379227			9,451	
	3431653			9,456	
3	3405024	3427323	0,67	9,383	100,8
	3450645			9,384	
	3426301			9,384	
5	3388074	3391308	0,28	9,416	99,8
	3383998			9,413	
	3401851			9,404	
7	3443655	3450750	0,22	9,392	101,5
	3450100			9,391	
	3458495			9,393	
17	3396449	3413498	0,44	9,393	100,4
	3419820			9,398	
	3424225			9,393	
45	3467490	3458156	0,41	9,557	101,8
	3465196			9,534	
	3441783			9,516	
63	3358563	3356762	0,14	9,346	98,8
	3360134			9,368	
	3351589			9,368	
92	3372380	3406593	1,67	9,341	100,2
	3375268			9,372	
	3472130			9,391	
120	3448614	3438069	0,27	9,374	101,2
	3431020			9,373	
	3434572			9,346	
233	3533983	3528776	0,60	9,446	103,8
	3505475			9,425	
	3546870			9,398	
370	3505339	3531892	1,27	9,388	103,9
	3506660			9,374	
	3583676			9,379	

As duas últimas análises (233° e 370° dias) foram feitas após manutenção no detector, na qual foi realizada a troca da lâmpada. O sinal obtido para o pico de acenafteno após esta troca de lâmpada foi incrementado em aproximadamente 4%. As análises das ampolas realizadas após esta manutenção foram corrigidas de modo a compensar o incremento no sinal.

4.5 Avaliação dos parâmetros de validação

4.5.1 Avaliação da seletividade

Pode-se dizer que o método de extração dos carotenóides é seletivo, pois após a extração há a etapa de partição dos carotenóides para éter de petróleo e esta etapa pode ser considerada como uma etapa de limpeza (*clean-up*) que promove a remoção de muitas substâncias interferentes presentes na matriz.

No caso da presença de clorofila e/ou lipídios, estes são removidos durante a etapa de saponificação.

A determinação cromatográfica com detecção UV/Vis com detector de arranjo de diodos é uma boa ferramenta na identificação dos carotenóides, pois é possível a obtenção do espectro da substância que é bastante característico.

Qualquer outra substância proveniente da matriz, que por ventura venha a coeluir com os carotenóides estudados, apresentará espectro diferente sendo detectada. Esta verificação em cromatografia é denominada avaliação da “pureza de pico”.

A Tabela 13 apresenta os valores dos dois principais picos do espectro de absorção dos carotenóides identificados nas matrizes estudadas para a avaliação da seletividade. A identificação da substância foi feita através do seu tempo de retenção.

Foram escolhidas matrizes de modo que pudessem ser avaliadas as possíveis interferências de substâncias como clorofila (espinafre), lipídios (buriti, açaí e tucumã), amido (milho, batata doce e mandioca), além de matrizes com misturas dos carotenóides estudados em diversos níveis de concentração.

Tabela 13 – Picos máximos do espectro de absorção dos carotenóides identificados nas matrizes avaliadas na seletividade.

Matriz	Violaxantina		Luteína		Zeaxantina		β -criptoxantina		α -caroteno		β -caroteno		Licopeno	
Abóbora	-	-	-	-	-	-	-	-	445,5	473,3	452,7	478,2	-	-
Açaí	438,2	468,4	444,2	473,3	450,3	475,7	-	-	445,4	474,5	451,5	479,4	-	-
Acerola	438,2	467,2	444,2	472,1	-	-	451,5	478,1	445,4	474,5	451,5	478,1	-	-
Batata doce	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	451,5	478,1	-	-
Buriti	-	-	-	-	-	-	-	-	446,7	474,5	451,5	479,4	-	-
Cajá														
Cajú	438,2	468,5	443,1	472,1			451,5	479,4	447,9	474,5	451,5	479,4	-	-
Caqui	-	-	-	-	450,3	478,2	451,5	478,2	-	-	451,5	478,2	472,1	503,7
Cenoura	-	-	444,3	470,9	-	-	-	-	445,5	474,5	451,5	478,2	-	-
Espinafre	438,2	468,5	444,3	473,3	-	-	-	-	-	-	451,5	478,2	-	-
Goiaba vermelha	-	-	-	-	-	-	451,5	476,9	-	-	452,7	479,4	472,1	503,6
Jaca	440,6	469,7	444,3	472,1	-	-	-	-	-	-	450,3	478,2	-	-
Laranjinha de jardim	-	-	445,5	472,1	450,3	477,0	450,3	478,2	-	-	452,7	479,4	-	-
Mamão	439,4	468,4	-	-	-	-	450,3	478,1	-	-	450,3	478,3	472,1	503,6
Mandioca amarela	439,4	468,5	-	-	-	-	-	-	-	-	451,5	478,2	-	-
Manga	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	451,5	479,4	-	-
Maracujá	-	-	445,4	472,1	450,3	475,7	-	-	-	-	451,5	479,4	-	-
Melancia	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	451,5	479,4	472,1	502,4
Melão de São Caetano	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	472,1	503,7
Milho verde	438,2	468,5	444,3	472,1	450,3	478,2	450,3	478,2	-	-	450,3	478,2	-	-
Pimentão amarelo	438,2	468,5	444,3	473,3	-	-	-	-	445,5	474,5	451,5	479,4	-	-
Pimentão vermelho	438,2	468,5	444,3	473,3	-	-	451,5	478,2	-	-	451,5	478,2	-	-
Pupunha vermelha	-	-	444,2	472,1	-	-	-	-	445,4	474,5	451,5	479,4	472,1	503,6
Tangerina	-	-	-	-	449,1	474,5	451,5	478,1	-	-	451,5	478,1	-	-
Tomate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	451,5	478,2	472,1	503,7
Tucumã	438,2	468,4	444,2	473,3	-	-	-	-	-	-	451,5	478,1	-	-

Todos os carotenóides foram identificados pelo *software* de integração através de seu tempo de retenção e foi ajustado um limite de tolerância de 0,5 minuto. As concentrações dos carotenóides nas matrizes variaram de modo que toda a faixa de trabalho fosse testada.

Os valores obtidos para os máximos de absorção dos espectros de UV/Vis mostraram-se com variações aceitáveis e pode-se concluir que não dependeram das matrizes escolhidas.

A Figura 60 apresenta a sobreposição do espectro do padrão com alguns dos espectros obtidos para os sete carotenóides estudados nas diferentes matrizes.

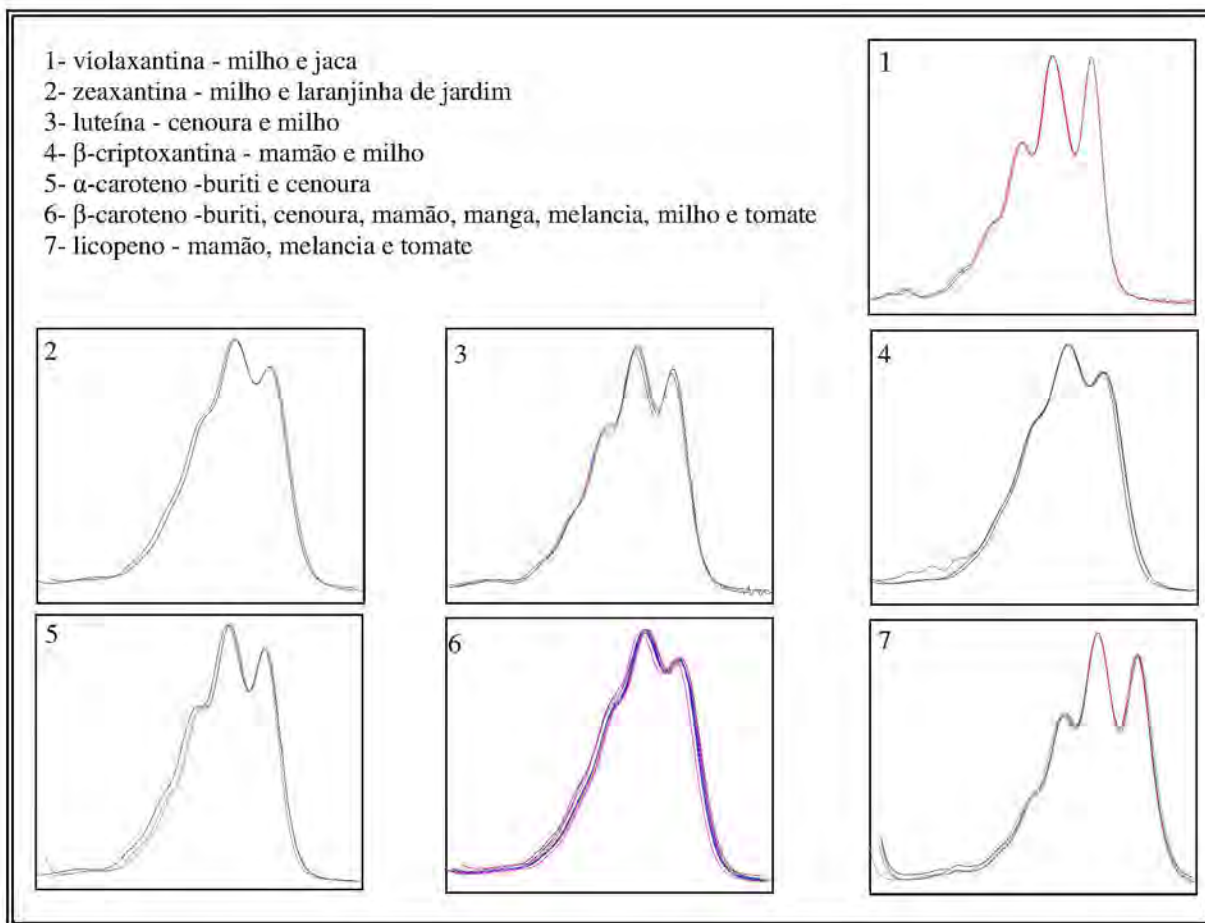


Figura 60 – Sobreposição de espectros de UV/Vis dos carotenóides encontrados nas matrizes.

4.5.2 Curva de calibração e avaliação da linearidade

A Tabela 14 apresenta os valores obtidos para a construção da curva de calibração e gráfico de resíduos da violaxantina.

Tabela 14 – Dados da curva de calibração e gráfico de resíduos da violaxantina.

Ponto da Calibração	Conc Teórica	Conc. Lida	média	desvio padrão	variância	resíduo
C1	0,5	0,535				0,04
	0,5	0,542	0,55	0,017	0,000	0,05
	0,5	0,567				0,07
C2	1,5	1,424				-0,07
	1,5	1,411	1,42	0,007	0,000	-0,08
	1,5	1,417				-0,08
C3	2,5	2,625				0,13
	2,5	2,597	2,61	0,016	0,000	0,10
	2,5	2,595				0,10
C4	3,5	3,539				0,04
	3,5	3,464	3,48	0,059	0,003	-0,03
	3,5	3,422				-0,08
C5	5,0	4,968				-0,03
	5,0	4,907	4,93	0,033	0,001	-0,09
	5,0	4,916				-0,08
C6	6,5	6,366				-0,13
	6,5	6,399	6,37	0,025	0,001	-0,10
	6,5	6,350				-0,15
C7	8,0	8,483				0,48
	8,0	8,061	8,14	0,315	0,099	0,06
	8,0	7,868				-0,13

A Tabela 15 apresenta os valores obtidos para a construção da curva de calibração e gráfico de resíduos da luteína.

Tabela 15 – Dados da curva de calibração e gráfico de resíduos da luteína.

Ponto da Calibração	Conc Teórica	Conc. Lida	média	desvio padrão	variância	resíduo
C1	0,5	0,529	0,55	0,020	0,000	0,04
	0,5	0,541				0,05
	0,5	0,568				0,07
C2	1,5	1,421	1,42	0,005	0,000	-0,07
	1,5	1,415				-0,08
	1,5	1,410				-0,08
C3	2,5	2,624	2,61	0,014	0,000	0,13
	2,5	2,606				0,11
	2,5	2,597				0,10
C4	3,5	3,539	3,48	0,058	0,003	0,04
	3,5	3,460				-0,04
	3,5	3,428				-0,07
C5	5,0	4,977	4,93	0,044	0,002	-0,02
	5,0	4,905				-0,09
	5,0	4,898				-0,10
C6	6,5	6,361	6,37	0,022	0,000	-0,14
	6,5	6,393				-0,11
	6,5	6,349				-0,15
C7	8,0	8,454	8,14	0,290	0,084	0,45
	8,0	8,091				0,09
	8,0	7,880				-0,12

A Tabela 16 apresenta os valores obtidos para a construção da curva de calibração e gráfico de resíduos da zeaxantina.

Tabela 16 – Dados da curva de calibração e gráfico de resíduos da zeaxantina.

Ponto da Calibração	Conc Teórica	Conc. Lida	média	desvio padrão	variância	resíduo
C1	0,5	0,527	0,54	0,021	0,000	0,03
	0,5	0,538				0,05
	0,5	0,568				0,08
C2	1,5	1,446	1,42	0,022	0,000	-0,05
	1,5	1,409				-0,08
	1,5	1,408				-0,09
C3	2,5	2,617	2,60	0,012	0,000	0,12
	2,5	2,600				0,10
	2,5	2,593				0,10
C4	3,5	3,534	3,47	0,055	0,003	0,04
	3,5	3,456				-0,04
	3,5	3,429				-0,07
C5	5,0	4,981	4,93	0,047	0,002	-0,02
	5,0	4,908				-0,09
	5,0	4,894				-0,11
C6	6,5	6,369	6,37	0,025	0,001	-0,13
	6,5	6,398				-0,10
	6,5	6,348				-0,15
C7	8,0	8,454	8,14	0,291	0,084	0,45
	8,0	8,087				0,08
	8,0	7,880				-0,12

A Tabela 17 apresenta os valores obtidos para a construção da curva de calibração e gráfico de resíduos da β -criptoxantina.

Tabela 17 – Dados da curva de calibração e gráfico de resíduos da β -criptoxantina.

Ponto da Calibração	Conc Teórica	Conc. Lida	média	desvio padrão	variância	resíduo
C1	0,5	0,526	0,54	0,021	0,000	0,03
	0,5	0,538				0,05
	0,5	0,566				0,07
C2	1,5	1,424	1,42	0,005	0,000	-0,07
	1,5	1,418				-0,08
	1,5	1,414				-0,08
C3	2,5	2,622	2,61	0,015	0,000	0,13
	2,5	2,598				0,10
	2,5	2,597				0,10
C4	3,5	3,544	3,47	0,063	0,004	0,05
	3,5	3,455				-0,04
	3,5	3,424				-0,07
C5	5,0	4,978	4,93	0,044	0,002	-0,02
	5,0	4,906				-0,09
	5,0	4,900				-0,10
C6	6,5	6,362	6,37	0,022	0,000	-0,14
	6,5	6,395				-0,11
	6,5	6,352				-0,15
C7	8,0	8,442	8,14	0,279	0,078	0,44
	8,0	8,087				0,08
	8,0	7,893				-0,11

A Tabela 18 apresenta os valores obtidos para a construção da curva de calibração e gráfico de resíduos do α -caroteno.

Tabela 18 – Dados da curva de calibração e gráfico de resíduos do α -caroteno.

Ponto da Calibração	Conc Teórica	Conc. Lida	média	desvio padrão	variância	resíduo
C1	0,5	0,522	0,54	0,019	0,000	0,02
	0,5	0,534				0,03
	0,5	0,559				0,06
C2	1,5	1,434	1,43	0,007	0,000	-0,07
	1,5	1,421				-0,08
	1,5	1,424				-0,08
C3	2,5	2,606	2,62	0,015	0,000	0,11
	2,5	2,615				0,11
	2,5	2,636				0,14
C4	3,5	3,439	3,49	0,055	0,003	-0,06
	3,5	3,472				-0,03
	3,5	3,547				0,05
C5	5,0	4,915	4,94	0,036	0,001	-0,09
	5,0	4,915				-0,09
	5,0	4,977				-0,02
C6	6,5	6,345	6,36	0,025	0,001	-0,15
	6,5	6,352				-0,15
	6,5	6,392				-0,11
C7	8,0	7,876	8,13	0,290	0,084	-0,12
	8,0	8,072				0,07
	8,0	8,447				0,45

A Tabela 19 apresenta os valores obtidos para a construção da curva de calibração e gráfico de resíduos do β -caroteno.

Tabela 19 – Dados da curva de calibração e gráfico de resíduos do β -caroteno.

Ponto da Calibração	Conc Teórica	Conc. Lida	média	desvio padrão	variância	resíduo
C1	0,5	0,520				0,02
	0,5	0,529	0,54	0,021	0,000	0,03
	0,5	0,559				0,06
C2	1,5	1,432				-0,07
	1,5	1,422	1,43	0,005	0,000	-0,08
	1,5	1,429				-0,07
C3	2,5	2,610				0,11
	2,5	2,610	2,62	0,016	0,000	0,11
	2,5	2,638				0,14
C4	3,5	3,433				-0,07
	3,5	3,472	3,48	0,059	0,003	-0,03
	3,5	3,549				0,05
C5	5,0	4,924				-0,08
	5,0	4,913	4,94	0,035	0,001	-0,09
	5,0	4,978				-0,02
C6	6,5	6,354				-0,15
	6,5	6,352	6,37	0,022	0,000	-0,15
	6,5	6,391				-0,11
C7	8,0	7,877				-0,12
	8,0	8,061	8,13	0,292	0,085	0,06
	8,0	8,449				0,45

A Tabela 20 apresenta os valores obtidos para a construção da curva de calibração e gráfico de resíduos do licopeno.

Tabela 20 – Dados da curva de calibração e gráfico de resíduos do licopeno.

Ponto da Calibração	Conc Teórica	Conc. Lida	média	desvio padrão	variância	resíduo
C1	0,5	0,500	0,53	0,030	0,001	0,00
	0,5	0,528				0,03
	0,5	0,559				0,06
C2	1,5	1,431	1,42	0,008	0,000	-0,07
	1,5	1,415				-0,08
	1,5	1,420				-0,08
C3	2,5	2,601	2,61	0,025	0,001	0,10
	2,5	2,599				0,10
	2,5	2,643				0,14
C4	3,5	3,474	3,52	0,043	0,002	-0,03
	3,5	3,558				0,06
	3,5	3,531				0,03
C5	5,0	4,905	4,92	0,037	0,001	-0,10
	5,0	4,898				-0,10
	5,0	4,965				-0,04
C6	6,5	6,351	6,37	0,030	0,001	-0,15
	6,5	6,349				-0,15
	6,5	6,401				-0,10
C7	8,0	7,889	8,12	0,269	0,072	-0,11
	8,0	8,067				0,07
	8,0	8,417				0,42

As curvas de calibração dos sete carotenóides estudados e os respectivos coeficientes de correlação (r^2) e equações de reta estão apresentadas na Figura 61.

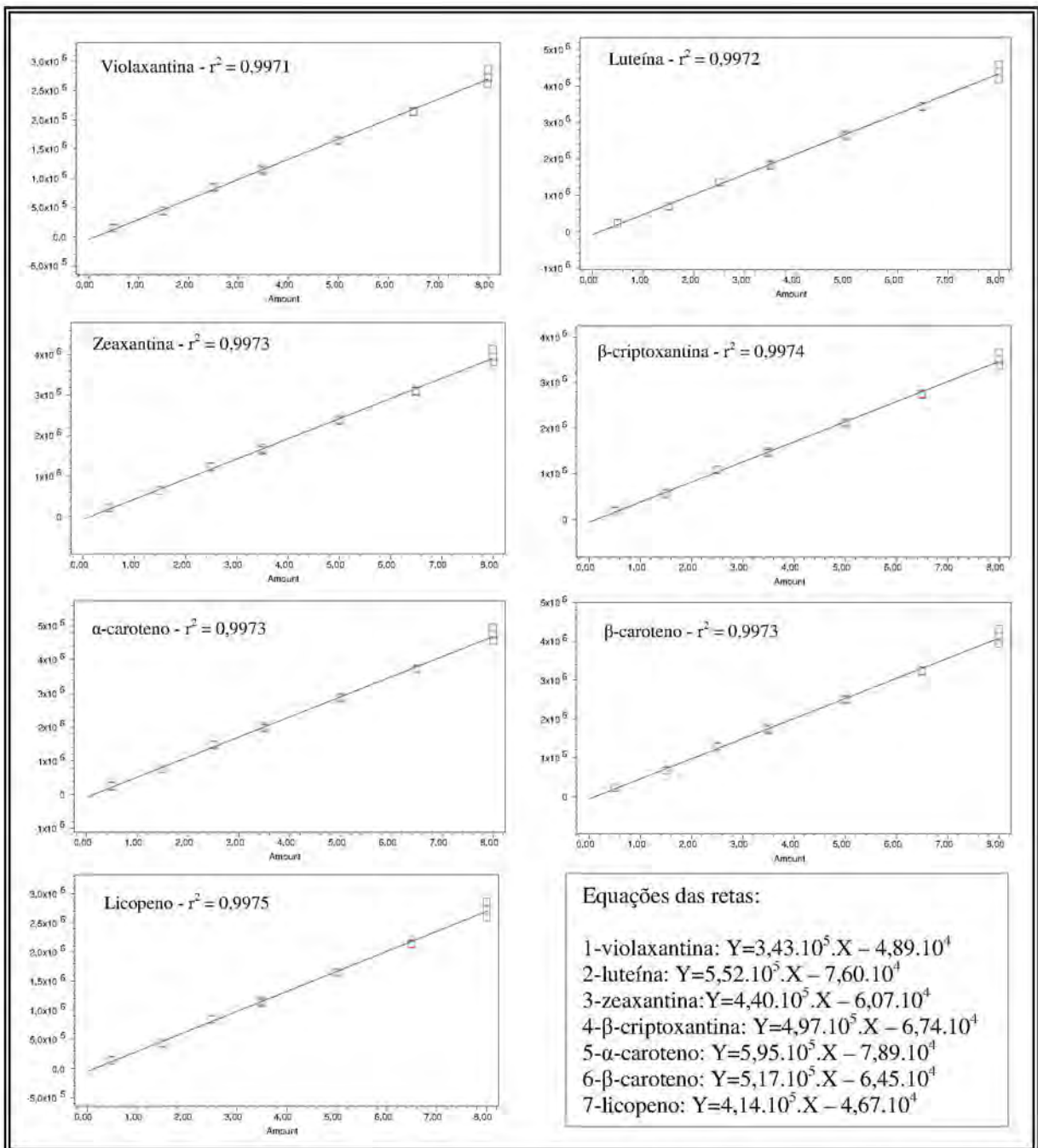


Figura 61 – Curvas de calibração dos seis carotenóides e respectivos coeficientes de correlação (r^2) e equações das retas.

Os coeficientes de correlação e o aspecto das curvas de calibração mostraram-se muito parecidos, isso pode ser justificado pelo fato das curvas terem sido obtidas através de injeções de uma solução contendo os padrões misturados, estando então sujeitas às mesmas condições analíticas.

Todos os coeficientes de correlação ficaram acima de 0,99 e conseqüentemente acima do estabelecido no protocolo de validação (maior que 0,95).

Os gráficos dos resíduos dos desvios padrão mostram que não existem tendências, ou seja, os pontos estão distribuídos acima e abaixo do eixo x de modo aleatório (Figura 62). Desta maneira pode-se afirmar que o método é linear na faixa estudada de 0,5 a 8,0 $\mu\text{g/mL}$ para todos os carotenóides avaliados.

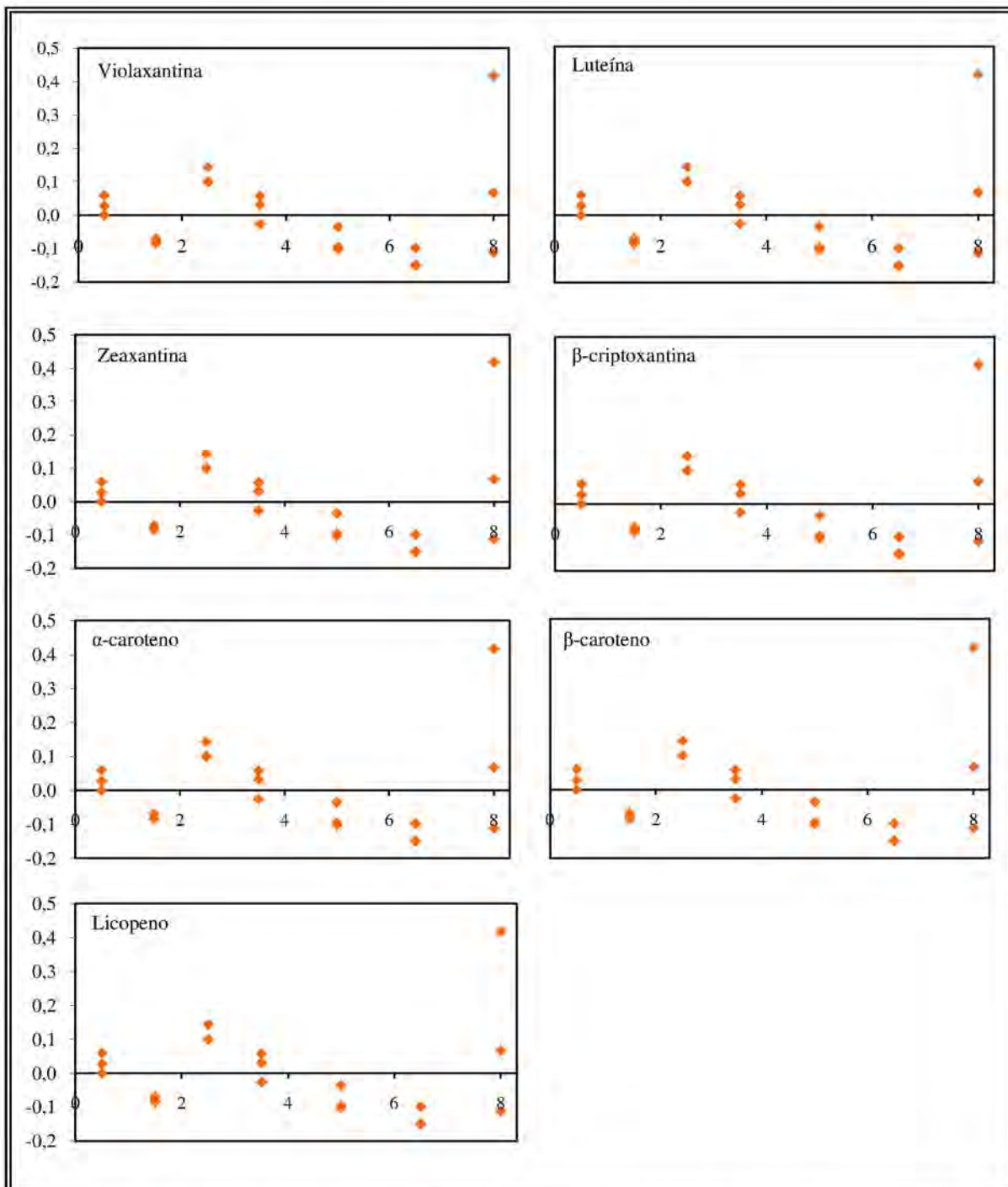


Figura 62 – Gráficos de resíduos dos desvios padrão dos pontos das curvas de calibração.

Do mesmo modo que para as curvas de calibração os gráficos de resíduos apresentaram-se semelhantes.

O último ponto da curva de calibração, referente à concentração de 8,0µg/mL, apresentou a maior variação de desvio padrão, e seria válida a investigação futura para verificação da linearidade acima deste ponto para determinar o limite linear superior da curva de calibração.

Hart & Scott (1995), usando faixa de trabalho de menor concentração, encontraram linearidade para luteína, zeaxantina, β-criptoxantina, licopeno, α-caroteno e β-caroteno na faixa de 0,05 a 4µg/mL.

4.5.3 Faixa de trabalho e faixa linear de trabalho

Como definido em 3.2.7.3, a faixa de trabalho e a faixa linear de trabalho foi pré-definida em 0,5 a 8,0µg/mL na qual o método mostrou-se linear.

A quantificação das amostras deve ser realizada dentro desta faixa de valores e no futuro será avaliada a linearidade logo acima do ponto superior, para confirmar a suspeita deste ponto estar fora da faixa de linearidade conforme sugerido pelos gráficos de resíduos.

4.5.4 Sensibilidade

A sensibilidade do método para os sete carotenóides avaliados encontra-se na Tabela 21. A ordem decrescente de sensibilidade do método é: α-caroteno, luteína, β-caroteno, β-criptoxantina, zeaxantina, licopeno e violaxantina.

Tabela 21 – Sensibilidade do método analítico para os carotenóides estudados.

Carotenóide	Sensibilidade (unid. área / concentração)
Violaxantina	399625
Luteína	640495
Zeaxantina	512395
β-criptoxantina	578193
α-caroteno	691853
β-caroteno	602486
Licopeno	479951

O método mostrou-se 30,6% menos sensível para o licopeno do que para o α-caroteno, este resultado corrobora com o obtido por Dias *et al.* (2008) que encontraram valores para a sensibilidade do licopeno 33% menores do que para o α-caroteno. Como o cromatograma é obtido em comprimento de onda de 450nm e o licopeno apresenta máximo de absorção em 472nm, há perda de sensibilidade.

4.5.5 Limite de detecção

O limite de detecção para os carotenóides luteína, zeaxantina, β -criptoxantina, α -caroteno, β -caroteno e licopeno é de $0,012\mu\text{g/mL}$. O cromatograma da Figura 63 foi obtido com a injeção dos padrões nessa concentração e mostra os picos com tamanho aproximado de três a cinco vezes o sinal do ruído da linha de base.

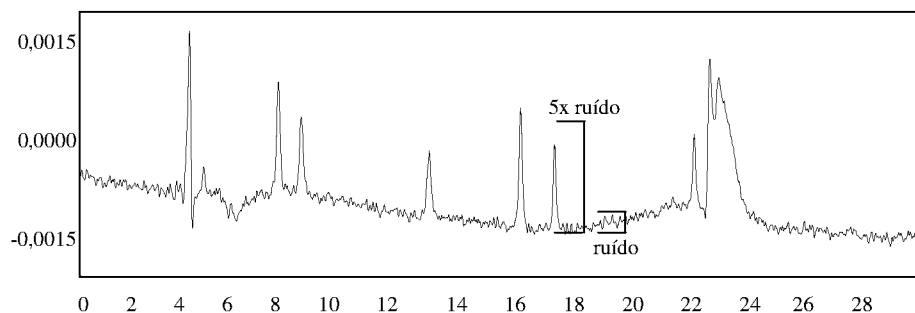


Figura 63 – Estimativa visual do limite de detecção do método analítico.

O valor obtido para o limite de detecção é semelhante aos encontrados na literatura, Hart & Scott (1995) obtiveram os seguintes valores ($\mu\text{g/mL}$): 0,010 para a luteína, 0,015 para zeaxantina, 0,025 para β -criptoxantina, 0,035 para licopeno, 0,040 para α -caroteno e 0,045 para β -caroteno.

4.5.6 Limite de quantificação

O limite de quantificação, conforme estabelecido em 3.2.7.6, é o ponto de menor concentração da curva de calibração, ou seja, $0,5\mu\text{g/mL}$.

O limite de quantificação é aproximadamente 40 vezes superior ao limite de detecção, deste modo pode-se dizer que a faixa de trabalho está longe do limite de detecção e que o método não se trata de análise de traços.

4.5.7 Exatidão

Os resultados do ensaio de recuperação encontram-se na Tabela 22.

Tabela 22 – Recuperação dos carotenóides obtida no ensaio de exatidão (%).

Carotenóide	Concentração teórica (µg/mL)	Concentração obtida (µg/mL)	Recuperação (%)	Recuperação média (%)
Zeaxantina	1,712	1,484	86,7	80,8
	5,992	4,745	79,2	
	11,128	8,509	76,5	
β-criptoxantina	1,983	1,847	93,1	87,5
	6,941	5,857	84,4	
	12,890	10,956	85,0	
α-caroteno	1,849	1,642	88,8	84,0
	6,472	5,291	81,8	
	12,019	9,788	81,4	
β-caroteno	2,079	1,906	91,7	86,3
	7,277	6,046	83,1	
	13,514	11,369	84,1	

Como esperado, os valores de recuperação foram inferiores a 100%, o que pode ser justificado pela labelidade dos carotenóides. A média de recuperação para os carotenóides testados foi de 84,7% e pode ser considerada satisfatória, em geral são aceitos valores entre 70 e 120%.

Apesar de não ser o sistema ideal, pois os carotenóides adicionados não estão nas mesmas condições dos carotenóides encontrados nos alimentos e sim apenas agregados à matriz usada, o teste de recuperação indica que as perdas durante o processo de extração (partição para éter de petróleo, secagem, ressuspensão e análise cromatográfica) estão em níveis aceitáveis.

4.5.8 Precisão

Através dos dados obtidos nas injeções dos padrões analíticos durante a construção da curva de calibração foi possível determinar a repetitividade do método, expressando os resultados através dos valores de coeficiente de variação dos resultados (Tabela 23).

Tabela 23 – Repetitividade do método analítico para os carotenóides estudados.

Carotenóide	Repetitividade (CV) (%)
Violaxantina	3,85
Luteína	3,85
Zeaxantina	3,70
β -criptoxantina	3,71
α -caroteno	3,53
β -caroteno	3,45
Licopeno	3,25
MÉDIA	3,62

O coeficiente médio de variação foi de 3,62% e é inferior ao determinado por Hart & Scott (1995) que foi de 4,1%.

5 CONCLUSÕES

A utilização de fontes naturais e a técnica de cromatografia líquida em coluna aberta permitiram o isolamento de todos os padrões analíticos utilizados nos experimentos deste trabalho.

Foram isolados: violaxantina, luteína, zeaxantina, zeinoxantina, β -criptoxantina, α -caroteno, β -caroteno e licopeno, todos com pureza superior à exigida pela técnica (90%) e, com exceção da zeinoxantina, em quantidades suficientes para a realização do experimento de estabilidade.

Foram descobertas duas fontes naturais mais eficientes que as usuais para o isolamento de alguns padrões. Para a zeaxantina foram utilizados os frutos de laranjinha de jardim (*Solanum pseudocapsicum* L.) e para o licopeno os arilos das sementes do melão de São Caetano (*Mormodica charantia* L.). O licopeno extraído do melão de São Caetano ainda mostrou-se naturalmente com pureza acima de 90%, de modo que não se fez necessário o procedimento de purificação em coluna aberta.

O estudo de estabilidade mostrou que é possível o armazenamento dos padrões em misturas (*pool*) prontas para o uso para calibração cromatográfica. Com exceção da violaxantina, os padrões mostraram-se viáveis para uso durante os 370 dias de avaliação sob as seguintes condições de armazenamento: secos em ampolas seladas a vácuo, com BHT como conservante e mantidas em freezer (-18°C) no escuro.

O estudo de estabilidade mostrou ainda que a ordem decrescente de estabilidade dos carotenóides avaliados é: licopeno, luteína, zeaxantina, β -criptoxantina, α -caroteno, β -caroteno e violaxantina.

O método analítico foi otimizado de modo que a análise cromatográfica que anteriormente durava 45 minutos, passou para 28 minutos. Além do ganho de tempo, com consequente menor gasto de reagentes e menor geração de resíduos, o método apresentou ganhos de sensibilidade e eficiência.

Os parâmetros de validação da metodologia avaliados mostraram que o método implantado e otimizado é seletivo, sensível, linear na faixa de trabalho utilizada (0,5 a 8,0 $\mu\text{g/mL}$), preciso (coeficiente de variação médio 3,6%) e a recuperação média no processo de extração e análise foi de 84,7%.

Os limites de detecção do equipamento foram determinados e a concentração mínima detectada foi de 0,012 $\mu\text{g/mL}$, limite este que está aproximadamente 40 vezes abaixo do limite de quantificação (0,5 $\mu\text{g/mL}$).

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Como proposto no estudo da estabilidade, a avaliação dos padrões do grupo 5 continuará após o encerramento deste trabalho.

Estão sendo conduzidos experimentos com o propósito de preparação de uma amostra padrão, a fim de ser utilizada como controle interno de qualidade.

A experiência adquirida neste primeiro trabalho proporciona uma referência para o estabelecimento de protocolos de validação para outros métodos analíticos do laboratório de cromatografia líquida da Embrapa Agroindústria de Alimentos.

Do mesmo modo, os dados obtidos com o isolamento dos padrões e com o estudo de estabilidade, proporcionaram subsídios para aplicação em outras análises (antocianinas, isoflavonas, etc.).

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BURNS, J.; FRASER, P. D.; BRAMLEY, P. M. Identification and quantification of carotenoids, tocopherols and chlorophylls in commonly consumed fruits and vegetables. **Phytochemistry**, v. 62, p. 939–947, 2003.
- CSER, M. A.; MAJCHRZAK, D.; RUST, P.; SZIKLAI-LASZLO, I.; BOCSKAI, E.; ELMADFA, I. Serum carotenoid and retinol levels during childhood infections. **Annals of Nutrition and Metabolism**, v. 48, p. 156-162, 2004.
- DAVIES, M. B. S.; ALEXANDER, L.; SNELGROVE, D.; SLOMAN, K. A. The effect of dietary pigments on the coloration and behavior of flame-red dwarf gourami, *Colisa lalia*. **Animal Behaviour**, v. 75, p. 1041-1051, 2008.
- DAVIES, N. P.; MORLAND, A. B. Macular pigments: their characteristics and putative role. **Progress in Retinal and Eye Research**. v. 23, p. 533-559, 2004.
- DIAS, M. G.; CAMÕES, M. F. G. F. C.; OLIVEIRA, L. Uncertainty estimation and in-house method validation of HPLC analysis of carotenoids for food composition data production. **Food Chemistry**, v. 109, p. 815-824.
- DUVOLD, T.; BRAVO, J. M.; PALE-GROSDÉMANGE, C.; ROHMER, M. Biosynthesis of 2-C-Methyl-D-erythritol, a putative C₅ intermediate in the mevalonate-independent pathway for isoprenoid biosynthesis. **Tetrahedron Letters**, v. 38, p. 4769-4772, 1997.
- DUVOLD, T.; CALÍ, P.; BRAVO, J. M.; ROHMER, M. Incorporation of 2-C-Methyl-D-erythritol, a putative isoprenoid precursor in the mevalonate-independent pathway, into ubiquinone and menaquinone of *Escherichia coli*. **Tetrahedron Letters**, v. 35, p. 6181-6184, 1997.
- EMENHISER, C.; SANDER, L. C.; SCHWARTZ, S. J. Capability of a polymeric C₃₀ stationary phase to resolve *cis-trans* carotenoid isomers in reversed-phase liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 707, p. 205-216, 1995.
- FRANK, H. A.; YOUNG, A. J.; BRITTON, G.; COGDELL, R. J. **The Photochemistry of Carotenoids**. New York, Boston, Dordrecht, London, Moscow: Kluwer Academic Publishers, 2004. 399p.
- GEISSMAN, T. A.; CROUT, D. H. G. **Organic Chemistry of Secondary Plant Metabolism**. 1969.
- GIULIANO, G.; AQUILANI, R.; DHARMAPURI, S. Metabolic engineering of plant carotenoids. **Trends in Plant Science**, v. 5, p. 406-409, 2000.
- GOLDEN RICE PROJECT HOME PAGE. Quantum leap: Golden Rice accumulates provitamin A (β -carotene) in the grain. Disponível em: < <http://www.goldenrice.org/>> Acesso em: 15 fev. 2009.

HART, D. J.; SCOTT, K. J. Development and evaluation of an HPLC method for the analysis of carotenoids in foods, and the measurement of the carotenoid content of vegetables and fruits commonly consumed in the UK. **Food Chemistry**, v. 54, p. 101-111, 1995.

HIRSCHBERG, J. Carotenoid biosynthesis in flowering plants. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 4, p. 210-218, 2001.

HORNERO-MENDEZ, D.; BRITTON, G. Involvement of NADPH in cyclization reaction of carotenoid biosynthesis. **FEBS Letters**, v. 515, p. 133-136, 2002.

INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial). Orientação sobre validação de métodos de ensaios químicos DOC-CGCRE-008, junho 2007, 24p.

IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry & International Union of Biochemistry). **Nomenclature of Carotenoids (Rules Approved 1974)**. p. 406-431, 1974.

JENKINS, M.; ALLEN, P.; WILKINS, G.; KLOPP, S.; MISKA, K. *Eimeria praecox* infection ameliorates effects of *Eimeria maxima* infection in chickens. **Veterinary Parasitology**. *In press*, 2008.

KIMURA, M.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. A scheme for obtaining standards and HPLC quantification of leafy vegetable carotenoids. **Food Chemistry**, v. 78, p. 389-398, 2002.

KRINSKY, N. I.; JOHNSON, E. J. Carotenoid actions and their relation to health and disease. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 26, p.459-516, 2005.

LIMA, K. S. C.; LIMA, A. L. S.; FREITAS, L. C.; DELLA-MODESTA, R. C.; GODOY, R. L. O. Efeito de baixas doses de irradiação nos carotenóides majoritários em cenouras prontas para o consumo. **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, v. 24(2), p. 183-193, 2004.

LORENZI, H. **Árvores Brasileiras. Manual de Identificação e Cultivo de Plantas Arbóreas Nativas do Brasil**. 4. ed. v. 1. Nova Odessa – SP. Instituto Plantarum de Estudos da Flora LTDA, 2002, 368p.

LORENZI, H.; BACHER, L.; LACERDA, M.; SARTORI, S. **Frutas Brasileiras e Exóticas Cultivadas (de consumo *in natura*)**. Nova Odessa – SP. Instituto Plantarum de Estudos da Flora LTDA, 2006, 640p.

MELÉNDEZ-MARTÍNEZ, A. J.; BRITTON, G.; VICARIO, I. M.; HEREDIA, F. J. Relationship between the colour and the chemical structure of carotenoid pigments. **Food Chemistry**, v. 101, p. 1145-1150, 2007.

RODRIGUEZ, D. B.; TUNG-CHING, L.; CHICHESTER, C. O. Comparative study of the carotenoid composition of the seeds of ripening *Momordica charantia* and tomatoes. **Plant Physiology**, v. 56, p. 626-629, 1975.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. **A Guide to Carotenoid Analysis in Foods**, 2001. 64p.

RODRÍGUEZ-BERNALDO, A. Q.; COSTA, H. S. Analysis of carotenoids in vegetable and plasma samples: A review. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 19, p. 97-111, 2006.

SANDER, L. C.; SHARPLESS, K. E.; PURSCH, M. C₃₀ stationary phases for the analysis of food by liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 880, p. 189-202, 2000.

SANDMANN, G. Carotenoid biosynthesis and biotechnological application. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 385, p.4-12, 2001.

SCOTT, C. E.; ELDRIDGE, A. L. Comparison of carotenoid content in fresh, frozen and canned corn. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 18, p. 551-559, 2005.

SCOTT, K. J.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Pro-vitamin A carotenoid conversion factors: retinol equivalents - fact or fiction ? **Food Chemistry**, v. 69, p. 125-127, 2000.

SOLOMONS, T. W. G. **Organic Chemistry**. 5. ed. New York: John Wiley & Sons, Inc., 1992. 1198p.

THURNHAM, D. I. Bioequivalence of β -carotene and retinol. **Journal of Science of Food and Agriculture**, v. 87, p. 13-39, 2007.

TRAN, T. L. H.; RAYMUNDO, L. C. Biosynthesis of carotenoids in bittermelon at high temperature. **Phytochemistry**, v. 52, p. 275-280, 1999.

TYCZKOWSKI, J. K.; HAMILTON, P. B.; RUFF, M. D. Altered metabolism of carotenoids during pale-bird syndrome in chickens infected with *Eimeria acervulina*. **Poultry Science**, v. 70, p. 2074-2081, 1991.

US INSTITUTE OF MEDICINE, **Dietary Reference Intakes for Vitamin C, Vitamin E, Selenium, and Carotenoids**. National Academic Press, Washington, D.C. 2000.

ZANG, L.; SOMMERBURG, O.; VAN-KUIJK, F. J. G. M. Absorbance changes of carotenoids in different solvents. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 23, p. 1086-1089, 1997.