

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

**CAROTENÓIDES E COMPOSTOS BIOATIVOS: RELAÇÃO COM  
PROPRIEDADES ANTI-RADICAL LIVRE E CORANTE EM FRUTAS  
TROPICAIS**

Gisela Pizarro de Mattos Barreto

Química

Mestre em Tecnologia de Alimentos – FEA – UNICAMP

Profa. Dra. Adriana Zerlotti Mercadante

Orientadora

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

Campinas, 2008

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

B275c	Barreto, Gisela Pizarro de Mattos Carotenóides e compostos bioativos: relação com propriedades anti-radical livre e corante em frutas tropicais / Gisela Pizarro de Mattos Barreto. -- Campinas, SP: [s.n.], 2008.
	Orientador: Adriana Zerlotti Mercadante Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos
	1. Atividade anti-radical livre. 2. Compostos bioativos. 3. Carotenóides. 4. Cor. 5. Frutas tropicais. I. Mercadante, Adriana Zerlotti. II. Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.
	(cars/fea)

Titulo em inglês: Carotenoids and bioactive compounds: relationship between free radical scavenger properties and color in tropical fruits

Palavras-chave em inglês (Keywords): Free-radical scavenger, Bioactive compounds, Carotenoids, Color, Tropical fruits

Titulação: Doutor em Ciência de Alimentos

Banca examinadora: Marta de Toledo Benassi

Célia Maria de Sylos

Veridiana Vera de Rosso

Florinda Orsatti Bobbio

Neura Bragagnolo

Programa de Pós Graduação: Programa em Ciência de Alimentos

**BANCA EXAMINADORA**

---

Profa. Dra. Adriana Zerlotti Mercadante  
Universidade Estadual de Campinas  
Orientadora

---

Profa. Dra. Célia Maria de Sylos  
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho  
Membro

---

Profa. Dra. Florinda O. Bobbio  
Universidade Estadual de Campinas  
Membro

---

Prof. Dra. Marta de Toledo Benassi  
Universidade Estadual de Londrina  
Membro

---

Profa. Dra. Neura Bragagnolo  
Universidade Estadual de Campinas  
Membro

---

Profa. Dra. Veridiana Vera de Rosso  
Universidade Federal de São Paulo  
Membro



## AGRADECIMENTOS

A Profa. Dra. Adriana Z. Mercadante pela dedicação e atenção. Proporcionando, através de seus conhecimentos e orientação, ensinamentos e conceitos valiosos.

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

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

A CAPES pela bolsa de doutorado e apoio financeiro tornando possível a realização deste trabalho.

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

À FAPESP pelo apoio financeiro.

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

Muito Obrigada.



## ÍNDICE

<b>ÍNDICE DE TABELAS</b> .....	xiii
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	xvi
<b>RESUMO GERAL</b> .....	xxi
<b>SUMMARY</b> .....	xxiii
<b>INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	1
<b>OBJETIVOS</b> .....	9
<b>CAPÍTULO 1</b>	
<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	
1. Atividade anti-radical livre .....	13
1.1. Método DPPH .....	15
1.2. Método ABTS .....	17
2. Compostos bioativos em frutas tropicais .....	21
2.1. Ácido ascórbico .....	22
2.2. Compostos fenólicos .....	23
2.3. Carotenóides .....	24
3. Cor, um atributo físico importante nos alimentos .....	30
4. Referências bibliográficas .....	33

**CAPÍTULO 2****CAROTENÓIDES, UMA ANÁLISE SOBRE SUA ATIVIDADE ANTI-RADICAL  
LIVRE E COR**

Resumo .....	43
1. Introdução .....	44
2. Material e Métodos .....	46
2.1. Padrões .....	46
2.2. Reagentes .....	47
2.3. Equipamentos .....	47
2.4. Métodos .....	48
2.4.1. Método anti-radical livre .....	48
2.4.1.1. Padronização da metodologia para os carotenóides ...	49
2.4.2. Determinação dos parâmetros de cor .....	50
2.4.3. Análise estatística .....	51
3. Resultados e Discussão .....	51
3.1. Influência do solvente, oxigênio e temperatura na redução do ABTS	51
3.2. Relação entre atividade anti-radical livre e estrutura de carotenóides	55
3.3. Relação entre as características de cor e estrutura de carotenóides	58



3.4. Relação entre atividade anti-radical livre e parâmetros de cor .....	62
4. Conclusões .....	63
5. Agradecimento .....	64
6. Referências Bibliográficas .....	64

### **CAPÍTULO 3**

#### **COMPOSTOS BIOATIVOS EM DIVERSAS FRUTAS TROPICAIS E CORRELAÇÃO POR ANÁLISE MULTIVARIADA COM A ATIVIDADE ANTIOXIDANTE**

Resumo .....	69
Summary .....	70
1. Introdução .....	71
2. Material e Métodos .....	73
2.1. Amostras .....	73
2.2. Reagentes e Equipamentos .....	74
2.3. Métodos .....	74
2.3.1. Extração .....	74
2.3.2. Determinação de ácido ascórbico .....	75
2.3.3. Determinação de fenóis totais .....	75
2.3.4. Determinação de flavonóides .....	76

2.3.5. Determinação da atividade anti-radical livre .....	76
2.3.6. Determinação de carotenóides totais .....	77
2.3.7. Análise estatística .....	78
3. Resultados e Discussão .....	79
4. Conclusões .....	85
5. Agradecimento .....	86
6. Referências Bibliográficas .....	86

## **CAPÍTULO 4**

### **COMPOSTOS BIOATIVOS EM SUB-PRODUTOS DA CASTANHA DE CAJU**

Resumo .....	93
Abstract .....	94
Introdução .....	95
Material e Métodos .....	96
Material .....	96
Equipamentos .....	97
Métodos .....	98
Análise estatística .....	101
Resultados e Discussão .....	101

Compostos Bioativos .....	101
Atividade anti-radical livre .....	106
Conclusão .....	108
Agradecimento .....	109
Referências Bibliográficas .....	109

## **CAPÍTULO 5**

### **ETHYLENE REGULATION OF CAROTENOID ACCUMULATION DURING PAPAYA FRUIT RIPENING**

Abstract .....	117
1. Introduction .....	118
2. Results and Discussion .....	120
2.1. The effects of treatments with ethylene and 1-MCP on the carotenoid composition during ripening of papaya	120
2.2. Influence of ethylene and 1-MCP treatments on carotenoid biosynthesis pathways	125
2.3. Correlation of carotenoids and colour parameters changes during ripening of treated and untreated papaya fruits	131
3. Conclusion .....	132
4. Experimental .....	133
4.1. Plant Material .....	133

4.2.Methods .....	133
5. Acknowledgments .....	135
6. References .....	135
<b>CONCLUSÃO GERAL .....</b>	<b>141</b>
<b>ANEXOS</b>	
Tabelas complementares do capítulo 2 .....	147
Dados complementares do capítulo 3 .....	151
Supplemental Information 1 .....	159
Supplemental Information 2 .....	163

## ÍNDICE DE TABELAS

### CAPÍTULO 1

**Tabela 1.** Valores da atividade anti-radical livre de diferentes compostos. 20

**Tabela 2.** Composição dos principais carotenóides em caju e mamão papaia. 29

### CAPÍTULO 2

**Tabela 1.** Valores de TEAC dos diferentes carotenóides estudados. 56

### CAPÍTULO 3

**Tabela 1.** Teores de compostos bioativos e atividade anti-radical livre em polpas de frutas tropicais. 79

**Tabela 2.** Correlações entre as variáveis obtidas nas análises efetuadas. 84

### CAPÍTULO 4

**Tabela 1.** Teores de ácido ascórbico (AA), fenóis totais, carotenóides totais e poder anti-radical DPPH<sup>•</sup> dos ingredientes obtidos de bagaço de caju. 102

**Tabela 2.** Características obtidas por HPLC-PDA e composição relativa dos carotenóides presentes nos ingredientes obtidos de bagaço de caju da safra de 2005. 104

**Tabela 3.** Coordenadas de cor das amostras de derivados de caju. 107

## ANEXOS

### TABELAS COMPLEMENTARES DO CAPÍTULO 2

**Tabela 1.** Porcentagem de inibição do  $\beta$ -caroteno (2 a 10 $\mu$ M, concentração final) medida pelo método ABTS, após 10 minutos de reação, sob duas condições: na presença de ar e com saturação de nitrogênio. 147

**Tabela 2.** Porcentagem de inibição do  $\beta$ -caroteno (2 e 10  $\mu$ M, concentração final) medida pelo método ABTS, após 10 minutos de reação, sob duas temperaturas diferentes (30  $^{\circ}$ C e 22  $^{\circ}$ C). 147

**Tabela 3.** Valor da coordenada de cor L\* de diferentes carotenóides em diferentes concentrações e variação do valor L\* entre a menor concentração e a maior concentração ( $\Delta$ L\*). 148

### DADOS COMPLEMENTARES DO CAÍTULO 3

**Tabela 1:** Exportação do total de produtos agrícolas e de frutas e porcentagem de exportação de frutas no Brasil. 151

**Tabela 2:** Exportação de frutas (tonelada líquida) no Brasil durante o período de 1996 a 2006. 152

#### SUPPLEMENTAL INFORMATION 1

**Table 1.** Chromatographic UV-Visible, spectroscopic and mass spectrometric characteristics of carotenoids from *Carica papaya* cv. Solo var. Golden. 159

#### SUPPLEMENTAL INFORMATION 2

**Table 1.** Carotenoid composition from untreated samples of papaya cv. Solo var. Golden, during ripening. 163

**Table 2.** Carotenoid composition from samples of ethylene treated papaya cv. Solo var. Golden during ripening. 164

**Table 3.** Carotenoid composition from samples of 1-MCP treated papaya cv. Solo var. Golden during ripening. 165

## ÍNDICE DE FIGURAS

### CAPÍTULO 1

<b>Figura 1.</b> Aprisionamento do DPPH <sup>•</sup> por um composto antioxidante	15
<b>Figura 2.</b> Formação do radical ABTS	18
<b>Figura 3.</b> Estrutura química do ácido ascórbico	22
<b>Figura 4.</b> Estrutura química de compostos fenólicos	23
<b>Figura 5.</b> Via biossintética dos carotenóides em plantas, a partir do GGPP	26
<b>Figura 6.</b> Diagrama CIELAB	30

### CAPÍTULO 2

<b>Figura 1.</b> Estrutura química de carotenóides	44
<b>Figura 2.</b> Efeito da adição de 200 $\mu$ L de diferentes solventes em 1,8 mL de solução etanólica de ABTS <sup>•+</sup> . Solventes adicionados: acetona (quadrado), THF (círculo), etanol (triângulo para cima), acetato de etila (triângulo para baixo), DCM (x). As barras de erro indicam o desvio padrão da média (n= 2).	52
<b>Figura 3.</b> Atividade anti-radical livre do $\beta$ -caroteno em diferentes concentrações (2 a 10 $\mu$ M) medida pelo método ABTS, com saturação de nitrogênio (triângulo) e na presença de ar (quadrado). As barras de erro indicam o desvio padrão da média (n= 4 para as concentrações 2, 4 e 8 $\mu$ M e n= 2 para as concentrações 3, 6 e 10 $\mu$ M).	53



- Figura 4.** Efeito da temperatura (30 °C coluna branca e 22 °C coluna listrada) na atividade anti-radical livre do  $\beta$ -caroteno medida pelo método ABTS. As barras de erro indicam o desvio padrão da média (n= 2). 54
- Figura 5.** Cinética de reação do  $\beta$ -caroteno em solução etanólica ABTS<sup>•+</sup>. 55
- Figura 6.** Valor de croma (C\*) e hue (h) de diferentes carotenóides em diferentes concentrações (a e b, respectivamente). Carotenóides estudados: 8-apo-carotenal (triângulo cinza), 10-apo-carotenal (triângulo vazado), 12-apo-carotenal (triângulo preto invertido),  $\beta$ -caroteno (círculo preto),  $\beta$ -criptoxantina (círculo cinza), zeaxantina (círculo com cruz) e astaxantina (quadrado preto). 58
- Figura 7.** Localização dos carotenóides no plano a\* b\*. Carotenóides estudados: 8-apo-carotenal (triângulo cinza), 10-apo-carotenal (triângulo vazado), 12-apo-carotenal (triângulo preto invertido),  $\beta$ -caroteno (círculo preto),  $\beta$ -criptoxantina (círculo cinza), zeaxantina (círculo com cruz) e astaxantina (quadrado preto). Os números ao lado dos símbolos indicam a concentração de cada carotenóide ( $\mu$ M). 60
- Figura 8.** Atividade anti-radical livre de diferentes carotenóides, em diferentes concentrações, em função da coordenada de cor croma (C\*). Carotenóides estudados: 8-apo-carotenal (triângulo cinza), 10-apo-carotenal (triângulo vazado), 12-apo-carotenal (triângulo preto invertido),  $\beta$ -caroteno (círculo preto),  $\beta$ -criptoxantina (círculo cinza), zeaxantina (círculo com cruz) e astaxantina (quadrado preto). Os números ao lado dos símbolos indicam a concentração de cada carotenóide ( $\mu$ M). 62

### CAPÍTULO 3

**Figura 1.** Dendrograma, considerando a composição de compostos bioativos (AA, fenóis, flavonóides e carotenóides) e capacidade antioxidante das 18 polpas de frutas analisadas. 82

**Figura 2.** Configuração das amostras obtida pela Análise de Componentes Principais, a partir dos dados de composição de compostos bioativos e capacidade antioxidante das polpas das diferentes frutas analisadas. Projeção geral (a) e detalhe expandido da região circundada pelo quadrado pontilhado (b). 83

**Figura 3.** Projeção das variáveis na Análise de Componentes Principais obtidas a partir dos dados de composição e capacidade antioxidante dos extratos das diferentes frutas analisadas. 83

### CAPÍTULO 4

**Figura1.** Cromatogramas, obtidos por HPLC-PDA, dos carotenóides presentes no retentado (a) e no extrato concentrado (b) de caju. Condições cromatográficas: ver texto. A identificação dos picos encontra-se na Tabela 2. 105

## CAPÍTULO 5

**Figure 1.** Chromatogram, obtained by HPLC, of the carotenoids from *Carica papaya* cv. Golden treated with ethylene and stored for five days. Peak identification: (1) all-trans-neoxanthin, (2) all-trans-violaxanthin, (3) cis-violaxanthin, (4) antheraxanthin, (5) all-trans-lutein, (6) lactucaxanthin, (7) all-trans-zeaxanthin, (8) 5,6-epoxy- $\beta$ -cryptoxanthin, (9) zeinoxanthin, (10) all-trans-rubixanthin, (11) 1,2-epoxy-lycopene, (12) all-trans- $\beta$ -cryptoxanthin, (13) all-trans-lycopene, (14) 13-cis-lycopene, (15) prolycopene, (16) all-trans- $\gamma$ -carotene, (17) cis- $\zeta$ -carotene, (18) all-trans- $\zeta$ -carotene, (19) all-trans- $\beta$ -carotene, (20) phytofluene, (21) phytoene. 121

**Figure 2.** Total carotenoid ( $\mu\text{g}/100\text{g}$ ) content measured during ripening of untreated (control, black column), ethylene treated (striped column) and 1-MCP treated (white column) papaya fruits. The dash line shows the end of gas treatments (ethylene and 1-MCP). 122

**Figure 3.** Scheme of the proposed biosynthetic pathway of carotenoids in papaya fruit during ripening. Numbers in brackets are related to the HPLC peaks. Asterisk indicates that the carotenoids were only detected in some samples when analysed by HPLC-PDA-MS on a C30 column. The dotted arrows indicate pathways that were not observed in the present study. 124

**Figure 4.** Carotenoid concentration ratio of lycopene/phytoene+phytofluene+ $\zeta$ -carotene+cis- $\zeta$ -carotene+cis-lycopene+prolycopene from papaya fruits. Control: black column, ethylene: striped column and 1-MCP: white column. The dash line shows the end of gas treatments 126

**Figure 5.** Carotenoid concentration ratios (A) lycopene/ $\beta$ -carotene+ $\beta$ -cryptoxanthin+zeaxanthin, (B) lycopene/zeinoxanthin+lutein, (C) lycopene/ $\gamma$ -carotene+rubixanthin from papaya fruit. Control: black column, ethylene: striped column and 1-MCP: white column. The dash line shows the end of gas treatments 127

**Figure 6.** Carotenoid concentration ratio of  $\beta$ -cryptoxanthin+zeaxanthin +rubixanthin/ $\gamma$ -carotene+ $\beta$ -carotene, from papaya fruits. Control: black column, ethylene: striped column and 1-MCP: white column. The dash line shows the end of gas treatments. 128

**Figure 7.** Carotenoid concentration ratio of  $\beta$ -cryptoxanthin+zeaxanthin +rubixanthin/antheraxanthin+violaxanthin+cis-violaxanthin+neoxanthin +5,6-epoxy- $\beta$ -cryptoxanthin, from papaya fruits. Control: black column, ethylene: striped column and 1-MCP: white column. The dash line shows the end of gas treatments 129

**Figure 8.** Carotenoid concentration ratio of lycopene/cis-lycopene +prolycopene+cis- $\zeta$ -carotene., from papaya fruits. Control: black column, ethylene: striped column and 1-MCP: white column. The dash line shows the end of gas treatments. 130

**Figure 9.** Carotenoid contents and colour parameters during ripening of untreated (control, black square), ethylene treated (grey lozenge) and 1-MCP treated (grey circle) papaya fruits. Contents of  $\beta$ -cryptoxanthin and  $b^*$  values (graph a), lycopene and  $a^*$  values (graph b). The day before treatment is represented by black triangle. 131

## RESUMO GERAL

O aumento da demanda dos consumidores por maior qualidade de vida tem impulsionado o interesse da indústria de alimentos pelo segmento de alimentos funcionais, definidos como qualquer alimento com potencial para conferir benefícios à saúde do consumidor. Os compostos bioativos, como os carotenóides, compostos fenólicos e ácido ascórbico, presentes em alimentos estão envolvidos nestas ações benéficas.

Inicialmente, foi realizado um estudo com alguns padrões de carotenóides, que não somente apresentam atividade anti-radical livre como também são responsáveis pela cor de vários alimentos. Foi avaliado o comportamento destes carotenóides, em diferentes concentrações, em relação à sua atividade anti-radical livre (ABTS) e parâmetros de cor CIELAB. Os resultados revelaram que, o número de ligações duplas conjugadas e a presença do grupo carbonila influenciaram tanto na atividade anti-radical livre como nos parâmetros de cor dos carotenóides, assim como a concentração.

Posteriormente, para a determinação da atividade anti-radical livre de extratos complexos, pelo método ABTS, foram preparadas no laboratório extratos de polpas de 18 frutas tropicais, aplicando análises estatísticas multivariadas, especificamente Análise de Componentes Principais (ACP) e Análise Hierárquica de Agrupamentos (AHA), para caracterizar e agrupar as 18 polpas de frutas e verificar a correlação entre atividade anti-radical livre e alguns constituintes químicos que apresentam funcionalidade como ácido ascórbico, compostos fenólicos, flavonóides e carotenóides totais. As frutas foram agrupadas em 5 grupos, segundo análise hierárquica de agrupamentos (AHA). Na Análise de Componentes Principais, observou-se que a atividade antioxidante apresentou alta

correlação com os fenóis ( $r = 0,99$ ) e flavonóides ( $r = 0,86$ ) totais, porém apresentou baixa correlação com ácido ascórbico ( $r = 0,02$ ) e carotenóides totais ( $r = 0,08$ ).

Em especial, foi estudado o caju, pois, o processamento de suco a partir do pseudofruto (pedúnculo) de caju gera como subproduto um bagaço, que constitui uma rica fonte de compostos fenólicos, ácido ascórbico (AA) e carotenóides. Considerando que este bagaço pode ser transformado para produzir ingredientes funcionais, o caju clone CCP-076, proveniente da Estação Experimental de Paraipaba (CE) da Embrapa Agroindústria Tropical, foi prensado e o bagaço obtido foi umidificado e novamente prensado até exaustão (retentado), sendo a fase líquida filtrada (extrato bruto) e concentrada (extrato concentrado). O retentado apresentou maior teor de fenóis totais, de carotenóides totais e de atividade anti-radical livre, além de apresentar cor amarela mais intensa. Por outro lado, o extrato concentrado apresentou o maior teor de AA. Os principais carotenóides encontrados, tanto no retentado como nos extratos, foram all-trans- $\beta$ -criptoxantina e all-trans- $\beta$ -caroteno.

Uma outra fruta também analisada em separado foi o mamão papaia (*Carica papaya* cv. Golden) que tem uma grande demanda de exportação para os mercados da América do Norte e Europa; entretanto, é uma fruta climatérica sendo susceptível a perdas após a colheita. O mamão-papaia foi dividido em três grupos: controle (sem tratamento), etileno (tratamento com etileno) e 1-metilciclopropeno (1-MCP) (tratamento com 1-MCP). A composição de carotenóides e os parâmetros de cor de todos os grupos foram determinados durante o amadurecimento da fruta. A presença do gás etileno e 1-MCP reduziram o teor de carotenóides e favoreceram a biossíntese de carotenóides acíclicos. Entretanto, mesmo com menor teor de carotenóides que o grupo controle, os valores de cor ( $a^*$ ,  $b^*$ ) foram similares nos três grupos durante o amadurecimento.

## SUMMARY

The increased demand for high life quality has been associated to healthy food, increasing the industry interest for functional foods, which are defined as any food or bioactive compounds with potential to be benefic for the consumer health. The bioactive compounds found in foods, such as carotenoids, phenolic compounds and ascorbic acid (AA) are involved with these benefic actions.

Firstly, some carotenoid standards in different concentrations were evaluated regarding not only their radical scavenger activity, but also their color parameters (CIELAB), since these pigments are responsible for the color of many foods. The results showed that the number of conjugated double bonds, presence of carbonyl group and concentration influenced both the radical scavenger activity and the color parameters.

After that, the radical scavenger activity of complex extracts were determined, by ABTS assay, obtained from pulps extracts prepared in the laboratory from 18 tropical fruit applying Principal Component Analysis (PCA) and Hierarchical Cluster Analysis (HCA) to characterize and grouped the 18 extracts, as well as to correlate radical scavenger and the bioactive compounds, such as AA, phenolic compounds, flavonoids and total carotenoids. The fruits were divided into five groups, following Hierarchical Cluster Analysis (HCA). Principal Component Analysis (PCA) indicated that antioxidant activity showed high correlation to total phenolic compounds ( $r= 0.99$ ) and flavonoids ( $r= 0.86$ ); however, correlation was found to be very poor with AA ( $r= 0.02$ ) and total carotenoid levels ( $r= 0.08$ ).

The cashew-apple was specially evaluated since the processing of juice from the cashew-apple fruit generates a pomace that constitutes a rich source of phenolic compounds, AA and carotenoids. Considering that this pomace can be processed into functional ingredients, the cashew-apple clone CCP-076, from Estação Experimental de Paraipaba (CE) at Embrapa Agroindústria Tropical, was pressed and then the pomace formed was humidified and pressed again until exhaustion (retentado), followed by filtration (raw extract) and concentration (concentrated extract). The retentado presented significantly higher total phenol and total carotenoid contents, higher free radical scavenger activity, as well as higher yellow color intensity, indicated by higher  $b^*$  and chroma ( $C^*$ ) values. On the other hand, the concentrated extract showed the highest AA content. The major carotenoids identified in both retentado and extracts were all-trans- $\beta$ -cryptoxanthin and all-trans- $\beta$ -carotene. These results showed that the retentado has a good potential to be applied as a functional ingredient.

Another fruit also specially analyzed was the papaya fruit (*Carica papaya* cv. Golden) that has a great export demand to North American and Europe markets; however, since it is a climacteric fruit, it is susceptible to postharvest losses. The papaya fruits were divided into three groups: control (without treatment), ethylene (treated with ethylene) and 1-methylcyclopropene (1-MCP) (treated with 1-MCP). In all groups, carotenoid composition, carried out by HPLC, and color parameters were evaluated during ripening. The treatment with ethylene and 1-MCP decreased carotenoid accumulation and enhanced acyclic carotenoid biosynthesis. Although the gas treated fruits presented lower carotenoid content as compared to the control, the color values ( $a^*$ ,  $b^*$ ) were similar in treated and non-treated fruits during ripening.



## INTRODUÇÃO GERAL

O alimento ou ingrediente que alegar propriedades funcionais ou de saúde pode, além de funções nutricionais básicas, quando se tratar de nutriente, produzir efeitos metabólicos e ou fisiológicos e ou efeitos benéficos à saúde (ANVISA, 1999). O interesse crescente da indústria de alimentos nesse segmento de produtos tem sido impulsionado pelo aumento da demanda dos consumidores por maior qualidade de vida (Belem, 1999). Dentre os compostos com propriedades funcionais em alimentos, um grande destaque tem sido dado aos antioxidantes, que ajudam a proteger o organismo humano contra o estresse oxidativo (Scalbert & Williamson, 2000). O consumo de antioxidantes na dieta tem sido associado a reduções na ocorrência de mutações e doenças degenerativas, tais como câncer e doenças cardiovasculares, assim como, de retardamento do envelhecimento celular (Lindley, 1998).

Já é reconhecida a associação entre a ingestão de frutas e vegetais e a diminuição do risco de desenvolvimento de diversas desordens crônico-degenerativas, tais como cânceres, inflamações, doenças cardiovasculares, catarata, degeneração macular e outras, sendo os polifenóis, ácido ascórbico e carotenóides os grupos de compostos bioativos aos quais tem sido atribuídas tais ações (Feusner, 1996; Feskanich et al., 2000; Michels et al., 2000).

Os polifenóis constituem uma das classes de antioxidantes mais conhecidas e estudadas, recebendo muita atenção dos consumidores e das indústrias de alimentos, já que várias pesquisas epidemiológicas associam o consumo de alimentos ricos em polifenóis com a redução de câncer e doenças degenerativas (Cao et al., 1998; Erlund et al., 2002).

O ácido ascórbico, ou vitamina C, também tem papel importante no organismo. Vários estudos epidemiológicos tem demonstrado uma relação direta

entre uma dieta rica em ácido ascórbico e prevenção de certos tipos de câncer (Flagg et al., 1995; Machlin, 1995; Ocke, citado por Feusner, 1996). Este composto está envolvido no metabolismo da tirosina, ácido fólico e triptofano, assim como, contribui na síntese de aminoácidos como a carnitina e catecolamina que regula o sistema nervoso (Iqbal et al., 2004). Ele também atua como um importante antioxidante para o ser humano e nos alimentos.

Os carotenóides são compostos, com cor variando do amarelo ao vermelho, cuja estrutura básica é um tetraterpeno com 40 átomos de carbono, formado por oito unidades isoprenóides de cinco carbonos. Tradicionalmente conhecidos como pigmentos do reino vegetal, os carotenóides são também encontrados em animais, algas e microorganismos. O papel nutricional mais importante e conhecido dos carotenóides, especialmente  $\beta$ -caroteno, é a sua atividade como pró-vitamina A. Outras importantes ações biológicas estão associadas com a capacidade de agir como antioxidante promovendo proteção contra certos tipos de câncer, doenças cardiovasculares, cataratas e degeneração macular, como também melhora do sistema imunológico (Van den Berg et al., 2000; Gale et al., 2001; Maoka et al., 2001).

Um dos alimentos que contém diversos compostos bioativos são as frutas. O aumento do consumo de frutas pode estar correlacionado ao fato delas estarem associadas a baixa incidência de doenças degenerativas (Feskanich et al., 2000; Michels et al., 2000). O Brasil, apesar de ser o terceiro maior produtor mundial de frutas frescas, tem uma inserção inexpressiva no mercado internacional. Dentre os principais produtos, destacam-se a laranja, melão, manga, banana, maçã e mamão papaia, que perfizeram 85% do total das exportações em 1999. Com exceção do mamão papaia, que apresentou uma trajetória crescente, todos os demais produtos tiveram uma evolução irregular ao longo dos anos 90 (Lacerda et al., 2004). De acordo com o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento a exportação do mamão papaia em 1996 foi de 5.693 toneladas e em 2006 de 30.163 toneladas, portanto a exportação de mamão papaia quintuplicou em dez

anos ([www.agricultura.gov.br](http://www.agricultura.gov.br)). Entretanto, a participação brasileira nas exportações de frutas correspondeu a 4,45% das exportações, em 2004 ([www.agricultura.gov.br](http://www.agricultura.gov.br)).

O controle do amadurecimento do mamão (*Carica papaya* L.) é fundamental para o aumento na vida útil após a colheita, pois, as transformações resultantes do amadurecimento ocorrem rapidamente após a colheita do fruto, desencadeadas pelo aumento na produção do etileno e respiração. Em determinado estágio da maturação, o etileno se liga ao seu receptor na célula, um complexo protéico-enzimático, e desencadeia uma série de eventos que culminam com o amadurecimento e senescência do fruto (Lelièvre et al., 1997). Vários compostos são capazes de bloquear a ligação do etileno ao seu receptor na célula, causando inibição dos efeitos deste hormônio, como é o caso do 1- metilciclopropeno (1-MCP). O 1-MCP liga-se fortemente ao sítio do etileno, evitando a ligação e a ação do mesmo (Sisler et al., 1996). Em alguns estudos foi verificado que o 1-MCP, além de restringir a ação do etileno, pode reduzir sua produção e retardar o amadurecimento de muitos frutos climatérios como pêra (Lelièvre et al., 1997), tomate (Nakatsuka et al., 1997), maçã (Fan et al., 1999), banana (Jiang et al., 1999), abacate (Fan et al., 2000), e mamão papaia (Moya-Léon et al., 2004).

Uma outra fruta que tem um papel econômico e social de destaque no Brasil é o caju (*Anacardium occidentale* L.), principalmente na região Nordeste, que responde por cerca de 94% da produção brasileira, principalmente nos estados do Ceará, Piauí e Rio Grande do Norte (Souza, et al., 2007). A industrialização do caju pode ser dividida em 2 grandes setores: beneficiamento da castanha e processamento do pedúnculo. O beneficiamento da castanha visa principalmente a produção da amêndoa da castanha de caju, enquanto que o processamento do pedúnculo tem como produto industrial mais significativo o suco de caju. Na composição química do pedúnculo do caju, podem ser destacadas três classes de compostos: carotenóides, ácido ascórbico e compostos fenólicos (Assunção & Mercadante, 2003; Hassimotto et al., 2005) que permanecem

presentes no bagaço, sub-produto do processo de extração do suco de caju. O aproveitamento tanto do pedúnculo como do bagaço é extremamente importante, pois estes constituem uma fonte de compostos de alto valor agregado em razão de suas propriedades funcionais em alimentos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASSUNÇÃO, R.B.; MERCADANTE, A.Z. Carotenoids and ascorbic acid composition from commercial products of cashew apple (*Anacardium occidentale* L.). **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 16, p. 647-657, 2003.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria nº 18, de 30 de abril de 1999. Diretrizes para utilização da alegação de propriedades funcionais ou de saúde.

BELEM, M.A.F. Application of biotechnology in the product development of nutraceuticals in Canada. **Trends in Food Science and Technology**, v. 10, p. 101-106, 1999.

CAO, G.; RUSSELL, R.M.; LISCHNER, N.; PRIOR, R.L. Serum antioxidant capacity is increased by consumption of strawberries, spinach, red wine or vitamin C in elderly women. **Journal of Nutrition**, v. 128, p. 2383-2390, 1998.

ERLUND, I.; SILASTE, M.L.; ALFTHAN, G.; RANTALA, M.; KESANIEMI, Y.A.; ARO, A. Plasma concentrations of the flavonóides hesperetin, naringenin and quercetin in humans subjects following their habitual diets, and diets high or low in fruit and vegetables. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 56, p. 891-898, 2002.

FAN, X.; ARGENTA, L.; MATTHEIS, J.P. inhibition of ethylene action by 1-methylcyclopropene prolongs storage life of apricots. **Postharvest Biology and Technology**, v. 20, p. 135-142, 2000.

FAN, X.; BLANKENSHIP, S.M.; MATTHEIS, J.P. 1-methylcyclopropene inhibits apple ripening. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 124, p. 690-695, 1999.

FESKANICH, D.; ZIEGLER, R.G.; MICHAUD, D.S.; GIOVANNUCCI, E.L.; SPEIZER, F.E.; WILLETT, W.C.; COLDITZ, G.A. Prospective study of fruit and vegetable consumption and risk of lung cancer among men and women. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 92, p. 1812–1823, 2000.

FEUSNER, J. The role of ascorbic acid in the prevention of cancer. **Nutrition Bytes**, v. 2, p. 1-3, 1996.

GALE, C.R.; HALL, N.F.; PHILLIPS, D.I.W.; MARTIN, C.N. Plasma antioxidant vitamins and carotenoids and age-related cataract. **Ophtalmology**, v. 108, p. 1992-1998, 2001.

HASSIMOTTO, N.M.A.; GENOVESE, M.I.; LAJOLO, F.M. Antioxidant activity of dietary fruits, vegetables, and commercial frozen fruit pulps. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 2928-2935, 2005.

- IQBAL, K.; KHAN, A.; KHATTAK, M.A.K. Biological significance of ascorbic acid (vitamin C) in human health – a review. **Pakistan Journal of Nutrition**, v. 3, p. 5-13, 2004.
- JIANG, Y.; JOYCE, D.C.; MACNISH, A.J. Extension of the shelf life of banana fruit by 1-methylcyclopropene in combination with polyethylene bags. **Postharvest Biology and Technology**, v. 16, p. 187-193, 1999.
- LACERDA, M.A.D.; LACERDA, R.D.; ASSIS, P.C.O. A participação da fruticultura no agronegócio brasileiro. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v. 4, p. 1-9, 2004.
- LELIÈVRE, J.M.; LATCHÉ, A.; JONES, B.; BOUZAYEN, M.; PECH, J.C. Ethylene and fruit ripening. **Physiologia Plantarum**, v. 101, p. 727-739, 1997.
- LINDLEY, M.G. The impact of food processing on antioxidants in vegetable oils, fruits and vegetables. **Trends in Food Science and Technology**, v. 9, p. 336-340, 1998.
- MAOKA, T.; MOCHIDA, K.; KOZUKA, M.; ITO, Y.; FUJIWARA, Y.; HASHIMOTO, K.; ENJO, F.; OGATA, M.; NOBUKUNI, Y.; TOKUDA, H.; NISHINO, H. Cancer chemopreventive activity of carotenoids in the fruits of red paprika *Capsicum annum* L. **Cancer Letters**, v. 172, p. 103-109, 2001.
- MICHELS, K.B.; GIOVANNUCCI, E.; JOSHIPURA, K.J.; ROSNER, B.A.; STAMPFER, M.J.; FUCHS, C.S.; COLDITZ, G.A.; SPEIZER, F.E.; WILLETT, W.C. Prospective study of fruit and vegetable consumption and incidence of colon and rectal cancers. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 92, p. 1740-1752, 2000.

MOYA-LEÓN, M.A.; MOYA, M.; HERRERA, R. Ripening of mountain papaya (*Vasconcellea pubescens*) and ethylene dependence of some ripening events. **Postharvest Biology and Technology**, v. 34, p. 211-218, 2004.

NAKATSUKA, A.; SHIOMI, S.; KUBO, Y.; INABA, A. Expression and internal feedback regulation of ACC synthase and ACC oxidase genes in ripening tomato fruit. **Plant and Cell Physiology**, v. 38, p. 1110-1130, 1997.

SCALBERT, A.; WILLIAMSON, G. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. **Journal of Nutrition**, v. 130, p. 2073S-2085S, 2000.

SISLER, E.C.; SEREK, M.; DUPILLE, E. Comparison of cyclopropene, 1-methylcyclopropene, and 3,3-dimethylcyclopropene as ethylene antagonist in plants. **Plant Growth Regulation**, v. 18, p. 169-174, 1996.

SOUSA, L.B.; FEITOZA, L.L.; GOMES, R.L.F.; LOPES, A.C.A.; SOARES, E.B.; SILVA, E.M.P. Aspectos de biologia floral de cajueiros anão precoce e comum. **Ciência Rural**, v. 37, p. 882-885, 2007.

VAN DEN BERG, H.; FAULKS, R.; GRANADO, H.F.; HIRSCHBERG, J.; OLMEDILLA, B.; SOUTHON, S.; STHAL, W. The potential for the improvement of carotenoid levels in foods and the likely systemic effects. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 80, p. 880-912, 2000.

[www.abricultura.gov.br](http://www.abricultura.gov.br). Acesso em 25 de abril de 2007.





## OBJETIVOS

Tendo em vista a importância da presença de compostos com propriedades funcionais em alimentos, como os antioxidantes, e a influência da cor na aceitação de produtos alimentícios, o presente trabalho tem como objetivo:

1. Avaliar a influência de solventes, temperatura, oxigênio e a concentração na atividade anti-radical livre de carotenóides, bem como na caracterização cromática,
2. Correlacionar os teores de carotenóides totais, ácido ascórbico, fenóis totais, flavonóides totais com atividade anti-radical em várias frutas tropicais,
3. Avaliar os fenóis totais, ácido ascórbico, carotenóides totais, atividade anti-radical livre, composição relativa de carotenóides e cor em ingredientes obtidos a partir do bagaço de caju.
4. Investigar os efeitos dos tratamentos com etileno e 1- metilciclopropeno (1-MCP) sobre o conteúdo e composição de carotenóides durante o amadurecimento do mamão papaia.



# **CAPÍTULO 1**

## **REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**



## 1. ATIVIDADE ANTI-RADICAL LIVRE

Em alimentos, os antioxidantes podem ser definidos como “substâncias que em pequenas quantidades são capazes de prevenir ou retardar a oxidação de materiais facilmente oxidáveis como os lipídeos” (Chipault, 1962; citado por Frankel & Meyer, 2000). Já em sistemas biológicos, a definição pode ser estendida para “qualquer substância que esteja presente em baixas concentrações quando comparadas à de um substrato oxidável, que retarda ou previne a oxidação deste substrato” (Halliwell, 1990; citado por Frankel & Meyer, 2000). Na legislação brasileira ([www.anvisa.gov.br/](http://www.anvisa.gov.br/)), antioxidante é definido como “substância que retarda o aparecimento de alteração oxidativa no alimento”.

Os artigos científicos encontrados na literatura também utilizam diversos termos para descrever a atividade antioxidante, tais como eficiência, capacidade, potencial e poder, dentre outros. Roginsky & Lissi (2005) definiram atividade antioxidante como a capacidade de um composto (ou mistura) em inibir a degradação por oxidação, como por exemplo, a peroxidação lipídica. Estes mesmos autores distinguem capacidade antioxidante e reatividade, sendo que o primeiro informa a duração da ação antioxidante, enquanto que a reatividade caracteriza a dinâmica do início da oxidação a uma certa concentração do composto (ou mistura) antioxidante. Por outro lado, Huang et al. (2005) definem atividade antioxidante como a reatividade química em certas condições específicas. Levando em consideração a medida analítica realizada, estes autores também recomendam a utilização de termos específicos, tais como capacidade seqüestradora de radical peroxila, atividade anti-radical livre e capacidade de redução do íon férrico, ao invés do termo geral capacidade antioxidante total.

Em relação à oxidação em cadeia, outra importante definição é a atividade anti-radical livre que é determinada pela reatividade de um antioxidante com um radical livre. Os testes para medir a atividade anti-radical livre em alimentos e sistemas biológicos podem ser divididos em dois grupos: métodos diretos e indiretos (Roginsky & Lissi, 2005).

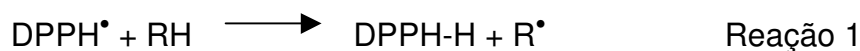
Os métodos diretos avaliam a peroxidação lipídica no qual sob condições padronizadas usa-se um substrato (lipídio, lipoproteína) e mede-se o grau de inibição da oxidação. Estes métodos permitem a observação do processo oxidativo, sendo que, os mais utilizados são: TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico) e dienos conjugados (Roginsky & Lissi, 2005).

Os métodos indiretos medem a habilidade de aprisionar (scavenger) radicais livres e podem ser empregados na avaliação da capacidade anti-radical livre de compostos puros e de extratos complexos. Estes métodos estão baseados na medida do consumo de radicais livres estáveis quando é adicionado um agente antioxidante à solução que irá provocar o decréscimo na concentração do radical livre. Devido à estabilidade, facilidade de manipulação e simplicidade de procedimento, os radicais mais utilizados são derivados do 1,1'-difeníl-2-picrilidrazilo (DPPH) e do ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina)-6-sulfônico (ABTS) (Roginsky & Lissi, 2005).

As diferenças em termos de substrato, metodologia, condições de reação e quantificação, tornam extremamente difícil à comparação entre os resultados obtidos por diferentes métodos de avaliação da atividade anti-radical livre.

### 1.1. Método DPPH

Segundo Brand-Williams et al. (1995), a atividade antioxidante de um composto ou extrato pode ser estimada após sua adição em solução metanólica de DPPH. Na presença de antioxidante (AH) ou espécies radicais ( $R^\bullet$ ) o radical DPPH ( $DPPH^\bullet$ ) é reduzido (Reações 1 e 2), e esta redução é acompanhada pelo monitoramento do decréscimo da absorbância a um determinado comprimento de onda (515 nm).



O  $DPPH^\bullet$  é formado diretamente em solução, porém pode ser solubilizado somente em meio orgânico, especialmente em meio alcoólico. O decréscimo da absorbância devido ao aprisionamento do  $DPPH^\bullet$  por um composto com atividade anti-radical livre resulta na mudança de cor do roxo para o amarelo, conforme Figura 1 (Yamaguchi et al., 1998).

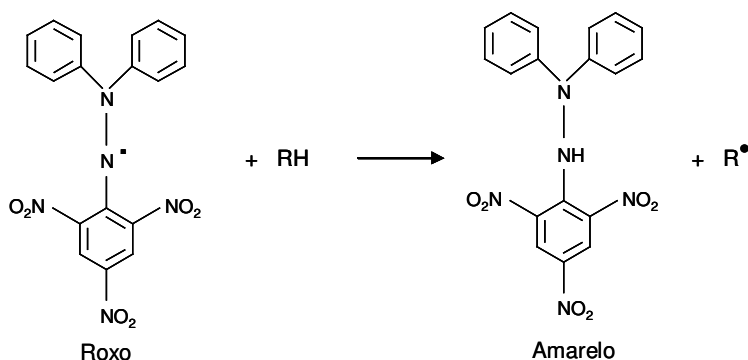


Figura 1. Aprisionamento do  $DPPH^\bullet$  por um composto antioxidante.

Com o decréscimo da absorvância é possível determinar a porcentagem remanescente de DPPH<sup>•</sup>, que será proporcional à concentração do antioxidante. Através desta porcentagem será determinada a atividade anti-radical livre que pode ser expressa pelo valor EC<sub>50</sub>. Este valor é definido como a quantidade de antioxidante necessária para reduzir a concentração inicial de DPPH<sup>•</sup> em 50 %. Sanchez-Moreno e colaboradores (1998) propuseram um outro parâmetro para expressar a capacidade antioxidante, chamado eficiência anti-radical (AE), que é calculado conforme equação 1.

$$AE = \left( \frac{1}{EC_{50}} \right) T_{EC_{50}} \quad \text{Equação 1}$$

$T_{EC_{50}}$  - tempo necessário para atingir a concentração EC<sub>50</sub>

A velocidade da reação de um antioxidante com o DPPH<sup>•</sup> depende da natureza do antioxidante testado (Brand-Williams et al., 1995). Compostos como o ácido ascórbico, reagem rapidamente com o DPPH<sup>•</sup>, em menos de 1 minuto a absorvância atinge a estabilidade. Por outro lado, compostos como o  $\delta$ -tocoferol reagem em aproximadamente 30 minutos, e o guaiacol, ainda mais lento, chega a demorar mais de 1 h para ter a absorvância estabilizada. De acordo com estes resultados, é evidente que a interação entre o composto antioxidante com o DPPH<sup>•</sup> depende da estrutura química do composto, principalmente do número de grupos hidroxílicos livres.



Outro fator importante é verificar a região do visível na qual o radical apresenta maior absorção para evitar interferência. No caso do método DPPH este problema pode ocorrer, por exemplo, na presença de carotenóides, pois o DPPH apresenta absorbância máxima a 515 nm, e esta região é próxima a de maior absorção dos carotenóides. Já no caso do método ABTS, o problema é menos sério para carotenóides, pois a absorbância máxima do radical ocorre a 734 nm.

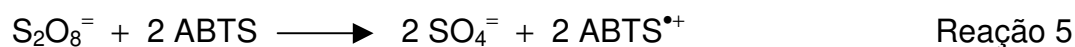
## 1.2. Método ABTS

Compostos azo (R-N=N-R) são comumente usados como iniciadores em reações com antioxidantes, como por exemplo, o ABTS (Frankel & Meyer, 2000). A vantagem do método ABTS é sua simplicidade que permite ser utilizado em determinações de rotina em laboratório. Porém, o resultado expressa a capacidade da amostra em reagir com o radical ABTS (ABTS<sup>•+</sup>) e não a capacidade de inibir um processo oxidativo (Roginsky & Lissi, 2005).

O método ABTS, primeiramente sugerido por Miller e colaboradores (1993), foi baseado na ativação da metimioglobina agindo como peroxidase na presença de peróxido de hidrogênio formando o radical ferrimioglobina, o qual oxidava o ABTS formando o ABTS<sup>•+</sup>. Porém, Rice-Evans & Miller (1997) reportaram uma outra forma para gerar o radical ABTS por redução química utilizando dióxido de manganês. Enquanto, Re et al. (1999) propuseram uma modificação deste método, onde o radical é gerado diretamente por persulfato de potássio. Segundo Henríquez et al. (2002), a reação entre o ABTS e o persulfato de potássio para a formação do radical pode ocorrer conforme a Reação 3, enquanto que na presença de excesso de ABTS, o radical sulfato poderá reagir de acordo com a Reação 4.



Portanto, a reação global pode ser expressa conforme a Reação 5.



De acordo com Re et al. (1999), o radical pré-formado  $\text{ABTS}^{\bullet\oplus}$  gerado pela oxidação do ABTS com persulfato de potássio forma um cromóforo verde azulado de cor intensa com absorção máxima a 645, 734 e 815 nm, conforme Figura 2 (Thomas et al., 2004).

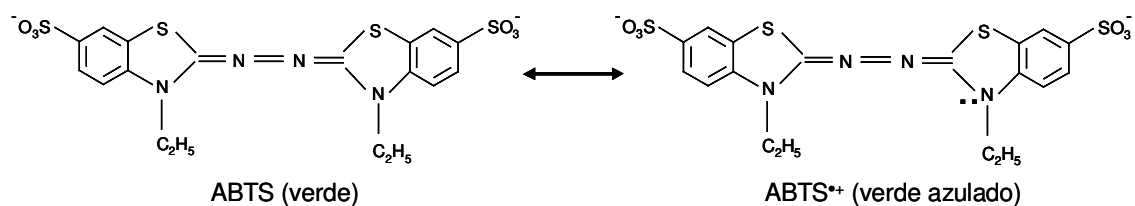


Figura 2. Formação do radical ABTS.

A oxidação do ABTS começa imediatamente após a adição do persulfato de potássio, mas a absorvância somente será máxima e estável após 6 horas de reação. Depois de formado, o  $ABTS^{\bullet+}$  pode ser reduzido na presença de antioxidantes doadores de hidrogênio perdendo sua coloração. Através da redução do  $ABTS^{\bullet+}$  será determinada a porcentagem de inibição em função da concentração do antioxidante e o cálculo da atividade anti-radical livre será relativo à reatividade do padrão Trolox, composto análogo à vitamina E, sob as mesmas condições. Sendo assim, o resultado é expresso por TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity).

O método com persulfato de potássio tem algumas vantagens em relação ao método que utiliza a ferrimioglobina para a formação do radical. Primeiro, a reação química forma diretamente o radical sem o envolvimento de um radical intermediário. Segundo, o radical é formado antes da adição do antioxidante. E terceiro, pode ser aplicado em sistemas hidrofílico e lipofílico. Entretanto, alta concentração de antioxidante poderá exigir muito  $ABTS^{\bullet+}$  resultando em uma absorvância inicial muito alta. Por outro lado, baixa concentração de antioxidante poderá resultar em um decréscimo muito pequeno da absorvância do  $ABTS^{\bullet+}$  originando uma medida pouco exata. Portanto, a concentração mínima de  $ABTS^{\bullet+}$  deve ser  $2,5 \mu M$  e máxima de  $25 \mu M$  (Arts et al., 2004).

Os valores encontrados na literatura referente à atividade anti-radical livre de compostos fenólicos e carotenóides, determinados pelos métodos ABTS e DPPH, estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Valores da atividade anti-radical livre de diferentes compostos.

Padrão	concentração ( $\mu\text{M}$ )	DPPH ( $1/\text{EC}_{50}$ ) $T_{\text{EC}_{50}}$	ABTS (mM)	Referência
Ac. ascórbico	66,0 – 490,0	3,7	nd	Brand-Williams et al. (1995)
	nc	11,4	nd	Sanchez-Moreno et al. (1998)
	2,5 – 12,0	nd	1,1	Re et al. (1999)
Ácido gálico	nc	2,6	nd	Sanchez-Moreno et al. (1998)
	nc	12,5	nd	Brand-Williams et al. (1995)
Ácido caféico	nc	2,8	nd	Sanchez-Moreno et al. (1998)
	nc	nd	1,0	Re et al. (1999)
BHA	nc	4,2	nd	Brand-Williams et al. (1995)
	nc	0,1	nd	Sanchez-Moreno et al. (1998)
licopeno	1,5 – 15,0	nd	3,1	Re et al. (1999)
	0,1 – 0,1	0,3	nd	Jiménez-Escrig et al. (2000)
	nc	nd	2,5	Bohm et al. (2002)
$\beta$ -caroteno	1,5 – 15,0	nd	2,6	Re et al. (1999)
	1,5 – 0,7	0,04	nd	Jiménez-Escrig et al. (2000)
	nc	nd	1,4	Bohm et al. (2002)
$\alpha$ -caroteno	1,9 – 0,5	0,05	nd	Jiménez-Escrig et al. (2000)
	nc	nd	1,5	Bohm et al. (2002)
zeaxantina	1,2 – 0,3	0,02	nd	Jiménez-Escrig et al. (2000)
	nc	nd	1,1	Bohm et al. (2002)

nd -não determinado; nc -não consta o valor.

Segundo vários autores, os resultados dos métodos ABTS e DPPH, realizados para a determinação da atividade anti-radical livre de extratos de frutas (Leong & Shui, 2002), plantas medicinais (Miliauskas et al., 2004) e condimentos (Dorman et al., 2003), possuem boa correlação. Entretanto, foi encontrada diferença significativa entre os métodos ABTS e DPPH na análise de espécies Heliotropium (Lissi, citado por Leong & Shui, 2002) e outros autores verificaram que alguns compostos que apresentam atividade em ABTS<sup>•+</sup> podem não ter

atividade em DPPH\* (Wang, citado por Leong & Shui, 2002). Também foi observado que os resultados de atividade anti-radical livre obtidos com estes dois radicais dependem do solvente, da concentração do extrato e da forma como cada método foi realizado (Sun & Ho, 2005; Pinelo et al., 2004; Moure et al., 2000; Frankel & Meyer, 2000; Sanchez-Moreno, 2002).

## **2. COMPOSTOS BIOATIVOS EM FRUTAS TROPICAIS**

A fruticultura hoje é um dos segmentos mais importantes da agricultura brasileira, respondendo por 25% do valor da produção agrícola nacional. Nos últimos anos, sua área de cultivo apresentou um grande aumento, ampliando suas fronteiras em direção à região nordeste, que possui condições de luminosidade, umidade relativa e temperaturas muito favoráveis ao plantio. O Brasil, apesar de ser o terceiro maior produtor mundial de frutas frescas, tem uma inserção inexpressiva no mercado internacional (Lacerda et. al., 2004). Em 2004, a participação brasileira nas exportações de frutas correspondeu a 4,45% das exportações ([www.agricultura.gov.br](http://www.agricultura.gov.br)).

O aumento do consumo de frutas pode estar correlacionado ao fato das frutas serem associadas com a baixa incidência de doenças degenerativas (FESKANICH et al., 2000; MICHELS et al., 2000). Este efeito tem sido atribuído à presença de compostos bioativos que apresentam várias ações benéficas ao ser humano, como por exemplo atividade antioxidantes. Dentre estes compostos bioativos, podemos citar o ácido ascórbico, os compostos fenólicos e os carotenóides.

## 2.1. Ácido ascórbico

O ácido ascórbico (AA) é a principal forma biologicamente ativa da vitamina C (Figura 3), tem diversas funções biológicas e desempenha um papel importante como antioxidante, prevenindo danos celulares causados pela oxidação (BLOCK, 1993).

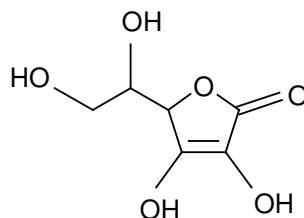


Figura 3. Estrutura química do ácido ascórbico

Os seres humanos não são capazes de sintetizar o ácido ascórbico, portanto, a principal fonte desta vitamina vem da dieta através do consumo de vegetais e frutas. O AA é uma vitamina solúvel em água, estável a pH ácido, e facilmente oxidado, principalmente por íons metálicos (cobre e ferro), sensível a luz, radiação, temperatura elevada, entre outros. O AA possui alta atividade antioxidante, pois, de modo geral, quanto maior o número de hidroxilas, maior a atividade como agente antioxidante. A determinação do AA pode ser realizada por titulometria (AOAC, 1990). Este método é baseado na redução do 2-6-diclorofenol-indofenol (DCFI) pelo ácido ascórbico em meio ácido. No início da titulação o DCFI, com coloração azul em meio aquoso neutro, será reduzido pelo ácido ascórbico passando para a sua forma reduzida, que é incolor. Ao final da titulação,

depois que todo o AA presente ser consumido, a solução passa de incolor para rosa, pois em meio ácido o DCFI é rosa, indicando o ponto final da titulação.

## 2.2. Compostos fenólicos

Fenóis são os principais componentes antioxidantes presentes em frutas e vegetais, constituem uma ampla classe de compostos como ácidos fenólicos, flavonóides e tocoferóis, podem ter características lipofílicas, como os tocoferóis, e características hidrofílicas, como a quercetina.

No caso de compostos fenólicos, a atividade depende além da estrutura química, da dissociação da energia da ligação O-H, ressonância do radical fenol e do impedimento estérico dos grupos substituintes volumosos no anel aromático. Os monofenóis são menos eficientes que os polifenóis, mas no caso do ácido gálico o efeito indutivo dos três grupos hidroxila é um importante fator que aumenta a atividade. Outro fator que aumenta sensivelmente o poder antioxidante dos monofenóis é a substituição do hidrogênio por metoxila, como ocorre no BHA (butilhidroxianisol) (Figura 4) (Sanchez-Moreno et al., 1998).

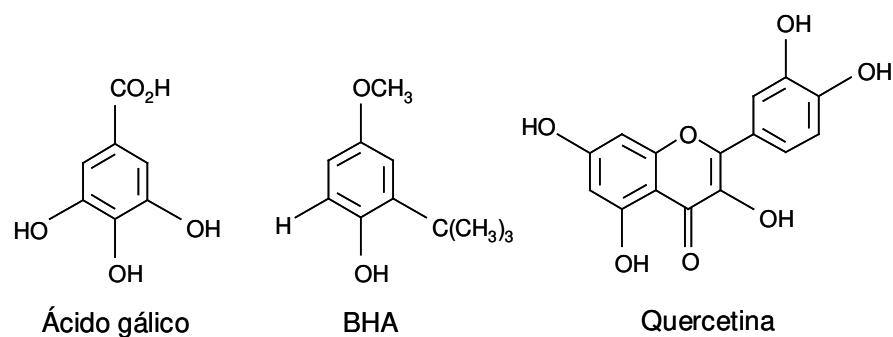


Figura 4. Estrutura química de compostos fenólicos.

Para a quantificação de compostos fenólicos totais em uma amostra a metodologia mais utilizada é a determinação com o reagente Folin-Ciocalteu, pois, é simples, tem reprodutibilidade e reage com os vários tipos de fenóis encontrados na natureza. Este reagente contém tungstato de sódio, molibdato de sódio e sulfato de lítio em meio ácido, apresentando uma coloração amarela. Na presença do reagente Folin-Ciocalteu e em meio básico (pH ~ 10), os compostos fenólicos são energeticamente oxidados. Acredita-se que ocorra uma reação de transferência de elétrons e a formação da coloração azul, ao final da reação, seja devido à presença do molibdato que é facilmente reduzido formando óxido de molibdênio, que possui absorvância muito intensa próxima a 750 nm (Singleton et al., 1999). Na determinação de fenóis totais o reagente Folin-Ciocalteu é adicionado à amostra e, em seguida, adiciona-se o carbonato de sódio, que irá tornar o meio alcalino, propiciando a formação dos compostos de coloração azul. Porém, na presença de ácido ascórbico poderá ocorrer a formação da coloração azul antes de adicionar o álcali, pois ele reage rapidamente com o reagente Folin-Ciocalteu, em meio ácido (pH 3). Portanto, é necessário quantificar o ácido ascórbico antes dos fenóis e subtrair este valor (De Rosso & Mercadante, 2007)) ou ainda retirar o ácido ascórbico da amostra (George et al., 2005). Neste método, os compostos usados como padrão têm sido ácido tânico, ácido gálico, catequina e tirosina; sendo que o ácido gálico é o mais utilizado e o resultado é reportado como miligrama de equivalente de ácido gálico (GAE) por litro.

### 2.3. Carotenóides

Os carotenóides são um grupo de pigmentos naturais encontrados em frutas, vegetais, flores, peixes, invertebrados, pássaros e microrganismos. Até o momento mais de 600 carotenóides já foram encontrados na natureza (Mercadante & Egeland, 2004). Porém, os animais são incapazes de sintetizar carotenóides, portanto adquirem estes compostos através da dieta ao consumir



principalmente vegetais e frutas. Os carotenóides estão presentes em todos os organismos fotossintéticos e são responsáveis pela coloração do amarelo ao vermelho. Nas plantas os carotenóides estão localizados nos plastídios onde são sintetizados (Fraser & Bramley, 2004).

O precursor imediato dos carotenóides é o geranylgeranyl pirofosfato (GGPP), que é formado por 20 moléculas de carbono derivado de 4 unidades isoprenóides ( $C_5$ ). Duas moléculas de GGPP são condensadas para formar o intermediário pré-fitoeno pirofosfato. Esta molécula, devido à eliminação do grupo fosfato e perda de um hidrogênio, ocasionando a formação de uma ligação dupla no centro da molécula, irá formar o fitoeno ( $C_{40}$ ). (Fraser & Bramley, 2004)

O fitoeno é incolor, possui três ligações duplas conjugadas e é a forma básica da qual todos os carotenóides são derivados. Para a formação dos carotenóides coloridos é necessário que ocorra uma série de reações de dessaturação a partir do fitoeno para estender o sistema de ligação dupla conjugada, resultando na formação do fitoflueno,  $\zeta$ -caroteno, neurosporeno e finalmente do licopeno que possui onze ligações duplas conjugadas, é um pigmento acíclico de cor vermelha. (Fraser & Bramley, 2004)

A partir do neurosporeno e do licopeno ocorrem as reações de ciclização onde são formados anéis nas extremidades da cadeia resultando na síntese de carotenóides cíclicos. Em seguida, são introduzidos a estes carotenóides grupos com oxigênio, como a hidroxila, por exemplo, formando as xantofilas, como mostra a Figura 5 (Britton et al., 1995; Bramley, 2002; Fraser & Bramley, 2004).

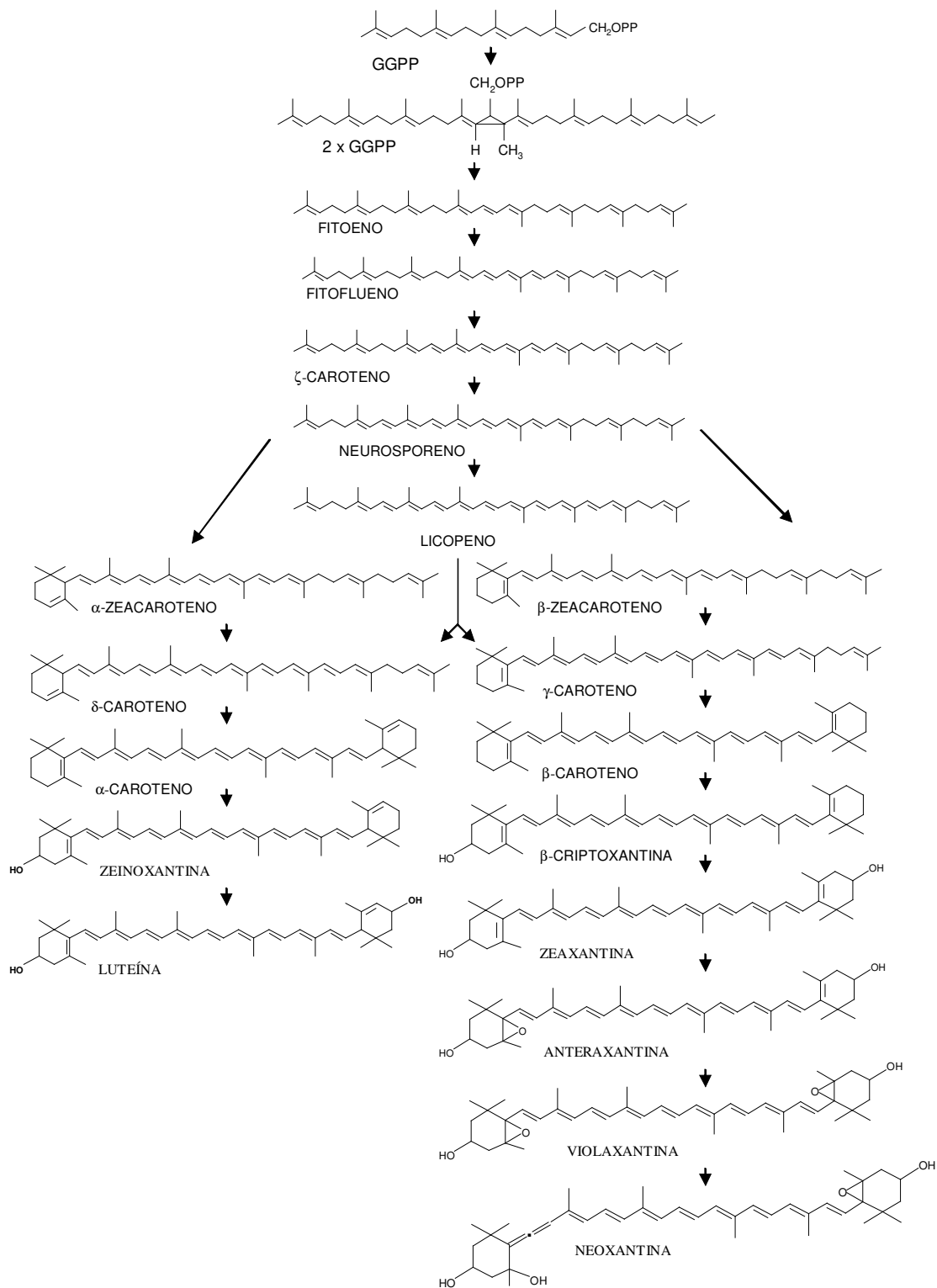


Figura 5. Via biossintética dos carotenóides em plantas, a partir do GGPP.

Os carotenóides são classificados segundo sua estrutura química como carotenos quando constituídos por carbono e hidrogênio, ou como xantofilas quando constituídos por carbono, hidrogênio e oxigênio. Possuem sistema de ligação dupla conjugada na cadeia poliênica, podem ter ou não anel nas extremidades da cadeia e grupos funcionais (carbonila, hidroxila, entre outros). Estas propriedades influenciam tanto na capacidade de absorver luz no visível, como na atividade anti-radical livre do carotenóide.

Os carotenóides com mais que sete ligações duplas conjugadas são capazes de aprisionar ou desativar (quencher) oxigênio singlete ( $^1O_2$ ), sendo que esta atividade aumenta com o aumento do sistema de ligações duplas conjugadas (Di Mascio et al., 1989). Os carotenóides podem desativar o oxigênio singlete de duas maneiras, reagindo com ele e formando produtos de oxidação (processo químico) ou dissipando a energia adquirida do oxigênio singlete na forma de calor (processo físico) e, desta forma, voltam ao estado fundamental. Esta segunda maneira é a que ocorre preferencialmente (Stratton et al., 1993).

Alguns estudos também têm mostrado que os carotenóides aprisionam radicais livres. Como exemplo podemos citar Bohm et al. (2002) que investigaram a atividade anti-radical livre de diferentes carotenóides pelo método ABTS e observaram que o licopeno foi o mais efetivo seguido pelo  $\alpha$ -caroteno,  $\beta$ -caroteno e zeaxantina. Da mesma forma, Miller et al. (1996) também analisaram padrões de carotenóides pelo método ABTS obtendo o seguinte resultado, atividade do licopeno >  $\beta$ -criptoxantina ~  $\beta$ -caroteno > luteína ~ zeaxantina >  $\alpha$ -caroteno > cantaxantina = astaxantina.

Já no estudo de Jiménez-Escrig et al. (2000) foi observado que a cor dos carotenóides interfere no resultado quando é utilizado o método DPPH, superestimando o valor da porcentagem de remoção do DPPH $^{\bullet}$ . Por isso, utilizaram o comprimento de onda 580 nm e não o 515 nm que é normalmente utilizado neste método. Neste estudo também foi observado que o número de

ligações duplas conjugadas e a presença de grupos no anel  $\beta$ -ionona contribuem na habilidade de reduzir radical livre. A atividade dos carotenóides testados decresceu na ordem licopeno >  $\beta$ -criptoxantina >  $\alpha$ -caroteno >  $\beta$ -caroteno > zeaxantina > luteína.

A composição de carotenóides em frutas, como o caju, encontrado principalmente na região Nordeste do Brasil, e o mamão papaia, largamente consumido no Brasil e em vários outros países, foi determinada por vários autores (Tabela 2). Entretanto existe grande divergência entre os teores, mas de forma geral, o teor de carotenóides foi maior no caju vermelho que no amarelo para ambas regiões. Os autores Cecchi e Rodriguez-Amaya (1981) analisaram apenas um lote de cada região, enquanto que, os autores Assunção e Mercadante (2003) analisaram cinco lotes de três diferentes variedades, portanto, este pode ter sido um dos fatores que contribuíram para a diferença entre os valores reportados nos diferentes trabalhos, assim como, o estágio de maturação, época do ano da colheita e método de extração. Em relação ao mamão, a variedade Sunrise (Hawaii) apresentou maior teor de licopeno seguida pela variedade Formosa (Bahia). Entre os Estados brasileiros a variedade que apresentou maior teor de carotenóides foi a Formosa cultivada na Bahia. Desta forma, tanto o caju como o mamão proveniente do Nordeste foram as frutas que apresentaram maior teor de carotenóides comparado aos outros Estados brasileiros.

Tabela 2. Composição dos principais carotenóides em caju e mamão papaia.

Fruta	Variedade	Local	Teor de carotenóides ( $\mu\text{g/g}$ )						
			$\alpha$ -caroteno	$\beta$ -caroteno	$\zeta$ -caroteno	$\beta$ -criptoxantina	licopeno	luteína	cis- $\beta$ -caroteno
Caju <sup>a</sup>	amarelo	Ceará	traço	0,6	traço	0,5	nd	nd	0,5
Caju <sup>a</sup>	amarelo	SP	0,1	0,5	traço	0,5	nd	nd	0,1
Caju <sup>b</sup>	amarelo	SP	26,9	38,1	nd	9,7	nd	12,9	8,2
Caju <sup>b</sup>	amarelo	Piauí	25,3	51,4	nd	53,0	nd	4,6	10,5
Caju <sup>a</sup>	vermelho	Pará	0,3	1,8	traço	1,0	nd	nd	0,5
Caju <sup>a</sup>	vermelho	SP	traço	1,6	traço	1,1	nd	nd	0,4
Caju <sup>b</sup>	vermelho	SP	51,9	66,8	nd	7,7	nd	14,2	15,0
Caju <sup>b</sup>	vermelho	Piauí	35,2	67,9	nd	59,6	nd	4,6	11,0
Mamão <sup>c</sup>	vermelho	RJ	nd	1,4	nd	7,8	20,6	nd	nd
Mamão <sup>d</sup>	Formosa	SP	nd	1,4	1,7	5,3	19,1	nd	nd
Mamão <sup>d</sup>	Formosa	Bahia	nd	6,1	1,5	8,6	26,5	nd	nd
Mamão <sup>e</sup>	amarelo	Sri Lanka	nd	15,4	15,1	15,4	nd	nd	nd
Mamão <sup>e</sup>	vermelho	Sri Lanka	nd	16,9	9,9	16,9	11,5	9,9	nd
Mamão <sup>f</sup>	Sunrise	Hawaii	nd	4,1	nd	9,2	36,7	1,3	nd
Mamão <sup>g</sup>	Betik	Malasia	nd	2,3	nd	14,8	20,0	nd	nd

nd- não detectado; a- Cecchi & Rodriguez-Amaya, 1981; b- Assunção & Mercadante, 2003; c- Wilberg & Rodriguez-Amaya, 1995; d- Kimura et al., 1991; e- Chandrika et al., 2003; f- Wall, 2006; g- Tee & Lim, 1991

### 3. COR, UM ATRIBUTO FÍSICO IMPORTANTE NOS ALIMENTOS

O aspecto visual indica a qualidade de um produto através da comprovada influência na identificação do sabor e no “threshold” do gosto doce. A cor é considerada o principal atributo na aceitação e escolha de um alimento (Clydesdale, 1993).

Existem diversos sistemas de medida de cor, um dos mais usuais é representado numericamente pela escala de cor CIELAB. Nesta escala os pontos estão em um espaço tridimensional e correspondem as cores da forma como é vista pelo olho humano. Este espaço é representado pelos eixos de luminosidade  $L^*$  (o valor 100 representa a cor branca e o valor 0 a cor preta) e pelas coordenadas cromáticas,  $a^*$  (valores positivos representam a cor vermelha e valores negativos a cor verde) e  $b^*$  (valores positivos representam a cor amarela e valores negativos a cor azul), conforme mostra a Figura 6.

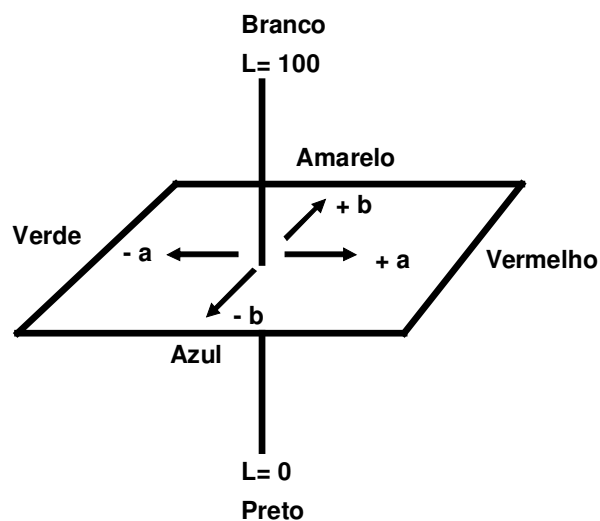


Figura 6. Diagrama CIELAB.

Através dos dados obtidos no diagrama CIELAB é possível determinar diferenças que existem entre um padrão e uma amostra ( $\Delta L^*$ ,  $\Delta a^*$ ,  $\Delta b^*$ ), por exemplo se  $\Delta a^*$  é positivo a amostra está mais vermelha que o padrão. Estes valores podem ser usados para verificar se a amostra está dentro do limite de tolerância estipulado ou para realizar ajustes na cor. Por este sistema também é possível determinar, por exemplo, a mudança de cor ocorrida durante um tratamento ou durante o processo de amadurecimento de uma fruta. A manutenção da cor natural de um alimento representa muitas vezes uma dificuldade, já que o processamento do produto resulta freqüentemente em modificação ou degradação de pigmentos.

Meléndez-Martínez et al. (2007) estudaram o comportamento de diversos padrões de carotenóides (anteraxantina, auroxantina, cantaxantina,  $\alpha$ -caroteno,  $\beta$ -caroteno,  $\zeta$ -caroteno,  $\beta$ -criptoxantina, luteína, luteína epóxi, luteoxantina, licopeno, mutatoxantina, neocromo, neoxantina, violaxantina e zeaxantina) através do diagrama CIELAB. Estes autores verificaram que o licopeno e a cantaxantina estão localizados no primeiro quadrante do plano (valores positivos de  $a^*$  e  $b^*$ ), o que indica que estes pigmentos são mais vermelhos. Os demais estão no segundo quadrante próximo do eixo  $b^*$  (valores negativos de  $a^*$  e positivos de  $b^*$ ), portanto apresentam coloração mais amarelada. Como esperado, o valor de  $a^*$  decresceu em consequência do decréscimo do número de ligações duplas conjugadas ao comparar carotenóides com onze e com nove ligações duplas conjugadas.

Segundo Ahmed et al. (2002) foi constatado que a mudança de cor do mamão papaia, devido ao tratamento térmico aplicado, está diretamente relacionada com o comportamento dos carotenóides presentes na fruta. Como a cor principal do mamão é uma mistura de amarelo e vermelho, os valores de  $a^*$  e  $b^*$  podem ser considerados como um parâmetro físico para descrever a degradação da cor durante o tratamento térmico. Ambos os valores,  $a^*$  e  $b^*$ , decresceram no decorrer do tratamento, assim como, a concentração de

carotenóides. Portanto, através dos resultados obtidos foi verificado que a cor variou linearmente com a concentração dos pigmentos presentes ( $R^2 > 0,97$ ).

Arias et al. (2000) também encontraram uma boa correlação ( $0,82 < R^2 < 0,96$ ) ao comparar os valores de  $L^*$  e  $a^*$  com a variação da concentração de licopeno durante o amadurecimento do tomate. Durante o amadurecimento, o valor de  $a^*$  aumentou de -10,37 para +29,25 como consequência da redução da clorofila e síntese do licopeno, representando a mudança de cor do verde para o vermelho. O valor de  $L^*$  diminuiu, o que indica que com o amadurecimento a fruta ficou mais escura. O valor de  $b^*$  aumentou, refletindo a síntese do  $\beta$ -caroteno, o segundo carotenóide mais importante do tomate, e depois diminuiu devido provavelmente ao aumento da concentração de licopeno que mascarou a cor característica do  $\beta$ -caroteno.

De acordo com Gonçalves et al. (2007) a concentração de antocianina presente na cereja aumentou em ambas temperaturas de estocagem (15 e 1,5 °C), porém a cereja estocada a 15 °C mostrou maior redução do valor  $L^*$ , croma e tonalidade cromática, sendo assim os parâmetros de cor apresentaram correlação negativa com o teor de antocianina. Desta forma, estes resultados indicam que os parâmetros de cor podem ser usados para monitorar a variação do teor de antocianina da cereja.

Montes et al. (2005) aplicaram os parâmetros colorimétricos para otimizar a extração de antocianina da casca de jabuticaba. De acordo com os resultados obtidos, o rendimento de antocianina mostrou alta correlação com o parâmetro de cor  $C^*$  ( $r= 0,84$ ) e  $L^*$  ( $r= 0,85$ ).



#### 4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMED, J.; SHIVHARE, U.S.; SANDHU, K.S. Thermal degradation kinetics of carotenoids and visual color of papaya puree. **Journal of Food Science**, v. 67, p. 2692-2695, 2002.

AOAC. Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists, 15<sup>th</sup> ed. Arlington VA: Association of Official Analytical Chemists, p. 1058-1059, 1990.

ARIAS, R.; LEE, T.C.; LOGENDRA, L.; JANES, H. Correlation of lycopene measured by HPLC with the L\*, a\*, b\* color readings of a hidroponic tomato and the relationship of maturity with color and lycopene content. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 1697-1702, 2000.

ARTS, M.J.T.J.; DALLINGA, J.S.; VOSS, H.P.; HAENEN, G.R.M.M.; BAST, A. A new approach to assess the total antioxidant capacity using the TEAC assay. **Food Chemistry**, v. 88, p. 567-570, 2004.

ASSUNÇÃO, R.B.; MERCADANTE, A.Z. Carotenoids and ascorbic acid from cashew apple (*Anacardium occidentale* L.): variety and geographic effects. **Food Chemistry**, v. 81, p. 495-502, 2003.

BLOCK, G. Vitamin C, cancer and aging. **Age**, v. 16, p. 55–58, 1993.

BOHM, V.; PUSPITASARI-NIENABER, N.L.; FERRUZZI, M.G.; SCHWARTZ, S.J. Trolox equivalent antioxidant capacity of different geometrical isomers of  $\alpha$ -carotene,  $\beta$ -carotene, lycopene and zeaxanthin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 221-226, 2002.

- BRAMLEY, P.M. Regulation of carotenoid formation during tomato fruit ripening and development. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, p. 2107-2113, 2002.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie**, v. 28, p. 25-30, 1995.
- BRITTON, G. Chapter 2, Overview of Carotenoid Biosynthesis. Vol 3: Biosynthesis. Carotenoids. Britton G.; Liaaen-Jensen S.; Pfander H. Birkhauser: Basel, Switzerland, p. 13-141, 1998.
- CECCHI, H.M.; RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Carotenoid composition and vitamin A value of fresh and pasteurized cashew-apple (*Anacardium occidentale* L.) juice. **Journal of Food Science**, v. 46, p. 147-149, 1981.
- CHANDRIKA, U.G.; JANSZ, E.R.; WICKRAMASINGHE, S.M.D.N.; WARNASURIYA, N.D. Carotenoids in yellow and red-fleshed papaya (*Carica papaya* L) **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 83, p. 1279-1282, 2003.
- CLYDESDALE, F.M. Color as a factor in food choice. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 33, p. 83-101, 1993.
- DE ROSSO, V.V.; MERCADANTE, A.Z. The high ascorbic acid content is the main cause of the low stability of anthocyanin extracts from acerola. **Food Chemistry**, v. 103, p. 935-943, 2007.

- DI MASCIO, P.; KAISER, S.; SIES, H. Lycopene as the most efficient biological carotenoid singlet oxygen quencher. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 274, p. 532-538, 1989.
- DORMAN, H.J.D.; PELTOKETO, A.; HILTUNEN, R.; TIKKANEN, M.J. Characterization of the antioxidant properties of de-odourised aqueous extracts from selected Lamiaceae herbs. **Food Chemistry**, v. 83, p. 255-262, 2003.
- FESKANICH, D.; ZIEGLER, R.G.; MICHAUD, D.S.; GIOVANNUCCI, E.L.; SPEIZER, F.E.; WILLETT, W.C.; COLDITZ, G.A. Prospective study of fruit and vegetable consumption and risk of lung cancer among men and women. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 92, p. 1812–1823, 2000.
- FRANKEL, E.N.; MEYER, A.S. Review, the problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 80, p. 1925-1941, 2000.
- FRASER, P.D.; BRAMLEY, P.M. The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. **Progress in Lipid Research**, v. 43, p. 228-265, 2004.
- GEORGE, S.; BRAT, P.; ALTER, P.; AMITOT, M.J. Rapid determination of polyphenols and vitamin C in plant-derived products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 1370-1373, 2005.
- GONÇALVES, B.; SILVA, A. P.; MOUTINHO-PEREIRA, J.; BACELAR, E.; ROSA, E.; MEYER, A.S. Effect of ripeness and postharvest on the evolution of colour and anthocyanins in cherries (*Prunus avium* L.). **Food Chemistry**, v.103, p. 976-984, 2007.

HENRIQUEZ, C.; ALIAGA, C.; LISSI, E. Formation and decay of the ABTS derived radical cation: a comparison of different preparation procedures. **International Journal of Chemical Kinetics**, v. 34, p. 659-665, 2002.

HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R.L. The Chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 1841-1856, 2005.

JIMÉNEZ- ESCRIG, A.; JIMÉNEZ-JIMÉNEZ, I.; SÁNCHEZ-MORENO, C.; SAURA-CALIXTO, F. Evaluation of free radical scavenging of dietary carotenoids by the stable radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 80, p. 1686-1690, 2000.

KIMURA, M.; RODRIGUEZ-AMAYA, D.B.; YOKOYAMA, S.M. Cultivar differences and geographic effects on the carotenoid composition and vitamin A value of papaya. **Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie**, v. 24, p. 415-418, 1991.

LACERDA, M.A.D.; LACERDA, R.D.; ASSIS, P.C.O. A participação da fruticultura no agronegócio brasileiro. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v. 4, ISSN 1519-5225, 2004.

LEONG, L.P.; SHUI, G. An investigation of antioxidant capacity of fruits in Singapore markets. **Food Chemistry**, v. 76, p. 69-75, 2002.

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.

MERCADANTE, A.Z. ENGELAND, E.S. Carotenoids Handbook, 1st ed.; Britton, G., Liaaen-jensen, S., Pfander, H., Eds.; Birkhauser: Basel, Switzerland, 2004.

MICHELS, K.B.; GIOVANNUCCI, E.; JOSHIPURA, K.J.; ROSNER, B.A.; STAMPFER, M.J.; FUCHS, C.S.; COLDITZ, G.A.; SPEIZER, F.E.; WILLETT, W.C. Prospective study of fruit and vegetable consumption and incidence of colon and rectal cancers. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 92, p. 1740-1752, 2000.

MILIAUSKAS, G.; VENSKUTONIS, P.R.; VAN BEEK, T.A. Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. **Food Chemistry**, v. 85, p. 231-237, 2004.

MILLER, N.J.; RICE-EVANS, C.A.; DAVIES, M.J.; GOPINATHAN, V.; MILNER, A. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. **Clinical Science**, v. 84, p. 407-412, 1993.

MILLER, N.J.; SAMPSON, J.; CANDEIAS, L.P.; BRAMLEY, P.M.; RICE-EVANS, C.A. Antioxidant activities of carotenes and xanthophylls. **FEBS Letters**, v. 384, p. 240-242, 1996.

MONTES, C.; VICARIO, I.M.; RAYMUNDO, M.; FETT, R.; HEREDIA, F.J. Application of tristimulus colorimetry to optimize the extraction of anthocyanins from Jaboticaba (*Myrcia Jaboticaba* Berb.). **Food Research International**, v. 38, p. 983-988, 2005.

MOURE, A.; FRANCO, D.; SINEIRO, J.; DOMINGUEZ, H.; NUNEZ, M.J.; LEMA, J.M. Evaluation of extracts from *Gevuina avellana* hulls as antioxidants **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 3890-3897, 2000.

PINELO, M.; MANZOCCO, L.; NUNEZ, M.J.; NICOLI, M.C. Solvent effect on quercetin antioxidant capacity. **Food Chemistry**, v. 88, p. 201-207, 2004.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 26, p. 1231-1237, 1999.

RICE-EVANS, C.A.; MILLER, N.J.; PAGANGA, G. Antioxidant properties of phenolic compounds. **Trends in Plant Science**, v. 2, p. 152-159, 1997.

ROGINSKY, V.; LISSI, E.A. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant in food. **Food Chemistry**, v. 92, p. 235-254, 2005.

SÁNCHEZ-MORENO, C. Review: methods used to evaluate the free radical scavenging activity in food and biological systems. **Food Science and Technology International**, v. 8, p. 121-137, 2002.

SÁNCHEZ-MORENO, C.; LARRAURI, J.A.; SAURA-CALIXTO, F. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 76, p. 270-276, 1998.

SINGLETON, V.L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTÓS, R.M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu. **Methods in Enzymology**, v. 299, p. 152-178, 1998.

STRATTON, S.P.; SCHAEFER, W.H.; LIEBLER, D.C. Isolation and identification of singlet oxygen oxidation products of  $\beta$ -carotene. **Chemical Research in Toxicology**, v. 6, p. 542-547, 1993.

SUN, T.; HO, C.T. Antioxidant activities of buckwheat extract. **Food Chemistry**, v. 90, p. 743-749, 2005.

TEE, E.S.; LIM, C. Carotenoid composition and content of Malaysian vegetables and fruits by the AOAC and HPLC methods. **Food Chemistry**, v. 41, p. 309-339, 1991.

THOMAS, J.H.; DRAKE, J.M.; PADDOCK, J.R.; CONKLIN, S.; JOHNSON, J.; SELISKAR, C.J.; HALSALL, H.B.; HEINEMAN, W.R. Characterization of ABTS at a polymer-modified electrode. **Electroanalysis**, v. 16, p. 547-555, 2004.

WALL, M.M. Ascorbic acid, vitamin A, and mineral composition of banana (*Musa* sp.) and papaya (*Carica papaya*) cultivars grown in Hawaii. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 19, p. 434-445, 2006.

WILBERG, V.C.; RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. HPLC quantitation of major carotenoids of fresh and processed guava, mango and papaya. **Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie**, v. 28, p. 474-480, 1995.

[www.anvisa.gov.br/](http://www.anvisa.gov.br/). Acesso em 26 de abril de 2007.

[www.agricultura.gov.br](http://www.agricultura.gov.br/). Acesso em 25 de abril de 2007.

YAMAGUCHI, T.; TAKAMURA, H.; MATOBA, T.; TERAOKA, J. HPLC method for evaluation of the free radical-scavenging activity of foods by using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 62, p. 1201-1204, 1998.





## **CAPÍTULO 2**

### **CAROTENÓIDES, UMA ANÁLISE SOBRE SUA ATIVIDADE ANTI-RADICAL LIVRE E COR**



## RESUMO

Nestes últimos anos tem sido dado um grande destaque aos compostos antioxidantes, entre eles, os carotenóides, que não somente apresentam atividade anti-radical livre como também são responsáveis pela cor de vários alimentos. Desta forma, este estudo teve como objetivos avaliar alguns parâmetros que influem na reatividade do ABTS, verificar o comportamento de diferentes padrões de carotenóides, em diferentes concentrações, em relação à atividade anti-radical livre e à cor, relacionar as propriedades antioxidantes e corantes com a estrutura dos carotenóides. Entre os padrões de carotenóides estudados o valor de TEAC obtido, em ordem decrescente, foi:  $\beta$ -caroteno, zeaxantina,  $\beta$ -criptoxantina, 8-apo-carotenal, astaxantina, 10-apo-carotenal e 12-apo-carotenal. Portanto, a atividade anti-radical livre foi maior para o carotenóide com anel  $\beta$  não substituído, pois a presença de grupos carbonila reduziu a atividade anti-radical livre, assim como o menor número de ligações duplas conjugadas. Em relação às coordenadas de cor ( $a^*$  e  $b^*$ ) o  $\beta$ -caroteno,  $\beta$ -criptoxantina e zeaxantina apresentaram aumento de 2,7 vezes do valor negativo de  $a^*$  com o aumento da concentração, já o valor positivo de  $b^*$  aumentou 5,5 vezes, indicando maior tonalidade da cor amarela. Por outro lado, o 8-apo-carotenal apresentou valor positivo de  $a^*$  a partir de 6  $\mu$ M e a astaxantina apresentou valores positivos de  $a^*$  em todas as concentrações analisadas, portanto, estes carotenóides mostraram maior intensidade da cor vermelha. O parâmetro croma e a porcentagem de inibição dos carotenóides estudados apresentaram correlação linear para os carotenóides com comprimento de onda máximo de absorção em torno de 450 nm.

**PALAVRAS-CHAVE:** caroteno, CIELAB, TEAC, concentração, solventes

## 1. INTRODUÇÃO

Os carotenóides são classificados segundo sua estrutura química como carotenos quando constituídos somente por carbono e hidrogênio, ou como xantofilas quando constituídos por carbono, hidrogênio e oxigênio. Apresentam na sua estrutura um sistema de ligações duplas conjugadas, com cadeia acíclica ou com anel nas extremidades da cadeia e grupos funcionais como carbonila e hidroxila, entre outros, conforme Figura 1. Estas características estruturais influenciam tanto na atividade anti-radical livre do carotenóide, como na capacidade de absorver luz no visível.

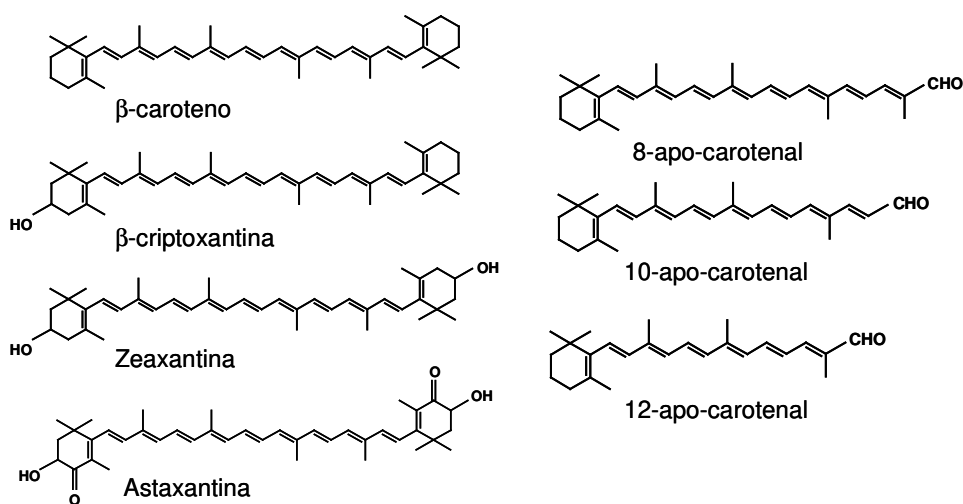


Figura 1. Estrutura química de alguns carotenóides.

Os carotenóides são um grupo de pigmentos naturais encontrados em frutas, vegetais, flores, peixes, invertebrados, pássaros e microrganismos. Até o momento mais de 600 carotenóides já foram encontrados na natureza (Mercadante & Egeland, 2004), sendo que estes pigmentos são compostos com cor variando do amarelo ao vermelho.

A cor é considerada o principal atributo na aceitação e escolha de um alimento, porém a manutenção da cor natural de um alimento representa muitas vezes uma dificuldade, já que o processamento do produto resulta freqüentemente em degradação de pigmentos, o que requer a adição de corantes para recuperação da cor. Porém, os corantes sintéticos, embora mais baratos e bem mais estáveis quimicamente, têm recebido grande resistência por parte dos consumidores, cada vez mais preocupados em abolir compostos “artificiais” de sua dieta. Por isso, a exploração de fontes de corantes naturais tem sido de grande importância na indústria de alimentos e vários estudos têm sido realizados relacionando a cor do alimento com o seu conteúdo de carotenóides (Arias et al., 2000; Ahmed et al., 2002; Choi et al., 2002).

Ultimamente tem sido dado um grande destaque aos compostos antioxidantes, pois ajudam a proteger o organismo humano contra o estresse oxidativo. Entre eles podemos citar os carotenóides que são capazes de seqüestrar o oxigênio singlete (Di Mascio et al., 1989, Stratton et al., 1993) e também podem reagir com espécies radicais (Miller et al., 1996, Bohm et al., 2002). Entre os métodos indiretos que medem a habilidade de aprisionar (scavenger) radicais livres, o método ABTS tem sido largamente utilizado para verificar a atividade anti-radical livre de compostos puros e de extratos complexos. Este método foi, primeiramente, baseado na ativação da metimioglobina agindo como peroxidase na presença de peróxido de hidrogênio formando o radical ferrimioglobina, o qual oxidava o ABTS formando o ABTS<sup>•+</sup> (Miller et al., 1993). Posteriormente, foi reportada uma outra forma para gerar o radical ABTS, por redução química, utilizando dióxido de manganês (Rice-Evans & Miller, 1997) e alguns anos depois foi proposto uma modificação deste método, onde o radical é

gerado diretamente por persulfato de potássio (Re et al., 1999). O radical cátion ABTS formado tem cor verde azulado intensa com absorção máxima a 645, 734 e 815 nm e pode ser aplicado em sistemas hidrofílico e lipofílico.

Desta forma, neste trabalho inicialmente o método ABTS foi padronizado levando em consideração o comportamento de diferentes solventes (tetrahidrofurano, diclorometano, acetona e acetato de etila) em solução etanólica de ABTS<sup>•+</sup>, assim como, a influência do oxigênio e da temperatura (22 e 30 °C). Este trabalho teve como objetivo investigar a influência do número de ligações duplas conjugadas, presença do grupo hidroxila e carbonila na estrutura de sete carotenóides em relação à habilidade em reduzir o radical ABTS<sup>•+</sup> e nas suas características cromáticas. Posteriormente, um modelo foi proposto para correlacionar a atividade anti-radical livre com os parâmetros de cor.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. Padrões**

Os padrões de carotenóides estudados foram  $\beta$ -caroteno,  $\beta$ -criptoxantina, zeaxantina, 8-apo-carotenal, 10-apo-carotenal, 12-apo-carotenal, provenientes da DSM Nutritional Products e astaxantina da marca Sigma.

Uma pequena porção de cristais de padrão foi transferida com o auxílio de uma pipeta Pasteur para um frasco de vidro transparente e, em seguida, foi adicionado um volume de acetato de etila suficiente para solubilizar totalmente os cristais. Logo após, uma alíquota conhecida desta solução foi adicionada a um frasco, seca sob nitrogênio e, posteriormente, foi adicionado volume conhecido de

éter de petróleo (ou hexano, para astaxantina) para quantificação da solução através da leitura no comprimento de onda máximo de absorção ( $\lambda_{\max}$ ), em espectrofotômetro na faixa de 220 a 750 nm. Utilizou-se para cálculo da concentração as absortividades relatadas por Davies (1976). Após conhecer a concentração da solução inicial foram retiradas alíquotas para obter soluções com as diferentes concentrações desejadas.

## 2.2. Reagentes

Os reagentes utilizados, éter de petróleo, hexano, etanol, diclorometano (DCM), acetato de etila, acetona e tetraidrofurano (THF), foram todos grau p.a. da marca Synth, ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina)-6-sulfônico (ABTS), persulfato de potássio e ácido 6-hidróxido-2,5,7,8-tetrametilcroma-2-carboxílico (Trolox) foram adquiridos da Sigma.

## 2.3. Equipamentos

Utilizou-se para a realização das análises um espectrofotômetro de arranjo de diodos da marca Agilent, modelo 8453 (Palo Alto, Pensilvânia, Estados Unidos da América) e um colorímetro HunterLab, modelo Color Quest XE (Reston, Virginia, Estados Unidos da América).

## 2.4. Métodos

### 2.4.1. Método anti-radical livre

Para a formação do radical ABTS ( $ABTS^{\bullet+}$ ), a solução aquosa de ABTS (7 mM, concentração final) foi adicionada à solução de persulfato de potássio (2,45 mM, concentração final). Esta mistura foi mantida no escuro à temperatura ambiente por 12-16 horas; após este tempo, a absorbância foi corrigida para 0,70 ( $\pm 0,02$ ), medida a 734 nm, com a adição de etanol. A 1,8 mL da solução etanólica  $ABTS^{\bullet+}$  foi adicionado 20  $\mu$ L do padrão Trolox (0-15  $\mu$ M, concentração final) ou 200  $\mu$ L de amostra (diferentes solventes ou diferentes carotenóides) e mantida em ultra-som por 30 segundos. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro (750 nm) após 10 minutos (Re et al., 1999).

A atividade anti-radical livre foi determinada a partir da curva dos padrões de referência (Trolox) ou de carotenóides, plotando a porcentagem de inibição (equação 1) em função da concentração final do padrão (equação 2).

$$\%INIBIÇÃO = \frac{(A_{t=0} - A_{t=final})}{A_{t=0}} \times 100 \quad \text{equação 1}$$

$$[ANTIOXIDANTE]_{final} = \frac{[ANTIOXIDANTE] \times V_{adicionado}}{V_{final}} \quad \text{equação 2}$$

onde,  $A_{t=0}$  corresponde à absorbância medida no tempo zero e  $A_{t=final}$  à absorbância no tempo final.



O valor de TEAC foi determinado através da divisão do coeficiente angular, obtido na curva da amostra, pelo coeficiente angular obtido na curva do padrão referência, Trolox.

#### 2.4.1.1. Padronização da metodologia para os carotenóides

Para verificar o comportamento dos diferentes solventes em relação à solução etanólica ABTS<sup>•+</sup>, e a influência do oxigênio e da temperatura na atividade anti-radical livre, pelo método ABTS, foi calculada apenas a porcentagem de inibição (equação 1).

Após adicionar 200  $\mu$ L de solvente (etanol, DCM, acetato de etila, acetona, THF) à 1,8 mL de solução etanólica ABTS<sup>•+</sup>, foram realizadas leituras da absorbância em espectrofotômetro (750 nm) a cada 6 minutos durante 30 minutos para acompanhar a cinética da reação de cada solvente.

Para avaliar a influência do oxigênio foi necessário saturar a solução etanólica de ABTS<sup>•+</sup> com gás nitrogênio antes de adicionar o antioxidante (padrão  $\beta$ -caroteno). Durante a reação, a solução foi mantida sob fluxo de nitrogênio, sendo que, somente no momento da leitura ocorreu interrupção do fluxo. Esta análise foi realizada com diferentes concentrações de  $\beta$ -caroteno (2 a 10  $\mu$ M, concentração final) em duplicata, sendo que, as concentrações de 2, 4 e 8  $\mu$ M do padrão  $\beta$ -caroteno também foram analisadas em dois dias diferentes.

Para verificar a influência da temperatura, a solução etanólica de ABTS<sup>•+</sup> foi mantida em banho a 30<sup>0</sup> C antes de iniciar a reação e durante todo o tempo de reação, somente no momento da leitura da absorbância a solução foi retirada do banho. Para realizar a análise a 22<sup>0</sup> C, a solução etanólica de ABTS<sup>•+</sup> foi mantida a temperatura ambiente (22<sup>0</sup> C). Nesta análise foram utilizadas duas concentrações

do padrão de  $\beta$ -caroteno (2 e 10  $\mu\text{M}$ , concentração final). A análise foi realizada em duplicata.

#### 2.4.2. Determinação dos parâmetros de cor

A análise associada à cor foi realizada nos diferentes padrões de carotenóides através de medidas instrumentais obtidas em colorímetro, utilizando a escala CIELAB (refletância,  $d/8$ ,  $D_{65}$  e ângulo do observador  $10^\circ$ ). Desta forma, foram obtidos os valores de  $L^*$  (luminosidade),  $a^*$  e  $b^*$  (coordenadas de cor). A partir de  $a^*$  e  $b^*$  foi calculado o parâmetro  $h$  (hue, ângulo de tonalidade cromática) segundo as equações 3, 4 e 5 (Arias et al., 2000) e o parâmetro  $C^*$  (croma) de acordo com a equação 6. A leitura foi realizada em triplicata.

$$h = \arctan(b^*/a^*) \quad \text{quando } a^* > 0 \quad \text{equação 3}$$

$$h = 90 \quad \text{quando } a^* = 0 \quad \text{equação 4}$$

$$h = 180 + \arctan(b^*/a^*) \quad \text{quando } a^* < 0 \quad \text{equação 5}$$

$$C^* = [(a^*)^2 + (b^*)^2]^{1/2} \quad \text{equação 6}$$

### 2.4.3. Análise estatística

Os dados referentes à atividade anti-radical livre (TEAC), influência do oxigênio e da temperatura foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey, através do software ASSISTAT. Os parâmetros de cor ( $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ,  $C^*$  e  $h$ ) foram expressos como média ( $n= 3$ ) e calculados através do programa Microsoft Excel e Origin.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1. Influência do solvente, oxigênio e temperatura na redução do ABTS

Os carotenóides são compostos cuja estrutura básica, em geral, contém 40 átomos de carbono ligados de tal forma que a molécula é linear o que lhes confere caráter apolar. Por isso, estes compostos são melhor solubilizados em solventes apolares. Portanto, foram selecionados quatro diferentes solventes (acetona, THF, DCM e acetato de etila) para verificar seu comportamento quando adicionados à solução etanólica de  $ABTS^{\bullet+}$ .

A Figura 2 mostra que a acetona e o THF, ao longo do tempo, apresentaram aumento na porcentagem de inibição, o que indica estar ocorrendo alguma interação do solvente com a solução etanólica  $ABTS^{\bullet+}$ . Tanto o acetato de etila como o DCM, apresentaram comportamento semelhante, entretanto, o acetato de etila foi o solvente escolhido para solubilizar os carotenóides.

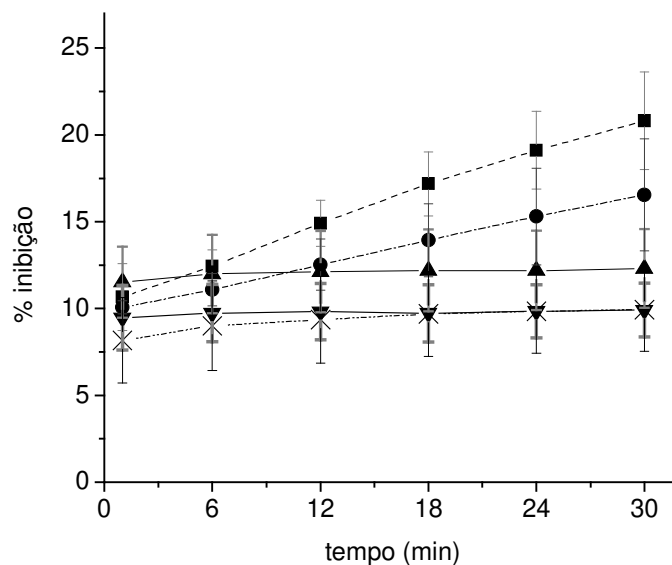


Figura 2. Efeito da adição de 200 µL de diferentes solventes em 1,8 mL de solução etanólica de ABTS•+. Solventes adicionados: acetona (quadrado), THF (círculo), etanol (triângulo para cima), acetato de etila (triângulo para baixo), DCM (x). As barras de erro indicam o desvio padrão da média (n= 2).

Outro fator a ser considerado é a interação que pode ocorrer entre o carotenóide e o oxigênio, por isso, foi realizado um estudo onde a solução etanólica ABTS•+ foi saturada com gás nitrogênio (Figura 3). A Figura 3 mostra que a porcentagem de inibição do β-caroteno não apresentou diferença significativa na presença de oxigênio ou nitrogênio. Portanto, a presença de oxigênio não influencia significativamente o resultado da análise de carotenóide em solução etanólica ABTS•+.

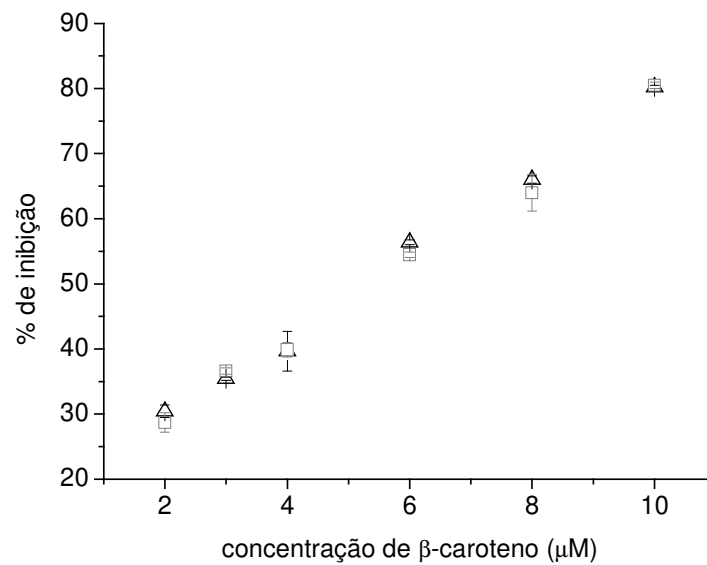


Figura 3. Atividade anti-radical livre do  $\beta$ -caroteno em diferentes concentrações (2 a 10  $\mu\text{M}$ , concentração final) medida pelo método ABTS, com saturação de nitrogênio (triângulo) e na presença de ar (quadrado). As barras de erro indicam o desvio padrão da média ( $n= 4$  para as concentrações 2, 4 e 8  $\mu\text{M}$  e  $n= 2$  para as concentrações 3, 6 e 10  $\mu\text{M}$ ).

Geralmente a análise da atividade anti-radical livre pelo método ABTS é realizada a  $30^{\circ}\text{C}$  (Re, et al., 1999; Miller et al., 1996); porém, conforme mostra a Figura 4, quando a análise foi realizada a menor temperatura ( $22^{\circ}\text{C}$ ) a variação da porcentagem de inibição não foi significativa, assim sendo esta análise também pode ser realizada a temperatura ambiente ( $22$  a  $25^{\circ}\text{C}$ ).

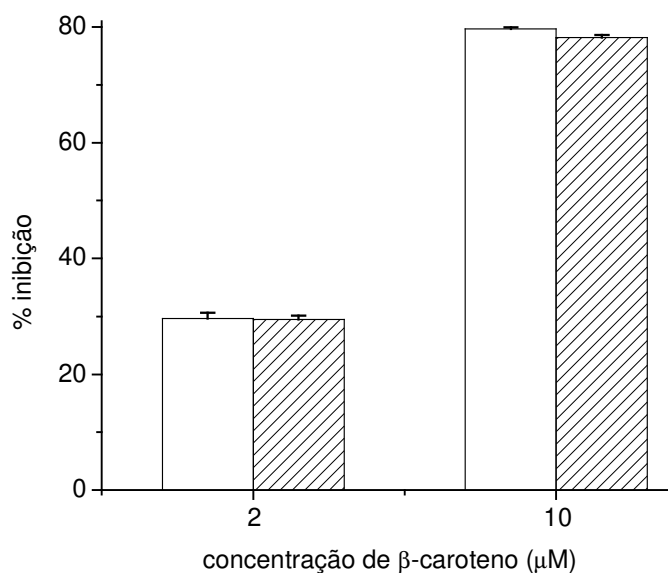


Figura 4. Efeito da temperatura (30 °C coluna branca e 22 °C coluna listrada) na atividade anti-radical livre do β-caroteno medida pelo método ABTS. As barras de erro indicam o desvio padrão da média (n= 3).

Em resumo, de acordo com os resultados obtidos, a melhor condição para analisar a atividade anti-radical livre de carotenóides pelo método ABTS é empregar o acetato de etila como solvente e padronizar o tempo de reação em 10 minutos, pois, após este tempo, a reação estabilizou-se formando um patamar (Figura 5). Também foi observado que esta análise pode ser realizada à temperatura ambiente e na presença de ar.

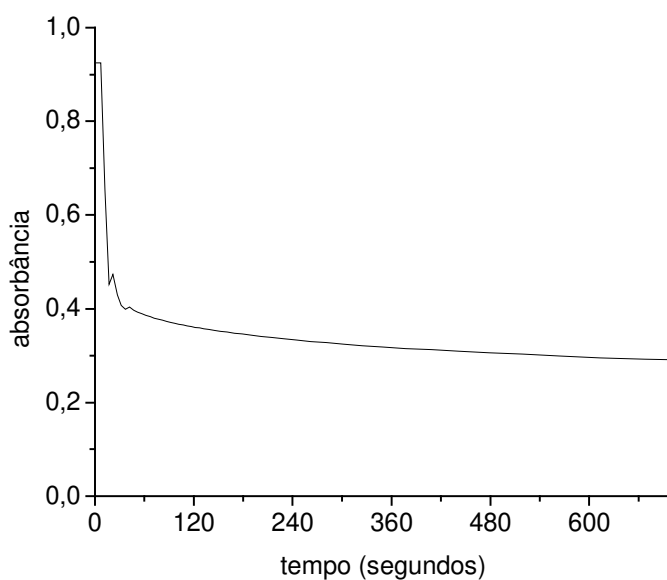


Figura 5. Cinética de reação do  $\beta$ -caroteno em solução etanólica ABTS\*+.

### 3.2. Relação entre atividade anti-radical livre e estrutura de carotenóides

Após ter realizado a análise da atividade anti-radical livre, pelo método ABTS, em diferentes carotenóides utilizando, pelo menos, cinco concentrações diferentes de cada um, o valor TEAC foi calculado. Os carotenóides apresentaram valores de TEAC entre 0,32 e 1,80 (Tabela 1), sendo que o  $\beta$ -caroteno apresentou o maior valor e o 10-apo-carotenal o menor valor. O 10-apo-carotenal apresentou atividade anti-radical livre 5,6 vezes menor que o  $\beta$ -caroteno.

Tabela 1. Valores de TEAC dos diferentes carotenóides estudados.

Carotenóide	TEAC*
$\beta$ -caroteno	$1,80 \pm 0,03^a$
$\beta$ -criptoxantina	$1,47 \pm 0,03^c$
zeaxantina	$1,63 \pm 0,03^b$
astaxantina	$0,82 \pm 0,03^e$
8-apo-carotenal	$1,25 \pm 0,02^d$
10-apo-carotenal	$0,32 \pm 0,01^f$
12-apo-carotenal	$0,36 \pm 0,01^f$

\*- valor médio (n= 2) e desvio padrão; diferente letra indica diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

Este comportamento indica que os grupos carbonilas alílicos aos grupos hidroxilas, presentes em cada anel da astaxantina, podem ter induzido a uma queda da atividade anti-radical livre. Miller et al. (1996) também observaram que a incorporação de grupos carbonila no anel causou um efeito supressivo tanto para a cantaxantina como para a astaxantina. Em um outro estudo realizado por Wooddall et al. (1997), foram utilizados outros métodos (geração de radicais livres por AMVN e por AIBN) para avaliar a oxidação dos carotenóides por radicais livres e os resultados mostraram o mesmo comportamento em relação à presença do grupo carbonila na cantaxantina e astaxantina.

O  $\beta$ -caroteno,  $\beta$ -criptoxantina e zeaxantina são carotenóides com o mesmo número de ligações duplas conjugadas (11 l.d.c.), porém apresentaram diferentes atividades anti-radical livre (Tabela 1). Um dos fatores que pode ter contribuído para este comportamento é a presença do anel  $\beta$  não substituído na estrutura do  $\beta$ -caroteno que aumentou a habilidade do carotenóide para reduzir o radical  $ABTS^{\bullet+}$ , enquanto que, a presença de grupo hidroxílico na estrutura da  $\beta$ -criptoxantina e zeaxantina parece ter contribuído para a redução da atividade anti-



radical livre. A zeaxantina, que possui dois grupos hidroxílicos, apresentou maior valor TEAC que a  $\beta$ -criptoxantina, que possui somente um grupo hidroxílico (Tabela 1). Este comportamento difere do observado por Miller et al. (1996), que analisaram o  $\beta$ -caroteno,  $\beta$ -criptoxantina e zeaxantina e verificaram que a inserção de apenas um grupo hidroxila no anel não mudou muito a habilidade de desativar o ABTS<sup>•+</sup>; entretanto, a presença de um grupo em cada anel decresceu significativamente a atividade. Um dos fatores que pode ter contribuído para esta diferença é o solvente utilizado para solubilizar os carotenóides. Neste trabalho foi utilizado acetato de etila e no trabalho citado uma solução de hexano e acetona (9:1).

Outro fator importante a ser observado é a influência do tamanho da cadeia poliênica e do número de I.d.c. na atividade anti-radical livre. De acordo com a Tabela 1, o valor de TEAC do 8-apo-carotenal (10 I.d.c.) foi maior que do 10-apo-carotenal (9 I.d.c.) e 12-apo-carotenal (8 I.d.c.), indicando que o aumento do tamanho da cadeia poliênica e do número de I.d.c., aumenta o valor de TEAC. O mesmo comportamento foi encontrado por Miller et al. (1996), ao comparar o comportamento do  $\beta$ -caroteno (11 I.d.c.) com o  $\alpha$ -caroteno (10 I.d.c.), pois aparentemente a habilidade dos carotenóides de desativar o ABTS<sup>•+</sup> aumenta com a extensão do cromóforo. O 10 e 12-apo-carotenal não apresentaram diferença significativa no valor de TEAC, este comportamento indica que carotenóides com menos de 9 I.d.c. tem atividade anti-radical livre muito baixa, portanto não é possível diferenciar.

### 3.3. Relação entre as características de cor e a estrutura de carotenóides

As coordenadas de cor obtidas pelo sistema CIELAB foram medidas com as soluções de carotenóides em acetato de etila. Com o aumento da concentração, todos os carotenóides mostraram queda no valor  $L^*$ , sendo que a astaxantina apresentou maior variação seguida pelo 8-apo-carotenal. Portanto, como esperado, os padrões apresentaram escurecimento com o aumento da concentração.

Com o aumento da concentração, os carotenóides estudados apresentaram aumento do croma ( $C^*$ ) (Figura 6a) e menor valor da tonalidade cromática ( $h$ ), exceto para astaxantina (Figura 6b).

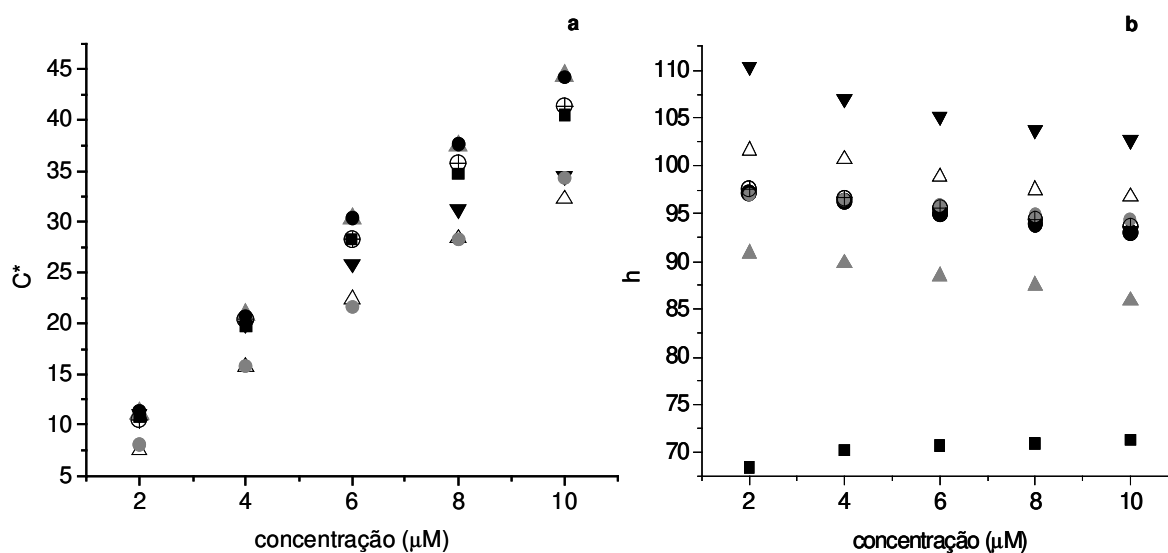


Figura 6. Valor de croma ( $C^*$ ) e hue ( $h$ ) de diferentes carotenóides em diferentes concentrações (a e b, respectivamente). Carotenóides estudados: 8-apo-carotenal (triângulo cinza), 10-apo-carotenal (triângulo vazado), 12-apo-carotenal (triângulo preto invertido),  $\beta$ -caroteno (círculo preto),  $\beta$ -criptoxantina (círculo cinza), zeaxantina (círculo com cruz) e astaxantina (quadrado preto).

A  $\beta$ -criptoxantina e o 10-apo-carotenal apresentaram valores similares e menores de croma ( $C^*$ ), seguido pelo 12-apo-carotenal, já o  $\beta$ -caroteno e 8-apo-carotenal apresentaram os maiores valores de  $C^*$ . Este comportamento, provavelmente, é devido aos maiores valores de  $b^*$  que foram obtidos nas diferentes concentrações (Figura 7).

O valor de  $h$  aumentou na seguinte ordem 8-apo-carotenal (10 l.d.c.), 10-apo-carotenal (9 l.d.c.) e 12-apo-carotenal (8 l.d.c.), indicando que o menor número de l.d.c. aumenta o valor de  $h$  (Figura 6b). Meléndez-Martínez et al. (2007) também reportaram o mesmo comportamento entre carotenóides com 10, 9, 8 e 7 l.d.c. A astaxantina foi o carotenóide que apresentou menor valor da tonalidade cromática, enquanto que, os valores do  $\beta$ -caroteno,  $\beta$ -criptoxantina e zeaxantina foram muito semelhantes (Figura 6b). Este comportamento foi observado por Meléndez-Martínez et al. (2007) que analisaram  $\beta$ -caroteno,  $\beta$ -criptoxantina, zeaxantina e cantaxantina, reportando que a presença do grupo hidroxila não afetou o cromóforo, porém a presença do grupo carbonila, como ocorre na cantaxantina, aumentou o cromóforo e reduziu o valor de  $h$ ; por isso a cantaxantina é vermelha e o  $\beta$ -caroteno é laranja.

Como mostra a Figura 7, o 12-apo-carotenal apresentou maior valor negativo de  $a^*$  e a astaxantina maior valor positivo de  $a^*$ , indicando que, a maior intensidade da cor vermelha (valor positivo  $a^*$ ) ocasionou maior escurecimento da amostra (menor valor  $L^*$ ).

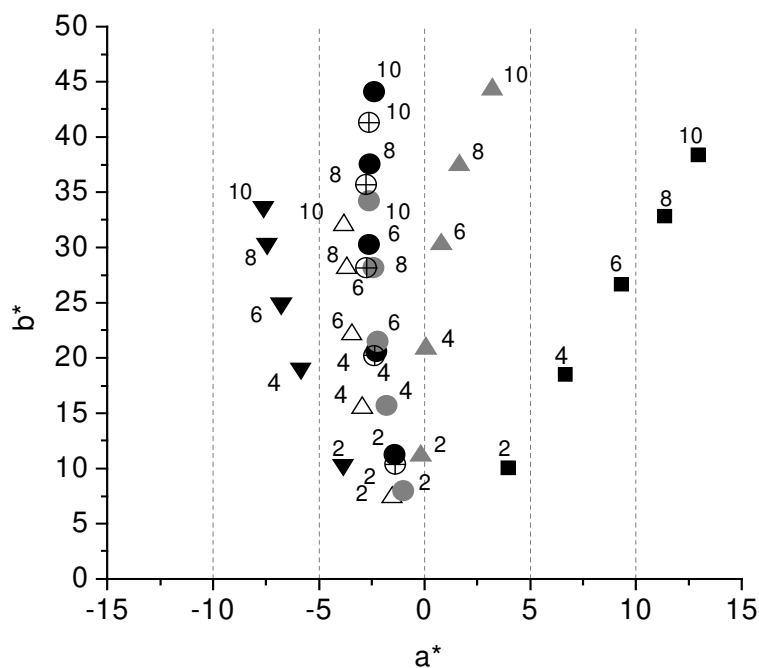


Figura 7. Localização dos carotenóides no plano  $a^* b^*$ . Carotenóides estudados: 8-apo-carotenal (triângulo cinza), 10-apo-carotenal (triângulo vazado), 12-apo-carotenal (triângulo preto invertido),  $\beta$ -caroteno (círculo preto),  $\beta$ -criptoxantina (círculo cinza), zeaxantina (círculo com cruz) e astaxantina (quadrado preto). Os números ao lado dos símbolos indicam a concentração de cada carotenóide ( $\mu\text{M}$ ).

No presente estudo, a astaxantina, carotenóide vermelho com o maior número de I.d.c., 13 I.d.c. (9 na cadeia poliênica, 2 no anel, 2 do grupo carbonila,  $\lambda_{\text{max}}$  478 nm, hexano), localizou-se no primeiro quadrante do plano (valor positivo de  $a^*$  e  $b^*$ ), enquanto que os carotenóides mais amarelos apresentaram-se próximos ao eixo  $b^*$  no segundo quadrante (valor negativo de  $a^*$  e positivo de  $b^*$ ), como mostra a Figura 7. O mesmo comportamento foi observado por Meléndez-Martínez et al. (2007), os carotenóides vermelhos, licopeno e cantaxantina, foram localizados no primeiro quadrante do plano (valor positivo de  $a^*$  e  $b^*$ ), enquanto que, os mais amarelos foram localizados próximos ao eixo  $b^*$  no segundo quadrante (valor negativo de  $a^*$  e positivo de  $b^*$ ).

O  $\beta$ -caroteno,  $\beta$ -criptoxantina e zeaxantina, todos com 11 l.d.c. (9 na cadeia poliênica, 2 no anel,  $\lambda_{\text{max}}$  450 nm, em éter de petróleo, EP), apresentaram menor valor negativo de  $a^*$  que o 12-apo-carotenal (6 l.d.c. na cadeia poliênica, 1 anel, 1 do grupo carbonila,  $\lambda_{\text{max}}$  412 nm, em EP), valores muito próximos ao 10-apo-carotenal (7 l.d.c. na cadeia poliênica, 1 anel, 1 do grupo carbonila,  $\lambda_{\text{max}}$  434 nm, em EP), enquanto que o 8-apo-carotenal (8 l.d.c. na cadeia poliênica, 1 anel, 1 do grupo carbonila,  $\lambda_{\text{max}}$  454 nm, em EP) apresentou valores positivos de  $a^*$  (Figura 7). Portanto, o maior número de l.d.c., na cadeia carbônica ou devido à presença do grupo carbonila, aumentou a intensidade da cor vermelha, já o grupo hidroxila, presente na  $\beta$ -criptoxantina e na zeaxantina, não modificou a intensidade da cor vermelha.

Independentemente da concentração, a astaxantina sempre mostrou maior valor positivo de  $a^*$  em relação aos outros carotenóides (Figura 7). Já o  $\beta$ -caroteno,  $\beta$ -criptoxantina e zeaxantina, que possuem o mesmo número de l.d.c., apresentaram valores negativos de  $a^*$  muito próximos nas diferentes concentrações, entre -0,98 a -2,62, e valor de  $b^*$  variando de 8 (menor concentração) para 44 (maior concentração), portanto, ocorreu maior intensidade da cor amarela com a variação da concentração. Entre os apo-carotenais, o valor de  $b^*$  aumentou da menor para a maior concentração, sendo que, o 8-apo-carotenal apresentou maior valor de  $b^*$  nas diferentes concentrações e foi o único que apresentou valor positivo de  $a^*$  com o aumento da concentração.

### 3.4. Relação entre atividade anti-radical livre e parâmetros de cor

Os carotenóides com menor número de I.d.c., 8-apo-carotenal (10 I.d.c.), 10-apo-carotenal (9 I.d.c.) e 12-apo-carotenal (8 I.d.c.), apresentaram menor atividade anti-radical livre, exceto o 8-apo-carotenal que a partir da concentração 6  $\mu\text{M}$  mostrou atividade maior que a astaxantina (13 I.d.c.). Isto indica que a astaxantina em concentração maior que 6  $\mu\text{M}$  pode ter formado agregado ou ter menor solubilidade em acetato de etila não apresentando aumento da porcentagem de inibição, conforme Figura 8.

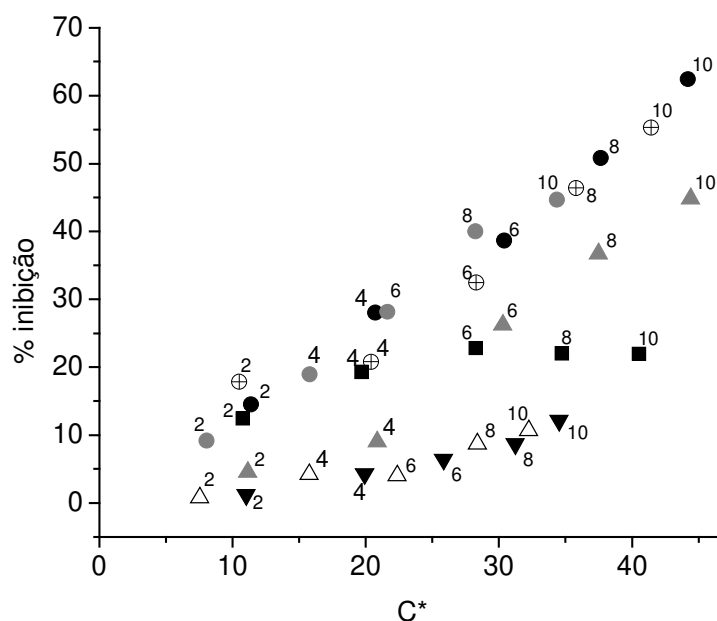


Figura 8. Atividade anti-radical livre de diferentes carotenóides, em diferentes concentrações, em função da coordenada de cor croma (C\*). Carotenóides estudados: 8-apo-carotenal (triângulo cinza), 10-apo-carotenal (triângulo vazado), 12-apo-carotenal (triângulo preto invertido),  $\beta$ -caroteno (círculo preto),  $\beta$ -criptoxantina (círculo cinza), zeaxantina (círculo com cruz) e astaxantina

(quadrado preto). Os números ao lado dos símbolos indicam a concentração de cada carotenóide ( $\mu\text{M}$ ).

Entre os carotenóides com 11 l.d.c.,  $\beta$ -caroteno,  $\beta$ -criptoxantina e zeaxantina ( $\lambda_{\text{max}}$  450 nm, em EP), é possível notar que os valores  $C^*$  e porcentagem de inibição aumentaram linearmente com o aumento da concentração, sendo que o  $\beta$ -caroteno apresentou maior atividade e valor de  $C^*$ .

#### 4. CONCLUSÕES

A atividade anti-radical livre dos carotenóides estudados, em ordem decrescente, foi:  $\beta$ -caroteno, zeaxantina,  $\beta$ -criptoxantina, 8-apo-carotenal, astaxantina, 10-apo-carotenal e 12-apo-carotenal, portanto, o grupo carbonila e o menor número de l.d.c. reduziram a atividade anti-radical livre do carotenóide. O aumento da concentração influenciou pouco a luminosidade, mas aumentou o croma, principalmente pela maior intensidade da cor amarela. Em relação às coordenadas de cor ( $a^*$  e  $b^*$ ) o  $\beta$ -caroteno,  $\beta$ -criptoxantina e zeaxantina apresentaram aumento de 2,7 vezes do valor negativo de  $a^*$  com o aumento da concentração, já o valor positivo de  $b^*$  aumentou 5,5 vezes, indicando maior tonalidade da cor amarela. Entre os apo-carotenais, o 8-apo-carotenal foi o único que apresentou valor positivo de  $a^*$  a partir da concentração 6  $\mu\text{M}$ , enquanto que, a astaxantina apresentou valor positivo de  $a^*$  em todas as concentrações analisadas, portanto estes carotenóides mostraram maior intensidade da cor vermelha. O parâmetro  $C^*$  e a porcentagem de inibição dos carotenóides estudados apresentaram correlação linear para os carotenóides com comprimento de onda máximo de absorção em torno de 450 nm.

## 5. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a FAPESP e CAPES pelo suporte financeiro.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMED, J.; SHIVHARE, U.S.; SANDHU, K.S. Thermal degradation kinetics of carotenoids and visual color of papaya puree. **Journal of Food Science**, v. 67, p. 2692-2695, 2002.

ARIAS, R.; LEE, T.C.; LOGENDRA, L.; JANES, H. Correlation of lycopene measured by HPLC with the L\*, a\*, b\* color readings of a hidroponic tomato and the relationship of maturity with color and lycopene content. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 1697-1702, 2000.

BOHM, V.; PUSPITASARI-NIENABER, N.L.; FERRUZZI, M.G.; SCHWARTZ, S.J. Trolox equivalent antioxidant capacity of different geometrical isomers of  $\alpha$ -carotene,  $\beta$ -carotene, lycopene and zeaxanthin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 221-226, 2002.

CHOI, M.H.; KIM, G.H.; LEE, H.S. Effects of ascorbic acid retention on juice color and pigment stability in blood orange (*Citrus sinensis*) juice during refrigerated storage. **Food Research International**, v. 35, p. 753-759, 2002.



- DAVIS, B.H.; GOODWIN, T.W. Carotenoids. In chemistry and biochemistry of plant pigments, vol. 2<sup>nd</sup>. London, pp. 38-165, 1976.
- DI MASCIO, P.; KAISER, S.; SIES, H. Lycopene as the most efficient biological carotenoid singlet oxygen quencher. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 274, p. 532-538, 1989.
- 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.
- MERCADANTE, A.Z.; ENGELAND, E.S. Handbook of Carotenoids. Britton, G.; Liaaen-Jensen, S. and Pfander, H. (eds). Birkhauser, Basel, 1-33, 2004.
- MILLER, N.J.; SAMPSON, J.; CANDEIAS, L.P.; BRAMLEY, P.M.; RICE-EVANS, C.A. Antioxidant activities of carotenes and xanthophylls. **FEBS Letters**, v. 384, p. 240-242, 1996.
- RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 26, p. 1231-1237, 1999.
- RICE-EVANS, C.A.; MILLER, N.J.; PAGANGA, G. Antioxidant properties of phenolic compounds. **Trends in Plant Science**, v. 2, p. 152-159, 1997.
- STRATTON, S.P.; SCHAEFER, W.H.; LIEBLER, D.C. Isolation and identification of singlet oxygen oxidation products of  $\beta$ -carotene. **Chemical Research in Toxicology**, v. 6, p. 542-547, 1993.

WOODALL, A.A.; LEE, S.W.M.; WEESIE, R.J.; JACKSON, M.J.; BRITTON, G.  
Oxidation of carotenoids by free radicals: relationship between structure and reactivity. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1336, p. 33-42, 1997.

## **CAPÍTULO 3**

### **COMPOSTOS BIOATIVOS EM DIVERSAS FRUTAS TROPICAIS E CORRELAÇÃO POR ANÁLISE MULTIVARIADA COM A ATIVIDADE ANTI-RADICAL LIVRE**

**Manuscrito em preparação para ser submetido à Ciência e Tecnologia de Alimentos**



## RESUMO

O alto consumo de frutas tem sido associado com a baixa incidência de doenças crônico-degenerativas, mais provavelmente, devido à presença de compostos bioativos nestes alimentos. Os teores de ácido ascórbico (AA), compostos fenólicos totais, flavonóides e carotenóides totais foram determinados em polpas de frutas tropicais obtidas no laboratório a partir de 18 frutas tropicais adquiridas no Brasil. A atividade anti-radical livre foi investigada pelo método ABTS, e expressa como TEAC (Trolox Equivalent Activity Capacity). As frutas que apresentaram maior teor de compostos bioativos foram buriti, cajá-manga, canistel, murici, physalis, piquia e tucumã. As frutas foram divididas em 5 grupos, segundo Análise Hierárquica de Agrupamentos (AHA). Aplicando a Análise de Componentes Principais (ACP), a atividade anti-radical livre mostrou alta correlação com compostos fenólicos totais ( $r = 0,99$ ) e flavonóides ( $r = 0,86$ ); porém, a correlação encontrada foi muito pequena para AA ( $r = 0,02$ ) e carotenóides totais ( $r = 0,08$ ).

Palavras-chave: ácido ascórbico, carotenóides, compostos fenólicos totais, TEAC, Análise de Componentes Principais.

## SUMMARY

Bioactive compounds from several tropical fruits and correlation by multivariate analysis to antioxidant activity

High ingestion of fruits has been associated with low incidence of chronic-degenerative diseases, most probably due to the presence of bioactivity compounds in these foods. The levels of ascorbic acid (AA), total phenolic compounds, flavonoids and total carotenoids were determined in tropical fruit pulps obtained in the laboratory from 18 tropical fruits acquired in Brazil. The free radical scavenger was evaluated by the ABTS assay, and expressed as TEAC (Trolox Equivalent Activity Capacity). The fruits that showed higher levels of bioactivity compounds were buriti, caja-manga, canistel, murici, physalis, piquia and tucumã. The fruits were divided in five groups, following Hierarchical Cluster Analysis (HCA). Applying Principal Component Analysis (PCA), the free radical scavenger showed high correlation with total phenolic compounds ( $r= 0.99$ ) and flavonoids ( $r= 0.86$ ); however, correlation was found to be very poor with AA ( $r= 0.02$ ) and total carotenoids levels ( $r= 0.08$ ).

**KEYWORDS:** ascorbic acid, carotenoids, total phenolic compounds, TEAC, Principal Component Analysis.

## 1- INTRODUÇÃO

O Brasil destaca-se como o terceiro maior produtor mundial de frutas frescas devido a um clima altamente favorável e grande extensão territorial. O agronegócio da fruticultura é uma atividade em franco crescimento, presente em todos os estados brasileiros, respondendo por 25% do valor de produção agrícola nacional. A fruticultura no Brasil experimentou nas últimas décadas notável expansão da área colhida, com incorporação de frutas nativas e exóticas e mudanças gradativas no cenário de produção. A comercialização dirigida quase que exclusivamente para o mercado interno, deu lugar a conquistas de mercados externos, o que foi determinante para a melhoria dos sistemas produtivos e da qualidade das frutas (LACERDA, LACERDA & ASSIS, 2004). Apesar da diversidade de frutas que dispõe, de tropicais a temperadas, o Brasil precisa ainda avançar muito na área, pois em 2004, a participação brasileira nas exportações de frutas correspondeu a 4,45% ([www.agricultura.gov.br](http://www.agricultura.gov.br)).

O alto consumo de frutas tem sido associado com a baixa incidência de doenças degenerativas (FESKANICH et al., 2000; MICHELS et al., 2000). Este efeito está associado não somente à presença de antioxidantes como as vitaminas A, C e E, mas também, a outras substâncias naturais que mostram atividade anti-radical livre como os carotenóides, flavonóides e outros compostos fenólicos.

O ácido ascórbico (vitamina C) tem inúmeras funções biológicas e desempenha um papel importante como antioxidante, prevenindo danos celulares causados pela oxidação (BLOCK, 1993). Alguns carotenóides, como, por exemplo,  $\beta$ -caroteno, possuem comprovada atividade de pró-vitamina A e são capazes de agir como antioxidante atuando sobre radicais livres ou oxigênio singlete. Os

compostos fenólicos também agem como antioxidante, pois possuem habilidade de capturar radicais livres (RICE-EVANS, MILLER & PAGANGA, 1996).

Os alimentos geralmente contêm uma diversidade de compostos com atividade anti-radical livre que são hidrofílicos, por exemplo ácido ascórbico, e outros que são lipofílicos, como os carotenóides, portanto é interessante utilizar um método capaz de avaliar a capacidade antioxidante de compostos com diferentes polaridades. Um grande número de métodos tem sido usado para determinar atividade anti-radical livre, entre eles, o método indireto ABTS, que pode ser aplicado no estudo de compostos antioxidantes hidrofílicos e lipofílicos, tanto puros ou como extratos (ROGINSKY & LISSI, 2005; RE et al., 1999).

Este trabalho tem como objetivo realizar uma avaliação exploratória dos teores de alguns constituintes químicos que apresentam funcionalidade como ácido ascórbico, compostos fenólicos, flavonóides e carotenóides totais, assim como, a atividade anti-radical livre de 18 polpas de frutas tropicais. Além disso, análises estatísticas multivariadas, especificamente Análise de Componentes Principais (ACP) e Análise Hierárquica de Agrupamentos (AHA), foram utilizadas para caracterizar e agrupar as polpas de frutas e verificar a correlação entre os constituintes químicos analisados e a atividade anti-radical livre.



## 2- MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1- Amostras

As frutas adquiridas na região norte (Manaus) e nordeste (Fortaleza) do Brasil foram bacuri (*Rheedia gardneriana* M.), buriti (*Mauritia flexuosa*), cajá-manga (*Spondias dulcis*), cubiu (*Solanum sessiliflorum* Dunal), maná-cubiu (*Solanum sessiliflorum*), mari (*Geoffroia striata*), murici (*Byrsonima crassifolia* L. Rich), piquia (*Caryocar villosu*) e tucumã (*Astrocaryum aculeatum* G. Mey).

As demais frutas foram adquiridas na região sudeste (Campinas): ameixa (*Ximenia americana* L.), ameixa-européia (*Prunus domestica* L.), banana variedade ouro (*Musa ssp.*), canistel (*Pouteria campechiana* Baehni), carambola (*Averrhoa carambola*), jaca (*Artocarpus heterophyllus*), nectarina (*Prunus persica* L. Batsch var. *Nucipersica*), nêspera (*Eriobotrya japonica* L.) e physalis (*Physalis angulata*).

Os lotes de cada fruta tinham peso entre 300 e 600 gramas. As diferentes frutas foram picadas, a casca e sementes retiradas e as polpas foram homogeneizadas em processador e congeladas. Estas polpas foram estocadas a temperatura de -4° C até o momento das análises.

## 2.2- Reagentes e equipamentos

Os reagentes utilizados foram metanol, etanol, acetona, éter de petróleo, éter etílico, carbonato de sódio, cloreto de alumínio, hidróxido de potássio e hidróxido de sódio, todos grau p.a. da marca Synth; ácido oxálico, 2,6-diclorofenolindofenol, nitrato de sódio e ácido ascórbico foram adquiridos da Merck; Folin-Ciocalteu, da Dinâmica e ácido gálico, da Extrasynthèse; ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina)-6-sulfônico (ABTS), persulfato de potássio, catequina e ácido 6-hidróxido-2,5,7,8-tetrametilcroma-2-carboxílico (Trolox), da Sigma. Utilizou-se para as análises um espectrofotômetro de arranjo de diodos da marca Agilent, modelo 8453.

## 2.3- Métodos

### 2.3.1- Extração

A 10 g de cada amostra foram adicionados 50 mL de solução metanol/água (8:2), seguido de agitação no ultra-som por 20 minutos. Posteriormente, esta mistura foi filtrada em funil de Buchner e lavada com pequena porção de metanol. Estas etapas foram realizadas mais duas vezes, com 20 mL adicionais de metanol/água (8:2). Os três filtrados foram misturados e transferidos para um balão volumétrico de 100 mL. Após 1 hora no freezer, a solução foi centrifugada a 2000 rpm por 20 min, o sobrenadante foi retirado e mantido em freezer (**extrato A**). A extração foi realizada em duplicata.

### 2.3.2- Determinação de ácido ascórbico

A determinação de ácido ascórbico (AA) foi realizada tanto na polpa como no extrato A (obtido segundo item 2.3.1), sendo que, a determinação no extrato A foi realizada somente para verificar possível interferência na análise de fenóis totais. A cerca de 10 g de amostra (polpa ou extrato), foram adicionados 30 mL ácido oxálico 1%, homogeneizado, seguido de filtração, lavagem adicional com 10 mL ácido oxálico 1%. Em seguida, o filtrado foi transferido para um balão volumétrico de 50 mL e mantido no escuro, sob refrigeração. Após 15 minutos, foi retirado uma alíquota de 10 mL, a qual foi titulada com 2,6 diclorofenolindofenol (DCFI) 0,02 % (BENASSI & ANTUNES, 1988). A concentração de AA foi calculada pela comparação com padrão de AA titulado no dia da análise. A análise foi realizada em duplicata.

### 2.3.3- Determinação de fenóis totais

Ao balão volumétrico de 25 mL foi adicionado 9 mL de água destilada, 1 mL do extrato A (item 2.3.1) e 1 mL do reagente Folin-Ciocalteu, em seguida foi homogeneizado. Após 5 minutos, foi adicionado 10 mL de solução  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  7% e o volume completado com água destilada. Após 90 min em repouso a 23 °C no escuro, foi realizada a leitura da absorbância a 765 nm. Para construção da curva-padrão foram utilizadas soluções com concentração entre 50 e 200 mg/L de ácido gálico (KIM, JEONG & LEE, 2003a). A análise foi realizada em triplicata e o resultado foi expresso em equivalente ácido gálico (EAG) por 100 gramas. Foi verificado que a presença do ácido ascórbico nos extratos (0,3 a 3,8 mg AA/100g) não influenciou no resultado da reação com Folin-Ciocalteu.

#### 2.3.4- Determinação de flavonóides

Foram adicionados 4 mL de água destilada, 1 mL do extrato A (item 2.3.1) e 0,3 mL da solução  $\text{NaNO}_2$  5% ao balão volumétrico de 10 mL e, após 5 minutos, foi adicionado 0,3 mL de solução de  $\text{AlCl}_3$  10%. Ao completar 6 minutos de repouso no escuro, foram adicionados 2 mL de  $\text{NaOH}$  1 M e o volume completado com água destilada. A leitura da absorbância foi realizada a 510 nm. Para a construção da curva-padrão foram utilizadas soluções com concentração entre 50 e 200 mg/L de catequina (ZHISHEN, MENGCHENG & JIANMING, 1999). A análise foi realizada em triplicata e o resultado foi expresso em equivalente catequina (EC) por 100 gramas.

#### 2.3.5- Determinação da atividade anti-radical livre

A determinação da atividade anti-radical livre foi realizada no extrato A (item 2.3.1). Uma alíquota de 1 mL do extrato foi completamente seca sob fluxo de nitrogênio e, imediatamente dissolvida em 1 mL de etanol.

Para a formação do radical ABTS, a solução aquosa de ABTS (7 mM, concentração final) foi adicionada à solução de persulfato de potássio (2,45 mM, concentração final). Esta mistura foi mantida no escuro à temperatura ambiente por 12-16 horas; após este tempo, a absorbância foi corrigida para 0,70 ( $\pm$  0,02), medida a 734 nm, com a adição de etanol. A 2 mL da solução do radical  $\text{ABTS}^{\bullet+}$  foi adicionado 20  $\mu\text{L}$  da amostra (extrato) ou padrão Trolox (0-15  $\mu\text{M}$ , concentração final) e mantido em ultra-som por 30 segundos. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro após 6 minutos, para os padrões e 60 minutos para as amostras (RE et al., 1999). A análise foi realizada em triplicata.

A atividade anti-radical livre foi determinada a partir da curva do padrão de referência (Trolox) obtida plotando a porcentagem de inibição (equação 1) em função da concentração final do padrão (equação 2).

$$\%INIBIÇÃO = \frac{(A_{t=0} - A_{t=6})}{A_{t=0}} \times 100 \quad \text{equação 1}$$

$$[TROLOX]_{final} = \frac{[TROLOX] \times V_{adicionado}}{V_{final}} \quad \text{equação 2}$$

onde,  $A_{t=0}$  corresponde à absorbância medida no tempo zero e  $A_{t=6}$  à absorbância no tempo 6 minutos.

Em seguida foi determinada a porcentagem de inibição da amostra e calculada a concentração equivalente de Trolox (conc equi Trolox), através da curva-padrão deste padrão. O valor de TEAC foi obtido conforme a equação 3.

$$TEAC = \frac{conc \cdot equi \cdot Trolox}{massa amostra em 20\mu L} \times 0,1 (mM / 100g) \quad \text{equação 3}$$

### 2.3.6- Determinação de carotenóides totais

A extração foi executada de acordo com DE ROSSO & MERCADANTE (2007). Os carotenóides foram extraídos com acetona até exaustão e transferidos para éter etílico/éter de petróleo (1:1). O extrato foi saponificado com 10% KOH em metanol à temperatura ambiente por 16 h, seguido de lavagem com água para retirada do álcali. Os extratos de carotenóides foram concentrados até *secura* em evaporador rotatório ( $T < 35^{\circ}C$ ), secos sob nitrogênio e mantidos em frasco selado em freezer. A extração foi realizada em duplicata.

Ao extrato seco foi adicionado volume conhecido de éter de petróleo para quantificação dos carotenóides totais, através da leitura no comprimento de onda máximo de absorção ( $\lambda_{\text{max}}$ ), em espectrofotômetro na faixa de 220 a 750 nm, utilizando a absortividade do  $\beta$ -caroteno em éter de petróleo (2592) para cálculo de concentração (DAVIS, 1976).

### 2.3.7- Análise Estatística

Os dados dos constituintes químicos e atividade anti-radical em frutas foram avaliados pela análise de Componentes Principais e Análise de Agrupamentos através dos procedimentos “Multivariate Exploratory Techniques” – “Cluster Analysis” e “Principal Componentes & Classification Analysis”, do programa computacional Statistica 6.0 (STATSOFT, 2001). Os dendrogramas foram obtidos por estratégia de agrupamento não-ponderado aos pares e foi considerada a distância euclidiana como coeficiente de semelhança.

### 3- RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os teores de ácido ascórbico (AA), fenóis totais, flavonóides totais, carotenóides totais e atividade anti-radical livre (TEAC) das 18 polpas de frutas tropicais estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Teores de compostos bioativos e atividade anti-radical livre em polpas de frutas tropicais.

Frutas	ácido ascórbico <sup>a</sup> mgAA/100g	fenóis totais <sup>b</sup> mg EAG/100g	flavonóides totais <sup>b</sup> mg EC/100g	carotenóides totais <sup>c</sup> mg/100g	TEAC <sup>b</sup> mM/100g
Ameixa (A)	1,8 ± 0,0	77,1 ± 0,5	67,4 ± 3,7	0,5 ± 0,0	100,0 ± 10,0
Ameixa européia (B)	0,8 ± 0,1	105,5 ± 5,6	78,6 ± 3,2	0,2 ± 0,0	210,0 ± 30,0
Bacuri (C)	0,5 ± 0,0	266,8 ± 3,3	103,8 ± 0,3	0,1 ± 0,0	1640,0 ± 30,0
Banana (D)	0,6 ± 0,0	117,8 ± 2,4	62,8 ± 2,7	0,2 ± 0,0	180,0 ± 30,0
Buriti (E)	0,7 ± 0,0	108,1 ± 6,8	71,3 ± 3,6	14,2 ± 0,5	540,0 ± 10,0
Cajá-manga (F)	28,2 ± 0,3	99,4 ± 2,8	18,2 ± 0,3	0,3 ± 0,0	210,0 ± 10,0
Canistel (G)	36,5 ± 0,7	187,5 ± 1,7	90,6 ± 0,6	2,1 ± 0,0	140,0 ± 10,0
Carambola (H)	0,7 ± 0,0	51,9 ± 2,1	42,6 ± 2,3	0,8 ± 0,0	770,0 ± 70,0
Cubiu (I)	3,0 ± 0,4	71,9 ± 1,8	56,6 ± 4,4	0,6 ± 0,0	140,0 ± 10,0
Jaca (J)	1,0 ± 0,0	34,1 ± 1,0	18,3 ± 2,9	0,3 ± 0,0	50,0 ± 3,0
Maná cubiu (K)	0,4 ± 0,0	76,0 ± 1,5	54,4 ± 1,9	0,1 ± 0,0	70,0 ± 10,0
Mari (L)	0,5 ± 0,0	109,3 ± 3,9	57,8 ± 6,7	1,8 ± 0,0	230,0 ± 10,0
Murici (M)	0,4 ± 0,0	384,5 ± 7,7	319,4 ± 3,6	1,2 ± 0,1	1840,0 ± 10,0
Nectarina (N)	0,5 ± 0,0	32,0 ± 1,7	23,7 ± 1,2	0,6 ± 0,0	80,0 ± 10,0
Nêspera (O)	0,6 ± 0,0	33,6 ± 0,5	24,3 ± 0,2	1,4 ± 0,0	100,0 ± 10,0
Physalis (P)	20,6 ± 0,5	39,4 ± 0,7	14,4 ± 1,0	1,7 ± 0,0	130,0 ± 10,0
Piquia (Q)	5,9 ± 0,5	4623,4 ± 102,4	741,2 ± 36,6	0,4 ± 0,0	25280,0 ± 1570,0
Tucumã (R)	4,6 ± 0,1	456,8 ± 5,2	433,2 ± 10,4	4,3 ± 0,1	2150,0 ± 40,0

Os dados correspondem à média e desvio padrão de: a- quatro valores obtidos das polpas; b- seis valores obtidos do extrato A; c- dois valores obtidos das polpas; AA- ácido ascórbico; EAG- equivalente ácido gálico; EC- equivalente catequina. As letras entre parênteses são referentes à Figura 2.

Das polpas de frutas analisadas, a piquia apresentou os maiores valores de TEAC, de fenóis totais e de flavonóides, a de canistel o maior teor de ácido ascórbico, enquanto que o maior conteúdo de carotenóides totais foi detectado na polpa de buriti.

O valor de ácido ascórbico encontrado no canistel foi 1,6 vez menor que o encontrado por IGLESIAS et al. (1999) que classificaram o canistel como uma boa fonte de vitamina C por apresentar teor de ácido ascórbico de 58 mg/100g. O teor de carotenóides totais presente no buriti foi 3,6 vezes menor que o encontrado por DE ROSSO & MERCADANTE (2007) que analisaram diferentes frutas provenientes da Amazônia (Brasil), e o buriti foi a que apresentou o maior conteúdo de carotenóides totais (51,4 mg/100g) e foi considerada a fonte mais rica de pró-vitamina A (7280 RE/100g). GODOY & RODRIGUEZ-AMAYA (1994) também verificaram que o buriti é uma excepcional fonte de pró-vitamina A (6992 RE/100g).

Os valores de fenóis totais das ameixas (Tabela 1) ficaram dentro da faixa encontrada por GIL et al. (2002) (42 a 109 mg/100g) enquanto que os valores de carotenóides totais foram maiores que os encontrados por estes autores (0,07 a 0,26 mg/100g) que analisaram ameixa proveniente da Califórnia (Estados Unidos). Por outro lado, KIM et al. (2003b) e CHUN et al. (2003) encontraram valores de fenóis totais maiores na ameixa proveniente de Nova York (125 a 373 mg EAG/100g e 138 a 684 mg EAG/100g, respectivamente), enquanto que os teores de flavonóides reportados por estes autores, 65 a 258 mg EC/100g e 59 a 366 mg EC/100g, respectivamente, ficaram dentro da faixa encontrada no presente estudo.

Para nectarina, GIL et al. (2002) relataram teor de carotenóides totais 3,1 vezes menor (0,08 a 0,19 mg/100g) e valor de fenóis totais (14 a 102 mg/100g) similar ao reportado na Tabela 1.



LUXIMON-RAMMA, BAHORUN & CROZIER (2003) encontraram 24 mg/100g de ácido ascórbico, 105 mg EAG/100g de fenóis totais e 18 mg equivalente quercetina (EQ)/100g de flavonóides na fruta cajá-manga, proveniente da Maurîtânia, valores estes semelhantes aos reportados na Tabela 1. Os autores também relataram teores de ácido ascórbico, fenóis totais e flavonóides para carambola (19 mg/100g, 210 mg EAG/100g e 15 mg EQ/100g, respectivamente) e banana (0,8 mg/100g, 12 mg EAG/100g e 6 mg EQ/100g, respectivamente). Portanto, os valores de fenóis totais da carambola e ácido ascórbico da banana, reportados por estes autores, foram próximos aos apresentados na Tabela 1.

Os valores de carotenóides totais (Tabela 1) das frutas physalis e tucumã foram maiores que os encontrados por DE ROSSO & MERCADANTE (2007) (0,81 mg/100g para physalis e 0,62 mg/100g para tucumã). O valor de carotenóides totais da nêspera (Tabela 1) ficou dentro da faixa encontrada por FARIA et al. (2008) de 0,2 a 3,0 mg/100g. JAGADEESH et al. (2007) encontraram 0,59 mg/100g de carotenóides totais na jaca, proveniente da Índia, este valor foi o dobro do obtido no presente trabalho (Tabela 1).

A comparação com a literatura deixa claro que a procedência da matéria prima (local de cultivo, solo e clima) representa uma fonte considerável de variabilidade na composição. No entanto, pela ampla faixa de valores reportada em alguns trabalhos, fatores como estágio de maturação da fruta, cultivar, época do ano que foi realizada a colheita e temperatura, entre outros, podem ter contribuído para estas diferenças.

Em relação as demais frutas (bacuri, cubiu, maná-cubiu, mari, murici e piquia) não foram encontrados dados referentes aos teores de fenóis totais, flavonóides, carotenóides totais e atividade anti-radical livre na literatura até o presente momento.

A Análise de Agrupamentos permitiu separar as polpas em 5 grupos distintos, como pode ser observado na Figura 1. O primeiro grupo foi formado pela amostra piquia que tem como característica uma atividade anti-radical livre muito alta, devido, provavelmente, ao elevado teor de fenóis e flavonóides. O segundo grupo representado pelas amostras murici e tucumã mostrou atividade anti-radical livre intermediária (1840 e 2150 mM/100g, respectivamente) com valores 12,5 vezes menor que a piquia. As frutas ameixa, cubiu, banana, maná-cubiu, carambola, jaca, nectarina, mari, nêpera e bacuri pertencentes ao terceiro grupo foram caracterizadas pela atividade anti-radical livre menor (50 a 1600 mM/100g). Os demais grupos também apresentaram baixa atividade anti-radical livre (130 a 540 mM/100g); porém, o quarto grupo, que incluiu cajá-manga, canistel e physalis, se caracterizou pelo maior teor de ácido ascórbico (20 a 40 mg/100g) e o quinto grupo, composto somente pelo buriti, apresentou o teor mais elevado de carotenóides totais (14 mg/100g).

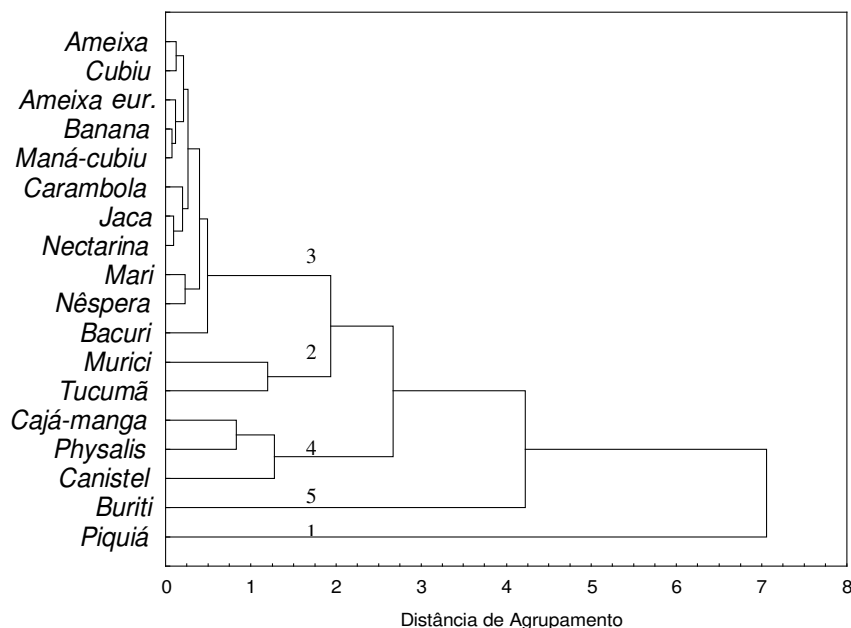


Figura 1. Dendrograma, considerando a composição de compostos bioativos (AA, fenóis, flavonóides e carotenóides) e capacidade anti-radical livre das 18 polpas de frutas analisadas.

A análise de componentes principais (ACP), permitiu a separação das amostras pelas características de composição e atividade anti-radical livre, podendo ser observada a formação dos mesmos cinco grupos anteriormente descritos (Figura 2).

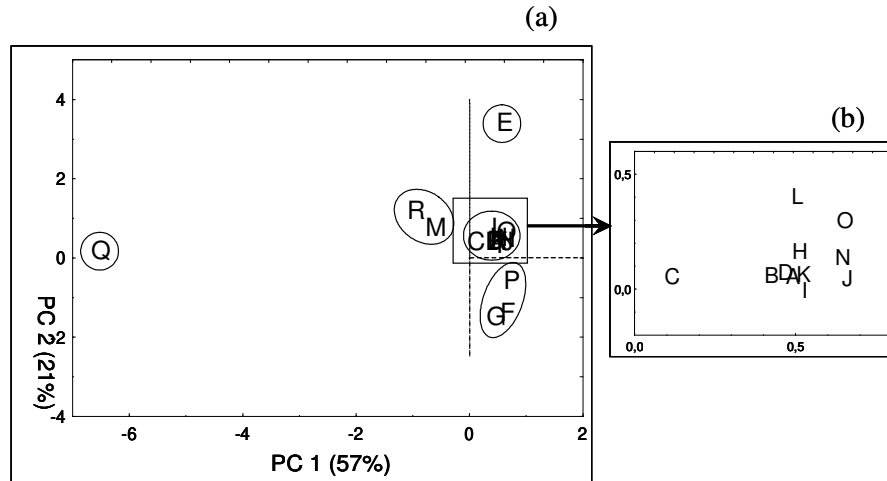


Figura 2. Configuração das amostras obtida pela Análise de Componentes Principais, a partir dos dados de composição de compostos bioativos e capacidade anti-radical livre das polpas das diferentes frutas analisadas. Projeção geral (a) e detalhe expandido da região circundada pelo quadrado (b).

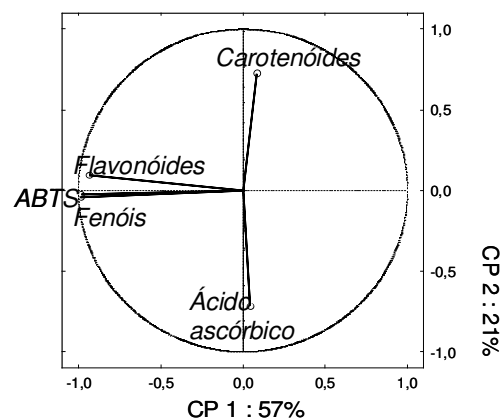


Figura 3. Projeção das variáveis na Análise de Componentes Principais obtidas a partir dos dados de composição e capacidade anti-radical livre dos extratos das diferentes frutas analisadas.

A primeira componente principal (CP1), responsável por 57% da variância total dos dados, foi correlacionada principalmente com o conteúdo de fenóis totais, flavonóides totais e atividade anti-radical livre, enquanto a segunda componente (CP2, 21% da variabilidade) correlacionou-se com AA e carotenóides totais (Figura 3).

Com relação às correlações entre as variáveis somente os fenóis totais ( $r = 0,99$ ) e os flavonóides ( $r = 0,86$ ) se correlacionaram positivamente com a atividade anti-radical livre medida com o radical ABTS (Tabela 2 e Figura 3).

Tabela 2. Correlações entre as variáveis obtidas nas análises efetuadas.

Variável	AA	Fenóis	Flavonóides	Carotenóides	ABTS
AA	1,000	0,000	-0,068	-0,042	-0,023
Fenóis	0,000	1,000	0,871	-0,086	0,999
Flavonóides	-0,068	0,871	1,000	0,015	0,866
Carotenóides	-0,042	-0,086	0,015	1,000	-0,083
ABTS	-0,023	0,998	0,866	-0,083	1,000

De acordo com a literatura, vários autores também relataram alta correlação entre atividade anti-radical livre e fenóis totais. CHUN et al. (2003) e CAI et al. (2004) encontraram correlação de  $r = 0,99$  e  $r = 0,96$ , respectivamente, ambos utilizando o radical ABTS para determinar a atividade anti-radical livre. SILVA et al. (2007) encontraram melhor correlação utilizando o radical ABTS ( $r = 0,88$ ) comparado ao método ORAC ( $r = 0,70$ ). Estes autores também reportaram boa correlação entre flavonóides e atividade anti-radical livre, medida tanto pelo método ABTS ( $r = 0,75$ ) como pelo ORAC ( $r = 0,74$ ).

As correlações obtidas no presente trabalho foram muito similares às relatadas por GIL et al. (2002) ( $r= 0,93$  a  $0,96$ ) e LUXIMON-RAMMA, BAHORUN & CROZIER (2003) ( $r= 0,98$ ). Os resultados obtidos por GIL et al. (2002) mostraram boa correlação entre fenóis totais e atividade anti-radical livre, utilizando tanto o radical DPPH como o método FRAP ( $r= 0,78$  a  $0,96$  e  $r= 0,86$  a  $0,99$ , respectivamente), enquanto que não foi encontrada boa correlação da atividade anti-radical livre com os teores de ácido ascórbico e carotenóides. LUXIMON-RAMMA, BAHORUN & CROZIER (2003) observaram o mesmo comportamento, com alta correlação entre fenóis totais e atividade anti-radical livre ( $r= 0,98$  com o radical ABTS e  $r= 0,95$  pelo método FRAP) e baixa correlação entre ácido ascórbico e atividade anti-radical livre, com  $r= 0,07$  (ABTS) e  $r= 0,04$  (FRAP).

#### 4- CONCLUSÕES

Este estudo confirmou a alta correlação positiva entre atividade anti-radical livre e compostos fenólicos e flavonóides, além de indicar que os carotenóides e ácido ascórbico apresentam menor contribuição à atividade anti-radical livre medida pelo método ABTS<sup>\*+</sup>. As frutas piquia, tucumã e murici apresentaram os maiores teores de fenóis totais e flavonóides, assim como de atividade anti-radical livre. O buriti apresentou maior teor de carotenóides totais, porém menor atividade anti-radical livre que as frutas acima.

## 5- AGRADECIMENTOS

As autoras agradecem a FAPESP e CAPES pelo suporte financeiro.

## 6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BENASSI, M.T., ANTUNES, A.J. A comparison of methaphosphoric and oxalic acids as extracts solutions for the determination of vitamin C in vegetables. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, v. 31, p. 507-513, 1988.

BLOCK, G. Vitamin C, cancer and aging. **Age**, v. 16, p. 55–58, 1993.

CAI, Y.; LUO, Q.; SUN, M.; CORKE, H. Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. **Life Sciences**, v. 74, p. 2157-2184, 2004.

CHUN, O.K.; KIM, D.O.; MOON, H.Y.; KANG, H.G.; LEE, C.Y. Contribution of individual polyphenolics to total antioxidant capacity of plums. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 7240-7245, 2003.

DAVIS, B.H. Carotenoids. In: GOODWIN, T.W., (Ed.) **Chemistry and biochemistry of plant pigments**. London, 1976. v. 2, p. 38-165.

DE ROSSO, V.V.; MERCADANTE, A.Z. Identification and quantification of carotenoids, by HPLC-PDA-MS/MS, from Amazonian fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 5062-5072, 2007.

FARIA, A.F.; HASEGAWA, P.N.; CHAGAS, E.A.; PIO, R.; PURGATTO, E.; MERCADANTE, A.Z. Carotenoid composition in Brazilian loquat cultivars determined by HPLC-PDA-MS/MS. Submetido à revista **Food Chemistry**, 2008.

FESKANICH, D.; ZIEGLER, R.G.; MICHAUD, D.S.; GIOVANNUCCI, E.L.; SPEIZER, F.E.; WILLETT, W.C.; COLDITZ, G.A. Prospective study of fruit and vegetable consumption and risk of lung cancer among men and women. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 92, p. 1812–1823, 2000.

GIL, M.I.; TOMÁS-BARBERÁN, F.A.; HESS-PIERCE, B.; KADER, A.A. Antioxidant capacities, phenolic compounds, carotenoids, and vitamin C contents of nectarine, peach, and plum cultivars from California. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 4976-4982, 2002.

GODOY, H.T.; RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Occurrence of cis-isomers of provitamin A in Brazilian Fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 42, p. 1306-1313, 1994.

IGLESIAS, M.C.R.; FERNÁNDEZ, M.H.; LOZANO, M.A.H.; BERNAL, A.I.G. Alimentación de la mujer embarazada en los hogares maternos. **Revista Cubana de Alimentación y Nutrición**, v. 13, p. 55-62, 1999.

JAGADEESH, S.L.; REDDY, B.S.; SWAMY, G.S.K.; GORBAL, K.; HEGDE, L.; RAGHAVAN, G.S.V. Chemical composition of jackfruit (*Artocarpus heterophyllus* Lam.) selections of western ghats of India. **Food Chemistry**, v. 102, p. 361-365, 2007.

KIM, D.O.; CHUN, O.K.; KIM, Y.J.; MOON, H.Y.; LEE, C.Y. Quantification of polyphenolics and their antioxidant capacity in fresh plums. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 6509-6515, 2003b.

KIM, D.O.; JEONG, S.W.; LEE, C.Y. Antioxidant capacity of phenolic phytochemicals from various cultivars of plums. **Food Chemistry**, v. 81, p. 321-326, 2003a.

LACERDA, M.A.D.; LACERDA, R.D.; ASSIS, P.C.O. A participação da fruticultura no agronegócio brasileiro. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v. 4, p. 1-9, 2004.

LUXIMON-RAMMA, A.; BAHORUN, T.; CROZIER, A. Antioxidant actions and phenolic and vitamin C contents of common Mauritian exotic fruits. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 83, p. 496-502, 2003.

MICHELS, K.B.; GIOVANNUCCI, E.; JOSHIPURA, K.J.; ROSNER, B.A.; STAMPFER, M.J.; FUCHS, C.S.; COLDITZ, G.A.; SPEIZER, F.E.; WILLETT, W.C. Prospective study of fruit and vegetable consumption and incidence of colon and rectal cancers. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 92, p. 1740-1752, 2000.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 26, p. 1231-1237, 1999.

RICE-EVANS, C.A.; MILLER, N.J.; PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 20, p. 933-956, 1996.

ROGINSKY, V.; LISSI, E.A. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant in food. **Food Chemistry**, v. 92, p. 235-254, 2005.



SILVA, E.M.; SOUZA, J.N.S.; ROGEZ, H.; REES, J.F.; LARONDELLE, Y. Antioxidant activities and polyphenol contents of fifteen selected plant species from the Amazonian region. **Food Chemistry**, v. 101, p. 1012-1018, 2007.

ZHISHEN, J.; MENGCHENG, T.; JIANMING, W. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. **Food Chemistry**, v. 64, p. 555-559, 1999.

[www. agricultura.gov.br/](http://www.agricultura.gov.br/). Acesso em 25 de abril de 2008.



# **CAPÍTULO 4**

## **COMPOSTOS BIOATIVOS EM SUB-PRODUTOS DA CASTANHA DE CAJU**

**Manuscrito submetido à revista : Alimentos e Nutrição**



## RESUMO

O processamento de suco a partir do pseudofruto (pedúnculo) de caju gera como subproduto um bagaço, que constitui uma rica fonte de fenóis, ácido ascórbico (AA) e carotenóides, os quais se constituem em compostos de alto valor agregado em razão de suas funções benéficas à saúde humana. Considerando que este bagaço pode ser transformado para produzir ingredientes funcionais, este trabalho teve como objetivo determinar a composição de carotenóides, teores de compostos fenólicos totais e de AA, além da determinação da atividade anti-radical livre de derivados do bagaço do pedúnculo do caju. O bagaço de caju foi submetido a cinco ciclos de diluição/prensagem, gerando um bagaço final (retentado) e um extrato, o qual foi filtrado (extrato bruto) e concentrado (extrato concentrado). O retentado apresentou um nível significativamente superior de fenóis totais, de carotenóides totais e da atividade anti-radical livre; além de apresentar cor amarela mais intensa, indicada pelos maiores valores de  $b^*$  e de croma ( $C^*$ ). Por outro lado, o extrato concentrado apresentou o maior teor de AA. Os principais carotenóides encontrados, tanto no retentado como nos extratos, foram all-trans- $\beta$ -criptoxantina e all-trans- $\beta$ -caroteno. Estes resultados indicam que o retentado possui compostos bioativos que podem ser utilizados como ingrediente funcional.

**PALAVRAS-CHAVE:** bagaço de caju, carotenóides, fenóis totais, ácido ascórbico, atividade anti-radical livre.

## ABSTRACT

The processing of juice from the cashew pseudofruit (cashew-apple) generates a pomace that constitutes a rich source of phenols, ascorbic acid (AA) and carotenoids, high valued compounds due to their benefits to human health. Considering that this pomace can be processed into functional ingredients, this work had the objective of determining the composition of pomace derivatives in terms of carotenoids, total phenolic compounds and AA, as well as evaluating their antioxidant properties. The cashew apple pomace was submitted to five dilution/pressing cycles, generating a final pomace (retentado) and an extract, which was filtered (raw extract) and concentrated (concentrated extract). The retentado presented significantly higher total phenol and total carotenoid contents, higher free radical scavenger activity, as well as higher yellow color intensity, indicated by higher  $b^*$  and chroma ( $C^*$ ) values. On the other hand, the concentrated extract showed the highest AA content. The major carotenoids identified in both retentado and extracts were all-trans- $\beta$ -cryptoxanthin and all-trans- $\beta$ -carotene. These results showed that the retentado has bioactive compounds to be applied as a functional ingredient.

**KEYWORDS:** pomace, carotenoids, total phenolics, ascorbic acid, free radical scavenger activity

## INTRODUÇÃO

A agroindústria do caju (*Anacardium occidentale* L.) representa um papel econômico e social de destaque na região Nordeste do Brasil, sendo responsável por cerca de 94% da produção brasileira de caju, principalmente nos estados do Ceará, Piauí e Rio Grande do Norte <sup>24</sup>. A Embrapa Agroindústria Tropical tem lançado no mercado, nas últimas décadas, vários clones de cajueiro, entre os quais destaca-se o CCP 76, atualmente utilizado em quase todos os plantios comerciais de cajueiro-anão precoce nas regiões do semi-árido brasileiro. Lançado para plantio comercial em 1983, esse clone apresenta um pedúnculo de coloração laranja<sup>4</sup>.

A industrialização do caju pode ser dividida nos setores de beneficiamento da castanha e do processamento do pedúnculo. O beneficiamento da castanha visa principalmente a produção da amêndoa da castanha de caju; enquanto que o processamento do pedúnculo tem como principal produto industrial o suco de caju.

Como o aproveitamento do pedúnculo do caju é estimado em apenas 12% de sua produção, e o bagaço, sub-produto do processo de extração do suco de caju, é geralmente descartado <sup>22</sup>, o aproveitamento tanto do pedúnculo como do bagaço é extremamente interessante, pois estes constituem uma fonte de compostos de alto valor agregado em razão de suas propriedades funcionais em alimentos. <sup>1</sup>

Na composição química do pedúnculo do caju, podem ser destacados carotenóides, ácido ascórbico e compostos fenólicos <sup>2,18</sup>, os quais permanecem no bagaço <sup>1</sup>. A presença destes compostos em alimentos, como frutas e vegetais, tem sido associada à baixa incidência de doenças degenerativas, como câncer e

doenças do coração, e aumento da resistência imunológica <sup>12,16</sup>. Estes compostos possuem ação antioxidante, auxiliando na proteção do organismo humano contra o estresse oxidativo <sup>22</sup>. Além disso, retardam o processo oxidativo, aumentando a vida de prateleira dos alimentos. <sup>11</sup>

Nos últimos anos, várias pesquisas relacionadas ao desenvolvimento de novos produtos ou ingredientes com propriedades funcionais têm sido realizadas, como por exemplo, licopeno microencapsulado com goma arábica, que reduziu em cerca de 45% a foto-degradação das vitaminas A e K quando adicionado ao leite <sup>21</sup>.

Considerando que o aproveitamento do descarte das indústrias de processamento de caju pode tornar este segmento mais competitivo, os objetivos desse estudo foram acompanhar o grau de retenção de alguns compostos bioativos durante as etapas de obtenção de ingredientes funcionais a partir de bagaço de caju. Especificamente, foram determinados os teores de compostos fenólicos totais, ácido ascórbico, carotenóides totais e a composição relativa de carotenóides do retentado e derivados (extrato bruto e concentrado). Determinou-se ainda a atividade anti-radical livre e a cor nestes ingredientes.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Material**

Os frutos de caju (clone CCP-076) das safras de 2005 e de 2007, coletados no estágio 7 de maturação (pedúnculos com coloração externa laranja escuro,



segundo a classificação proposta por Figueiredo et al.<sup>13</sup>, foram provenientes da Estação Experimental de Paraipaba da Embrapa Agroindústria Tropical (Ceará, Brasil). Os frutos foram acondicionados em embalagens rígidas perfuradas de polietileno tereftalato (PET) e estocados a 5 °C durante 2 dias antes do processamento.

O extrato concentrado de caju foi obtido segundo Abreu<sup>1</sup>. Após a retirada da castanha os pseudofrutos foram prensados em prensa contínua tipo expeller Incomap 300, resultando em suco e bagaço. O bagaço foi acondicionado em sacos de polietileno (PE) e congelado por 4 dias a -18 °C, e, após descongelamento à temperatura ambiente, (25 ± 1 °C), foi deixado em descanso à temperatura ambiente por 1 hora em embalagens rígidas com água potável (proporção bagaço: água, 1:1), prensado novamente em prensa expeller e filtrado em peneira com abertura de 0,3 mm. O filtrado foi descartado e o bagaço foi novamente macerado com água (1:1), prensado e filtrado. Estas operações (maceramento, prensagem e filtração) foram repetidas cinco vezes, gerando um bagaço final denominado de retentado. Todos os filtrados obtidos a partir do bagaço foram misturados (extrato bruto). Parte deste filtrado foi concentrada em evaporador rotatório a vácuo, a 60 °C, até atingir 20% do volume inicial do extrato, obtendo-se o extrato concentrado. As amostras provenientes da safra de 2005 (retentado, extrato bruto e extrato concentrado) e de 2007 (retentado e extrato bruto) foram congeladas a -4 °C e enviadas ao laboratório após uma semana.

## **Equipamentos**

As medidas de absorvância foram realizadas em espectrofotômetro da marca Beckman (modelo DU-70) ou da marca Agilent (modelo 8453). Para a

medida de cor instrumental foi utilizado um colorímetro HunterLab (modelo Color Quest XE).

Os carotenóides foram separados em um cromatógrafo líquido de alta eficiência (HPLC) com sistema quaternário de bombeamento de solventes (Waters, modelo 600), injetor "Rheodyne" com alça de amostra de 20  $\mu$ L, forno externo com controle de temperatura, desgaseificador "on line", detector de arranjo de diodos (PDA) (Waters, modelo 996), os carotenóides foram separados em coluna C<sub>30</sub>, marca YMC, tamanho de partícula 3  $\mu$ m, 25 cm de comprimento e 4,6 cm de diâmetro interno, utilizando como fase móvel um gradiente linear de metanol (0,1 % trietilamina):éter metil terc-butílico, de 95:5 a 50:50 em 60 minutos, com fluxo de 1 mL/min, temperatura da coluna de 25°C e sistema de aquisição e processamento de dados Millenium (Waters). Os cromatogramas foram processados a 450 nm e os espectros foram obtidos entre 250 e 600 nm.

## **Métodos**

As análises de ácido ascórbico, fenóis totais e atividade anti-radical livre foram realizadas com o extrato (A), preparado segundo Kim et al. <sup>19</sup>. Para isso, foram adicionados 100 mL de solução metanol:água (8:2) a 10 g de cada amostra (retentado, extrato concentrado e bruto), seguido de agitação no ultra-som por 20 minutos. Em seguida, esta mistura foi filtrada em funil de Buchner e lavada com 50 mL de metanol. A extração foi realizada mais duas vezes com adição de 50 mL de solução metanol:água (8:2). Os três filtrados foram misturados e o volume reduzido em evaporador rotatório a 37°C. O extrato foi transferido para um balão volumétrico de 100 mL e o volume foi completado com metanol. Após 1 hora no freezer, a solução foi centrifugada a 2.000 rpm por 20 minutos, sendo o sobrenadante retirado e mantido em freezer (extrato A).

O ácido ascórbico foi determinado nas amostras (retentado, extrato bruto e extrato concentrado) e no extrato (A) obtido de cada amostra, segundo Benassi & Antunes <sup>5</sup>, em duplicata.

Os fenóis totais foram analisados com reagente de Folin-Ciocalteu, com 1 mL do extrato (A), em triplicata, utilizando ácido gálico como padrão (50 – 200 mg/L) <sup>19</sup>.

Diferentes alíquotas (20 a 100 µL) do extrato (A) foram adicionadas a 3,9 mL de uma solução de DPPH<sup>•</sup> (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) a  $6 \times 10^{-5}$  M, e a mistura foi mantida por 1 minuto no ultra-som. A leitura da absorbância por espectrofotometria foi realizada a 515 nm no tempo zero e a cada 6 minutos até estabilização da absorbância <sup>6</sup>. A atividade anti-radical livre foi calculada através do valor EC<sub>50</sub>, definido como a quantidade de extrato necessária para decrescer a concentração inicial de DPPH<sup>•</sup> em 50%, e os resultados foram expressos em termos do poder anti-radical livre (ARP), segundo a equação 1 <sup>6</sup>.

$$\text{ARP} = 1/\text{EC}_{50} \times 100 \quad (\text{eq. 1})$$

A extração dos carotenóides foi realizada com acetona, seguida de transferência para éter de petróleo/éter etílico, saponificação com 10% KOH em metanol por 16 horas, à temperatura ambiente no escuro. O álcali foi retirado com auxílio de água e o extrato foi concentrado até secura em evaporador rotatório a 35 °C <sup>9,10</sup>. O extrato foi solubilizado em volume conhecido de éter de petróleo e os carotenóides totais foram quantificados através da leitura no comprimento de onda máximo de absorção ( $\lambda_{\text{max}}$ ), utilizando a absortividade do  $\beta$ -caroteno em éter de petróleo (2592) para cálculo de concentração <sup>8</sup>. A análise foi realizada em duplicata.

A composição de carotenóides foi determinada por HPLC-PDA. Após evaporação do éter de petróleo, o extrato foi re-dissolvido em acetato de etila/metanol (1:1), e filtrado em membrana Millipore de 0,22  $\mu\text{m}$ . A identificação foi baseada na comparação da ordem de eluição dos carotenóides na coluna  $\text{C}_{30}$  com trabalhos que utilizaram a mesma coluna e espectrometria de massas <sup>9</sup>, nas características dos espectros UV-visível e comparação com padrões. A estrutura fina do espectro (% III/ II) dos carotenóides foi calculada traçando como linha base o valor mínimo entre os picos III e II e medindo a altura do pico de maior comprimento de onda (III) e a altura do pico de absorção do meio (II). A intensidade do pico cis (%  $A_{\text{B}}/ A_{\text{II}}$ ) foi calculada traçando como linha base o valor mínimo da absorbância e medindo a altura do pico cis ( $A_{\text{B}}$ , localizado a  $\pm 142$  nm do pico de maior comprimento de onda (III)) e a altura do pico de absorção do meio (II).

A análise associada à cor foi realizada através de medidas instrumentais obtidas em colorímetro, utilizando a escala CIELAB (refletância,  $d/8$ ,  $D_{65}$  e ângulo do observador  $10^\circ$ ). A partir dos valores de  $L^*$  (luminosidade),  $a^*$  e  $b^*$  (coordenadas de cor) foram calculados os parâmetros  $C^*$  (croma, saturação de cor) e  $h$  (hue, ângulo de tonalidade cromática) segundo as equações 2 e 3. A leitura foi realizada em quintuplicata.

$$C^* = [(a^*)^2 + (b^*)^2]^{1/2} \quad (\text{eq. 2})$$

$$h = \arctan(b^*/a^*) \quad (\text{eq. 3})$$

## **Análise estatística**

Os dados referentes às análises de ácido ascórbico, fenóis totais, carotenóides totais e poder anti-radical (ARP) foram submetidos à análise de variância e para verificar a diferença significativa entre as diferentes amostras (retentado, extrato bruto e concentrado) foi utilizado o teste de Tukey, através do software ASSISTAT.

Os valores de média e desvio-padrão dos parâmetros de cor ( $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ,  $C^*$  e  $h$ ) foram calculados através do programa Microsoft Excel.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### Compostos bioativos

Apesar do caráter hidrofílico do AA, entre 20 e 30% do total de AA do pedúnculo de caju permaneceu no retentado, enquanto que o restante deste composto foi extraído (extrato bruto) durante a prensagem do caju (Tabela 1).

Tabela 1. Teores de ácido ascórbico (AA), fenóis totais, carotenóides totais e poder anti-radical DPPH\* dos ingredientes obtidos de bagaço de caju.

Amostra - safra	AA* (mg/100g)	Fenóis totais** (mgAG /100g)	Carotenóides totais* (µg/g)	ARP*
Retentado - 2005	26,9 ± 7,4 <sup>d</sup>	97,7 ± 1,3 <sup>b</sup>	43,3 ± 4,3 <sup>b</sup>	11 ± 2 <sup>a</sup>
Ext. bruto- 2005	63,2 ± 8,2 <sup>b</sup>	22,8 ± 0,4 <sup>e</sup>	0,02 ± 0,00 <sup>c</sup>	4 ± 1 <sup>d</sup>
Ext. conc. - 2005	216,3 ± 12,3 <sup>a</sup>	47,5 ± 2,8 <sup>d</sup>	3,1 ± 0,3 <sup>c</sup>	7 ± 2 <sup>bc</sup>
Retentado - 2007	8,7 ± 0,4 <sup>e</sup>	118,8 ± 7,7 <sup>a</sup>	54,9 ± 6,4 <sup>a</sup>	9 ± 1 <sup>ab</sup>
Ext. bruto- 2007	38,2 ± 1,8 <sup>c</sup>	57,1 ± 1,1 <sup>c</sup>	0,9 ± 0,0 <sup>c</sup>	6 ± 0 <sup>cd</sup>

\*: análise em duplicata; \*\*: análise em triplicata; AG: ácido gálico; ARP: poder antioxidante; diferentes letras na mesma coluna indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

Como esperado, devido à etapa de concentração, o conteúdo de AA no extrato concentrado foi 3,4 vezes maior do que no extrato bruto (Tabela 1), portanto, não ocorreu perda significativa de AA durante esta etapa<sup>7</sup>. O teor de AA do extrato concentrado foi maior que o encontrado no caju in natura (121 e 102 mg/100g)<sup>3</sup> e no suco de caju concentrado (37 mg/100g)<sup>2</sup>.

Na análise de fenóis totais foi verificado que a quantidade de ácido ascórbico presente nos extratos não influenciou no resultado da reação de Folin-Ciocalteu. Um teor significativamente maior de compostos fenólicos permaneceu no retentado, com extração pela prensagem de somente 19-32% destes compostos (Tabela 1). A etapa de concentração possibilitou dobrar os teores de fenóis totais no extrato concentrado em comparação com o extrato bruto; entretanto, o conteúdo de fenóis totais que permaneceu no retentado foi ainda cerca de 2 vezes maior do que o obtido no extrato concentrado (Tabela 1). O retentado apresentou teor de compostos fenólicos inferior ao encontrado na polpa de caju (234 mg/100g)<sup>18</sup>.

Como esperado, um teor significativamente maior de carotenóides foi encontrado no retentado, pois, devido ao caráter lipofílico desses pigmentos os mesmos praticamente não foram extraídos durante a prensagem, permanecendo preferencialmente no retentado. O mesmo comportamento foi observado para os compostos fenólicos, já o ácido ascórbico foi encontrado em menor concentração no retentado. Foram detectados apenas traços de carotenóides no extrato bruto da safra de 2005, e apenas um baixo teor foi detectado no extrato concentrado.

Embora o teor de carotenóides totais tenha sido mais de dez vezes superior no retentado do que extrato concentrado (Tabela 1), o perfil de carotenóides foi semelhante nos dois derivados de caju (Figura 1, Tabela 2). All-trans- $\beta$ -criptoxantina (37-40%) foi o carotenóide principal nos dois derivados, seguido do all-trans- $\beta$ -caroteno (24-34%).

Tabela 2. Características obtidas por HPLC-PDA e composição relativa dos carotenóides presentes nos ingredientes obtidos de bagaço de caju da safra de 2005.

n° pico <sup>a</sup>	carotenóide	faixa t <sub>R</sub> <sup>b</sup>	características do espectro UV-visível <sup>c</sup>			Composição (% área) <sup>d</sup>	
			λ <sub>max</sub>	% III/II	% A <sub>B</sub> /A <sub>II</sub>	Retentado	Concentrado
1	all-trans-luteína	12,4 – 12,5	423, 444, 472	65	0	0,6 ± 0,1	2,1 ± 0,1
2	13-cis+13'-cis-β-criptoxantina	17,8 – 17,9	338, 423, 443, 469	7	42	1,8 ± 0,0	4,1 ± 0,3
3	all-trans-β-criptoxantina	23,4 – 23,6	427, 451, 477	27	0	37,4 ± 0,1	40,2 ± 2,8
4	13-cis-β-caroteno	26,4 – 26,7	338, 423, 444, 468	4	44	5,4 ± 0,0	7,7 ± 0,4
5	all-trans-α-caroteno	28,2 – 28,8	422, 446, 473	59	0	8,4 ± 0,1	4,9 ± 0,5
6	neurosporeno	30,0 – 30,2	333, 417, 441, 469	72	6	0,2 ± 0,0	0,1 ± 0,0
7	all-trans-β-caroteno	33,7 – 34,0	430, 452, 478	27	0	33,7 ± 0,0	23,6 ± 2,9
8	9-cis-β-caroteno	36,2 – 36,4	341, 425, 447, 472	16	7	2,8 ± 0,1	2,3 ± 0,2

a- numerado de acordo com os cromatogramas da Figura 1.

b- faixa de 4 corridas.

c- solvente: gradiente de metanol (0,1%TEA)/éter metil terc-butílico

d- média e desvio-padrão de análises em duplicata



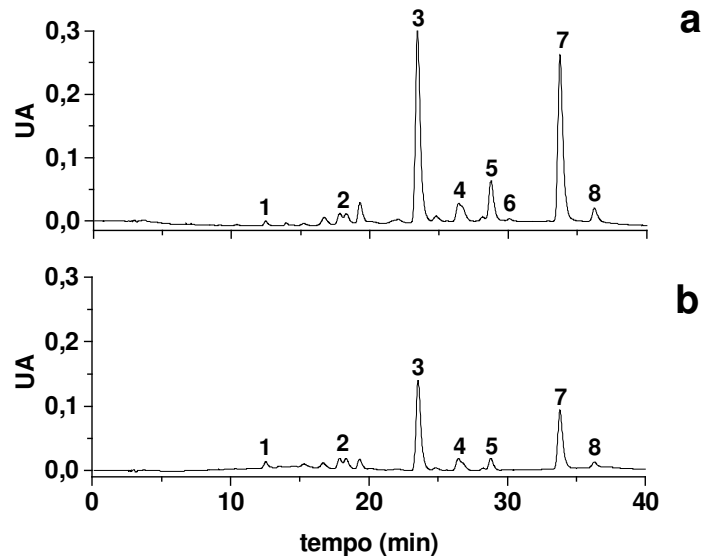


Figura 1. Cromatogramas, obtidos por HPLC-PDA, dos carotenóides presentes no retentado (a) e no extrato concentrado (b) de caju. Condições cromatográficas: ver texto. A identificação dos picos encontra-se na Tabela 2.

Este perfil de carotenóides foi semelhante ao encontrado no caju in natura coletado no estado do Piauí, enquanto que o caju proveniente do estado de São Paulo apresentou all-trans- $\beta$ -caroteno como principal carotenóide, seguido do  $\alpha$ -caroteno<sup>3</sup>. Como os derivados de caju analisados no presente estudo são provenientes da região nordeste (Ceará), este resultado confirma a tendência do caju, desta região, ter como carotenóide majoritário a all-trans- $\beta$ -criptoxantina.

Quando comparado com o caju e seus produtos processados, o retentado apresentou teores de carotenóides totais (43,3 - 54,9  $\mu\text{g/g}$ ) muito maiores em relação ao caju in natura, 1,0 - 2,0  $\mu\text{g/g}$ , tanto nos caju provenientes da região sudeste (SP) como da nordeste (Piauí), e também maiores conteúdos que seus

produtos comerciais como polpa (1,6 a 2,2  $\mu\text{g/g}$ ) e suco concentrado de caju (0,9 a 1,1  $\mu\text{g/g}$ )<sup>2,3</sup>. Além disso, o teor de carotenóides do retentado foi maior que em suco de laranja (7,6 - 23,7  $\mu\text{g/mL}$ )<sup>14</sup>, acerola cultivares Waldy Cati 30 e Olivier (3,7 - 18,8  $\mu\text{g/g}$ )<sup>10</sup>, suco e polpa de cajá (16,7 - 22,9  $\mu\text{g/g}$ )<sup>17</sup> e comparável aos teores de manga (51,2 - 55,0  $\mu\text{g/g}$ )<sup>20</sup>. Entretanto, algumas frutas nativas da região amazônica como tucumã (62,7  $\mu\text{g/g}$ ), physalis (80,9  $\mu\text{g/g}$ ) e buriti (513,9  $\mu\text{g/g}$ ) possuem teores de carotenóides significativamente maiores que os verificados no retentado de caju<sup>9</sup>.

#### Atividade anti-radical livre

O retentado apresentou atividade anti-radical livre significativamente superior aos extratos (Tabela 1), provavelmente devido aos maiores níveis de fenóis e carotenóides que permaneceram neste ingrediente. Na Tabela 1, o valor de ARP encontrado no extrato concentrado safra 2005 ( $7 \pm 2$ ) não apresentou diferença significativa em relação aos valores de ARP do retentado safra 2007 ( $9 \pm 1$ ) e extrato bruto safra 2007 ( $6 \pm 0$ ). Portanto, o alto teor de AA encontrado no extrato concentrado safra 2005 ( $216 \pm 12$ ) não contribuiu significativamente para um maior aumento da atividade anti-radical livre. Enquanto que, com o aumento do teor de fenóis totais e carotenóides totais, como ocorreu no retentado safra 2005 em relação ao extrato concentrado safra 2005, foi possível observar maior atividade anti-radical livre.

A correlação linear entre os teores de compostos fenólicos e atividade anti-radical livre já foi observada em frutas<sup>15, 25</sup>, indicando que os fenóis são os principais responsáveis pela atividade anti-radical livre dos extratos das frutas. Além disso, a contribuição do AA já foi reportada como sendo de 0,35 a 8,5% da atividade antioxidante total em frutas<sup>25</sup> e menor que 15% em frutas frescas e

sucos de frutas <sup>26</sup>. Estas porcentagens foram calculadas com base no valor encontrado da atividade antioxidante, determinada pelo método ORAC, considerando que 1,0  $\mu\text{mol}$  de vitamina C foi equivalente a 0,52  $\mu\text{mol}$  de Trolox <sup>26</sup>.

Não é possível comparar os valores de atividade anti-radical livre dos ingredientes de caju com outros produtos devido às diferentes concentrações de extrato e unidades utilizadas em outros estudos.

A Tabela 3 apresenta os parâmetros de cor em escala CIELAB, referente à análise de cor instrumental.

Tabela 3. Coordenadas de cor das amostras de derivados de caju.

Amostra - safra	L*	a*	b*	C*	h
Retentado - 2007	60,6 $\pm$ 0,1	6,1 $\pm$ 0,0	38,9 $\pm$ 0,2	39,4 $\pm$ 0,2	81,1 $\pm$ 0,0
Extrato bruto - 2007	32,5 $\pm$ 0,5	-2,9 $\pm$ 0,1	23,1 $\pm$ 0,5	23,3 $\pm$ 0,5	97,1 $\pm$ 0,3

Média e desvio-padrão de leitura em quintuplicata.

O extrato bruto apresentou menor luminosidade (L\*) que o retentado, indicando que o extrato bruto foi mais escuro. Isto pode ter ocorrido devido a etapa de concentração em evaporador rotatório, pois, certos compostos, como os açúcares, podem sofrer alteração durante este processamento formando compostos escuros que podem ter influenciado na cor final do extrato.

O retentado apresentou-se com maior intensidade da cor amarela e vermelha indicada, respectivamente, pelos maiores valores positivos de b\* e a\*, devido à maior concentração de carotenóides do retentado (Tabela 1). O principal

carotenóide encontrado foi o all-trans- $\beta$ -criptoxantina, seguido pelo all-trans- $\beta$ -caroteno (Tabela 2) que possuem coloração entre o amarelo e o laranja, dependendo de concentração. Portanto, a presença destes carotenóides contribuiu para um maior valor de  $b^*$  e menor valor de  $a^*$ .

O valor negativo de  $a^*$  do extrato bruto indicou que a amostra possui maior intensidade da cor verde, porém o valor é baixo e como o valor de  $b^*$  é positivo, a cor amarela prevaleceu neste extrato. Considerando o maior valor de croma ( $C^*$ ) e o menor valor de hue ( $h$ ), o retentado apresentou cor mais intensa.

## **Conclusão**

O conteúdo de ácido ascórbico no retentado variou de 20 a 30% do total de ácido ascórbico presente no pedúnculo do caju, sendo que, o restante foi encontrado no extrato bruto.

O teor de compostos fenólicos totais, carotenóides totais e a atividade anti-radical livre encontrada no retentado foi significativamente maior que nos extratos (bruto e concentrado).

O retentado também apresentou maior saturação da cor amarela e menor valor de hue. Nas amostras, o carotenóide principal encontrado foi o all-trans- $\beta$ -criptoxantina, seguido pelo all-trans- $\beta$ -caroteno.

Desta forma, o retentado mostrou ser um ingrediente de cor amarela intensa, rico em compostos fenólicos e carotenóides, além de apresentar atividade anti-radical livre. Por outro lado, o extrato, por apresentar cerca de 75% do total de

ácido ascórbico presente no pedúnculo do caju, pode ser considerado fonte de ácido ascórbico.

## **Agradecimentos**

Os autores agradecem ao Banco Mundial/Prodetab pelo suporte financeiro, à Embrapa pela parceria no trabalho e a CAPES pela bolsa para o primeiro autor.

## **Referências Bibliográficas**

1. ABREU, F.A.P. **Extrato de bagaço de caju rico em pigmento**. Patente: Privilégio de Inovação. PI 0103885-0. Inst. promotora/financiadora: Embrapa. Fortaleza, 2001.
2. ASSUNÇÃO, R.B.; MERCADANTE, A.Z. Carotenoids and ascorbic acid composition from commercial products of cashew apple (*Anacardium occidentale* L.). **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 16, p. 647-657, 2003a.
3. ASSUNÇÃO, R.B.; MERCADANTE, A.Z. Carotenoids and ascorbic acid from cashew apple (*Anacardium occidentale* L.): variety and geographic effects. **Food Chemistry**, v. 81, p. 495-502, 2003b.

4. BARROS, L.M.; PAIVA, J.R.; CAVALCANTI, J.J.V.; CRISÓSTOMO, J.R. Cajueiro anão precoce – Clone CCP 76. Disponível em: <[www.cnpat.embrapa.br/](http://www.cnpat.embrapa.br/)>. Acesso em: 14 jun. 2007.
5. BENASSI, M.T., ANTUNES, A.J. A comparison of methaphosphoric and oxalic acids as extracts solutions for the determination of vitamin C in vegetables. **Arquivos de Biologia e Tenologia**, v.31, p.507-513, 1988.
6. BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie**, v. 28, p. 25-30, 1995.
7. BURDURLU, H.S.; KOCA, N.; KARADENIZ, F. Degradation of vitamin C in citrus juice concentrates during storage. **Journal of Food Engineering**, v. 74, p. 211-216, 2006.
8. DAVIES, B.H. Carotenoids. In: T.W. Goodwin, Editor, **Chemistry and biochemistry of plant pigments**, v. 2, p. 38–165, Academic Press, London, 1976.
9. DE ROSSO, V.V.; MERCADANTE, A.Z. Identification and quantification of carotenoids, by HPLC-PDA-MS/MS, from Amazonian fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 5062-5072, 2007.
10. DE ROSSO, V.V.; MERCADANTE, A.Z. Carotenoid composition of two Brazilian genotypes of acerola (*Malpighia puniceifolia* L.) from two harvests. **Food research International**, v. 38, p. 1073-1077, 2005.

11. DECKER, E.A.; WARNER, K.; RICHARDS, M.P.; SHAHIDI, F. Measuring antioxidant effectiveness in food. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 4303-4310, 2005.
12. FESKANICH, D.; ZIEGLER, R.G.; MICHAUD, D.S.; GIOVANNUCCI, E.L.; SPEIZER, F.E.; WILLETT, W.C.; COLDITZ, G.A. Prospective study of fruit and vegetable consumption and risk of lung cancer among men and women. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 92, p. 1812–1823, 2000.
13. FIGUEIREDO, R.W.; LAJOLO, F.M.; ALVES, R.E.; FILGUEIRAS, H.A.C.; ARAÚJO, N.C.C. Alterações de firmeza, pectinas e enzimas pectinolíticas durante o desenvolvimento e maturação de pedúnculos de cajueiro anão precoce (*Anacardium occidentale* L. Var. *nanum*) CCP-76. **Proceedings of the Interamerican Society for Tropical Horticulture**, v. 43, p. 82-86, 2001.
14. GAMA, J.J.T., SYLOS, C.M. Major carotenoid composition of Brazilian Valencia orange juice: identification and quantification by HPLC. **Food Research International**, v. 38, p. 899–903, 2005.
15. GIL, M. I.; TOMAS-BARBERAN, F. A.; HESS-PIERCE, B.; KADER, A. A. Antioxidant capacities, phenolic compounds, carotenoids, and vitamin C contents of nectarine, peach, and plum cultivars from California. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 4976-4982, 2002.
16. GORDON, M.H.. Dietary antioxidants in disease prevention. **Natural Product Reports**, v. 13, p. 265–273, 1996.
17. HAMANO, P. S.; MERCADANTE, A. Z. Composition of carotenoids from commercial products of caja (*Spondias lutea*). **Journal of Food and Composition Analysis**, v. 14, p. 335-343, 2001.

18. HASSIMOTTO, N.M.A.; GENOVESE, M.I.; LAJOLO, F.M. Antioxidant activity of dietary fruits, vegetables, and commercial frozen fruit pulps. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 2928-2935, 2005.
19. KIM, D.O.; JEONG, S.W.; LEE, C.Y. Antioxidant capacity of phenolic phytochemicals from various cultivars of plums. **Food Chemistry**, v. 81, p. 321-326, 2003.
20. MERCADANTE, A.Z.; RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Effects of Ripening, Cultivar Differences, and Processing on the Carotenoid Composition of Mango. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, p. 128-130, 1998.
21. MONTENEGRO, M. A.; NUNES, I. L.; MERCADANTE, A. Z.; BORSARELLI, C. D. Photoprotection of vitamins in skimmed milk by an aqueous soluble lycopene-gum arabic microcapsule. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 323-329, 2007.
22. PAIVA, F.F.A.; GARRUTI, D.S.; SILVA NETO, R.M. **Aproveitamento industrial do caju**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical/ SEBRAE, p. 88, 2000.
23. SCALBERT, A.; WILLIAMSON, G. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. **Journal of Nutrition**, v.130, p. 2073S-2086S, 2000.
24. SOUSA, L.B.; FEITOZA, L.L.; GOMES, R.L.F.; LOPES, A.C.A.; SOARES, E.B.; SILVA, E.M.P. Aspectos de biologia floral de cajueiros anão precoce e comum. **Ciência Rural**, v. 37, p. 882-885, 2007.



25. SUN, J.; CHU, Y. F.; WU, X.; LIU, R. H. Antioxidant and antiproliferative activities of common fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 7449-7454, 2002.
  
26. WANG, H.; CAO, G.; PRIOR, R. L. Total antioxidant capacity of fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, p. 701-705, 1996.



# **CAPÍTULO 5**

## **ETHYLENE REGULATION OF CAROTENOID ACCUMULATION DURING PAPAYA FRUIT RIPENING**

**Manuscrito em preparação para ser submetido à Phytochemistry**



## Abstract

Papaya fruit (*Carica papaya* cv. "Golden") is a climacteric red-fleshed fruit that exhibits a characteristic rise in ethylene production that at the same time stimulates desirable attributes and decreases the shelf-life of the fruit. In order to delay ripening the objective of the present study was to investigate the effects of treatments with ethylene and 1-methylcyclopropene (1-MCP), which blocks ethylene action, on the carotenoid composition and colour changes during papaya ripening. Both treated papaya fruits (ethylene and 1-MCP) showed lower total carotenoid contents as compared to those found in control fruits, as well as delayed or inhibited some biosynthetic pathways. For example, accumulation of lycopene was stimulated in the presence of ethylene whereas it was delayed under 1-MCP treatment, and in both gas treated groups the pathway to  $\gamma$ -carotene was favoured. The colour parameters values were all in the same range for the control and gas treated fruits. In fact, during ripening the fruit colour increased with corresponding increases in lycopene and  $\beta$ -cryptoxanthin accumulation, but only up to a certain point, from where no further increase in the colour values was observed.

Keywords: *Carica papaya*, carotenoids, colour, biosynthesis, ethylene, 1-MCP

## 1. Introduction

Carotenoid pigments are synthesized by all higher plants, and they are involved in multiple functions related to photo-protection in photosynthetic tissues, to attraction of pollinating insects and animals that contribute to seed dispersal in fruits and flowers and even as a precursor of the abscisic acid hormone (Goodwin, 1980). The main function of some carotenoids in the human diet is to provide precursors of vitamin A, contribute to aged-related macula degeneration prevention and antioxidants that may prevent degenerative diseases and reduce the risk of certain forms of cancer (Krinsky, 1994; Giovannucci, 1999; Stahl & Sies, 2005.). The composition of carotenoids in fruits is usually complex, with up to 15 or more different structures (Mercadante, 2007). Lycopene is the main carotenoid in papaya, located in the chromoplasts of fruit cells and responsible for the red colour in papaya.

More than 600 naturally occurring carotenoids are biosynthesized by the same basic pathway, with later modifications to give a variety of structures. The early biosynthesis stages, common to other isoprenoid and terpenoid compounds, are well established in higher plants. The biosynthesis pathway initiates with isopentenyl diphosphate (IDP) ( $C_5$ ) and its isomer dimethylallyl diphosphate (DMADP), followed by condensation of IDP and DMADP to generate the  $C_{10}$  geranyldiphosphate (GDP) molecule, and further addition of IDP to GDP results in farnesyl diphosphate (FDP,  $C_{15}$ ) formation. Reaction of FDP with a further IDP molecule gives the geranylgeranyl diphosphate (GGDP), and two molecules of GGDP are condensed to form the intermediate pre-phytoene diphosphate. Subsequent elimination of the diphosphate group results in phytoene ( $C_{40}$ ) formation. These steps are regulated by a phytoene synthase complex, encoding the genes *Psy*. Phytoene, a colourless carotene containing three conjugated

double bonds, undergoes a series of desaturation reactions giving coloured carotenoids, as the red-coloured lycopene. Typically, lycopene is the precursor for cyclisation reactions, resulting in  $\alpha$ -carotene and  $\beta$ -carotene which are further modified to produce xanthophylls (Burns et al., 2003; Fraser and Bramley, 2004; Devit et al., 2006; Howitt and Pogson, 2006).

Papaya fruit (*Carica papaya* cv. "Golden") is a climacteric red-fleshed fruit with carotenoids accumulation during ripening. The fruit, as most of climacteric ones, exhibits a characteristic rise in ethylene production and respiration during ripening, which occur concomitantly with pulp firmness decrease and carotenoid accumulation (Fabi et al., 2007). Ethylene, a phytohormone that triggers most part of climacteric fruit changes during ripening, can stimulate desirable attributes such as colour, softening and aroma (Moya-León and Herrera, 2004; Opiyo and Ying, 2005, Balbontín et al., 2007). Although ethylene treatment anticipated some climacteric changes in papaya fruit, such as pulp softening, negative effects on carotenoid accumulation were observed (Sozzi et al., 1999; Fox et al., 2005; Fabi et al., 2007).

In order to reduce some inconvenient ethylene-derived effects, such as rapid pulp softening, climacteric fruits have been exposed to 1-methylcyclopropene (1-MCP), an antagonist hormone, which is a gaseous compound, has a non-toxic mode of action, negligible residue and it is active at very low concentrations (Sisler and Serek, 1997; Blankenship and Dole, 2003; Watkins, 2006). 1-MCP blocks ethylene action by permanently binding to its receptors, inhibiting ethylene production by suppression of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) synthesis, the key enzyme responsible for ethylene biosynthesis. In practice, 1-MCP delays some changes of climacteric fruit during ripening, including degradation of chlorophylls, synthesis of carotenoids, solubilisation of cell-wall pectins and changes in the levels of volatiles and soluble sugars (Bauchot et al, 1998; Mir et al, 1999; Gao et al., 2007; Manenoi et al., 2007). The extent and longevity of 1-MCP action depend on the fruit specie, cultivar, maturity and mode

of ethylene biosynthesis induction. Generally, 1-MCP effects decrease when applied in fruits at advanced ripening stages (Feng et al., 2000; Mostofi et al, 2003; Bron et al., 2006).

The objective of the present study was to investigate the effects of postharvest ethylene-dependent treatments, similar to those commercially applied, on the carotenoid composition and accumulation during papaya fruit ripening, as well as on the fruit colour. The results achieved give some clues on how carotenoid biosynthesis occurs in the papaya fruit variety “Golden” and how it is affected by both treatments, with ethylene and with 1-MCP.

## **2. Results and Discussion**

### 2.1. Effects of treatments with ethylene and 1-MCP on the carotenoid composition during ripening of papaya

Papaya fruits were harvested at the pre-climacteric stage and during ripening all samples had similar carotenoid profile. Twenty one carotenoids were separated by high performance liquid chromatography (HPLC) on a C<sub>18</sub> column and identified by a photodiode array detector connected in series to a mass spectrometry. Lycopene was the major carotenoid, followed by  $\beta$ -cryptoxanthin; the other carotenoids being detected in low levels in all samples of *Carica papaya* cv. Golden (Figure 1). The chromatographic, UV-visible and mass spectrometry characteristics used for identification of carotenoids from papaya fruits are



presented in supplement 1 and the supplement 2 shows the quantitative composition of carotenoids in all samples during ripening (Supplemental Information 1 and 2).

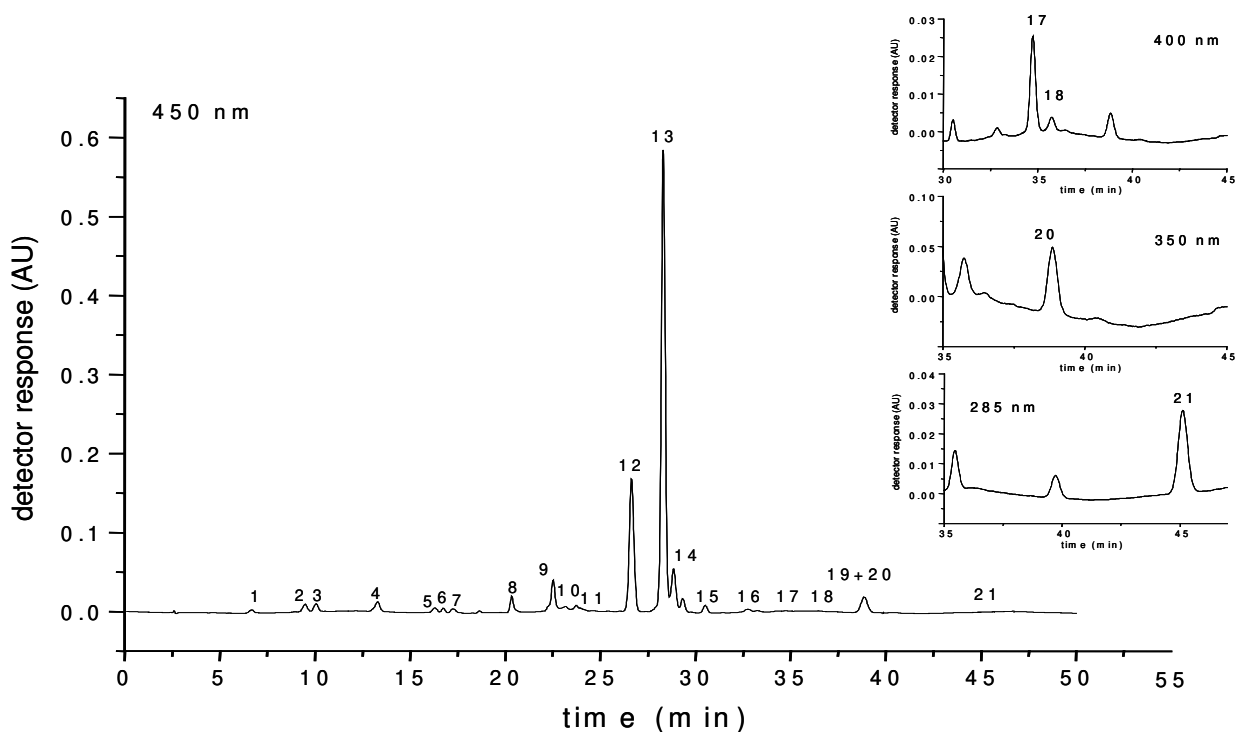


Figure 1. Chromatogram, obtained by HPLC, of the carotenoids from *Carica papaya* cv. Golden treated with ethylene and stored for five days. Peak identification: (1) all-trans-neoxanthin, (2) all-trans-violaxanthin, (3) cis-violaxanthin, (4) antheraxanthin, (5) all-trans-lutein, (6) lactucaxanthin, (7) all-trans-zeaxanthin, (8) 5,6-epoxy- $\beta$ -cryptoxanthin, (9) zeinoxanthin, (10) all-trans-rubixanthin, (11) 1,2-epoxy-lycopene, (12) all-trans- $\beta$ -cryptoxanthin, (13) all-trans-lycopene, (14) 13-cis-lycopene, (15) polycopene, (16) all-trans- $\gamma$ -carotene, (17) cis- $\zeta$ -carotene, (18) all-trans- $\zeta$ -carotene, (19) all-trans- $\beta$ -carotene, (20) phytofluene, (21) phytoene.

Both treated papaya fruits (ethylene and 1-MCP) showed lower total carotenoid contents as compared to those found in control fruits. The carotenoid levels apparently remained constant in the beginning of the treatments; however, during all the experiment time, their levels in treated papaya fruits decreased almost half to those found in control fruits (Figure 2). These facts suggested that both treatments inhibited or dislocated the biosynthetic pathway by strongly affecting carotenoids precursors.

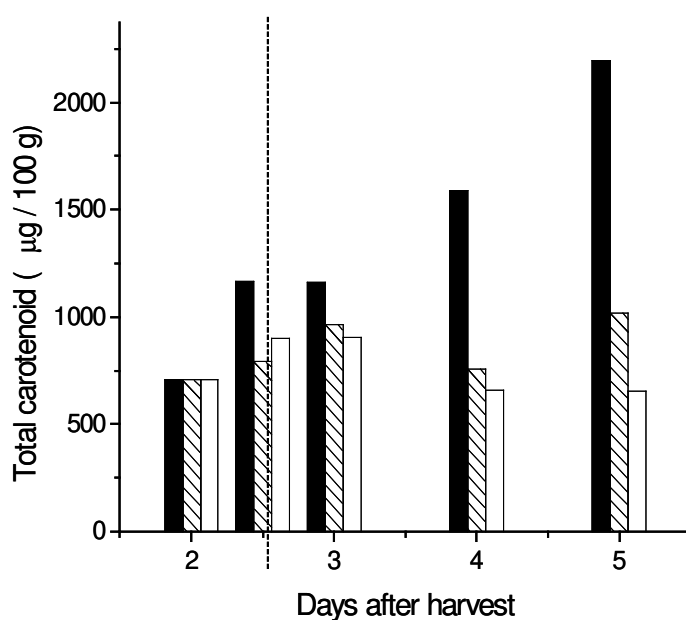


Figure 2. Total carotenoid ( $\mu\text{g}/100\text{g}$ ) content measured during ripening of untreated (control, black column), ethylene treated (striped column) and 1-MCP treated (white column) papaya fruits. The dash line shows the end of gas treatments (ethylene and 1-MCP).

In addition, both treated papaya fruits (ethylene and 1-MCP) also accumulated lower amounts of minor carotenoids as compared to those in the control fruit. This behaviour was previously reported by Fabi et al (2007) for the major carotenoids (lycopene,  $\beta$ -cryptoxanthin and  $\beta$ -carotene) in papaya under the same treatments.

Volatile compounds production in mountain papaya also decreased during ripening under 1-MCP treatment, suggesting an inhibition of climacteric changes usually triggered by ethylene (Balbontín et al., 2007). As a matter of fact, Moya-Léon & Herrera (2004) observed that ACC oxidase activity and ethylene production in 1-MCP treated mountain papaya did not increase, whereas in non-treated fruits, both ethylene production and level of ACC oxidase activity increased normally during ripening. Thus, the inhibition of ethylene production by suppression of ACC oxidase by 1-MCP can block normal fruit ripening, including synthesis of carotenoids (Abdi et al., 1998; Gao et al., 2007).

These results suggest that the carotenoid biosynthetic pathway were negatively affected by ethylene and 1-MCP, either by the consumption of their early precursors, such as GGDP, or by inhibiting GDP accumulation or phytoene synthase activity.

Taking in consideration the carotenoid composition of the control, ethylene and 1-MCP treated fruits during papaya ripening (Supplement 2), a biosynthetic pathway of carotenoids is proposed in Figure 3.

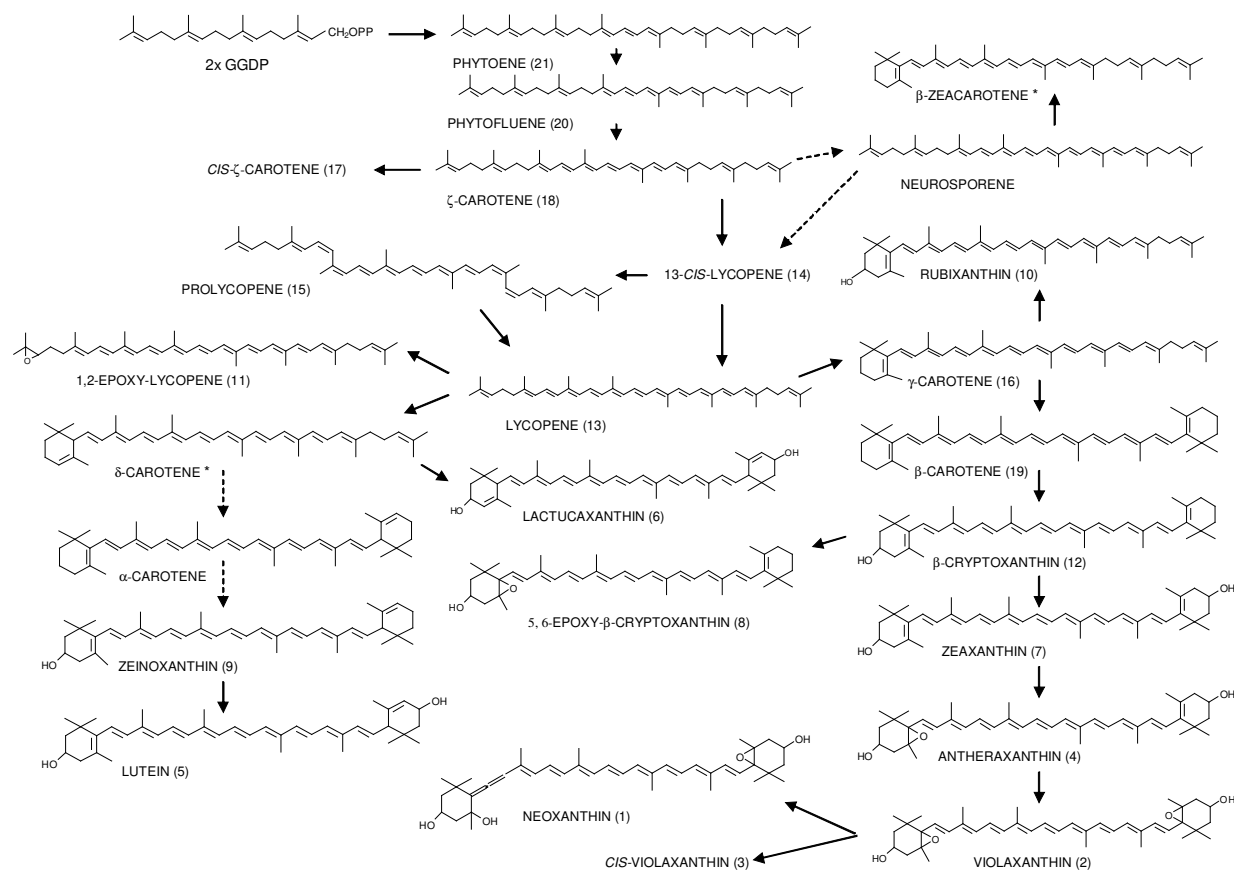


Figure 3. Scheme of the proposed biosynthetic pathway of carotenoids in papaya fruit during ripening. Numbers in blankets are related to the HPLC peaks. Asterisk indicates that the carotenoids were only detected in some samples when analysed by HPLC-PDA-MS on a  $C_{30}$  column. The dotted arrows indicate pathways that were not observed in the present study.

The first step in the biosynthesis of carotenoids is the well-known condensation of two molecules of geranylgeranyl diphosphate (GGDP) to form phytoene (peak 21), followed by a series of desaturation reactions resulting in carotenes with 5 to 11 conjugated double bonds (peaks 20, 21, 13), cyclisation in one or both end-groups of the molecule, and further hydroxylation at C-3 (peaks 5, 6, 7, 9, 10, 12) and epoxidation at C-5,6 (peaks 1, 2, 4, 8) and at C-1,2 (peak 11). Isomerases also seem to be active since cis isomers of  $\zeta$ -carotene (peak 17), lycopene (peaks 14, 15) and violaxanthin (peak 3) were found in all groups, along with 15-cis and 9-cis-lycopene, 13-cis and 13'-cis- $\beta$ -cryptoxanthin, cis-neoxanthin, cis-lutein, cis-phytofluene, 13-cis- $\beta$ -carotene and cis- $\beta$ -zeaxanthin detected only on the C<sub>30</sub> column.

## 2.2. Influence of ethylene and 1-MCP treatments on carotenoid biosynthesis pathways

Based on the carotenoid biosynthetic pathway (Figure 3), different carotenoid concentration ratios were calculated for untreated (control) and treated (ethylene and 1-MCP) papaya fruit during ripening.

The highest ratio values between lycopene and its precursors (phytoene, phytofluene,  $\zeta$ -carotene, cis- $\zeta$ -carotene and cis-lycopene) were observed after the third day in the control fruits, after 12 h in ethylene treated group, and only in the fourth and fifth days in 1-MCP treated fruits (Figure 4). This behaviour was also observed for the ratios between lycopene and carotenoids with  $\beta$ -cyclisation in both end-groups ( $\beta$ -carotene +  $\beta$ -cryptoxanthin+ zeaxanthin), Figure 5A, or with one  $\epsilon$ -

ring in one and one  $\beta$ -ring in the other end-group (lycopene/zeinoxanthin+lutein, Figure 5B). Therefore these results indicate that the biosynthesis of lycopene was stimulated in the presence of ethylene whereas it was delayed under 1-MCP treatment.

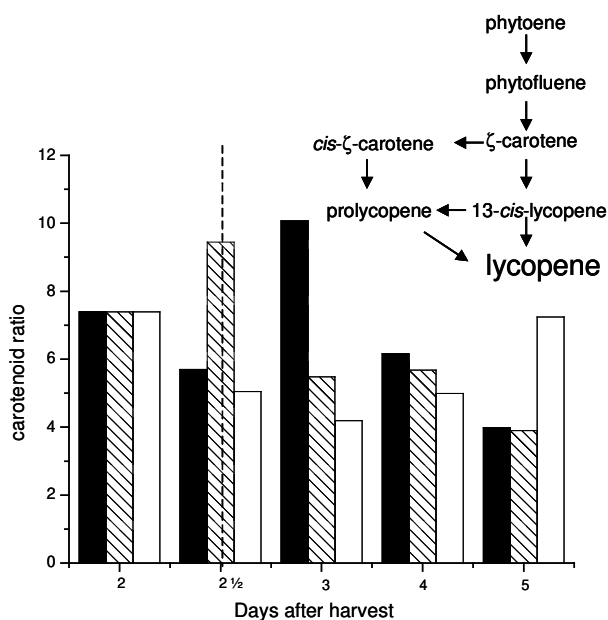


Figure 4. Carotenoid concentration ratio of lycopene/phytoene+phytofluene+ $\zeta$ -carotene+cis- $\zeta$ -carotene+cis-lycopene+prolycopene from papaya fruits. Control: black column, ethylene: striped column and 1-MCP: white column. The dash line shows the end of gas treatments.

The ratio values presented in Figure 5A-C indicated that after 12 h of both gas treatments the biosynthetic pathway was modified, since the lycopene/ $\gamma$ -carotene+rubixanthin ratio value (Figure 5C) was lower than those calculated for lycopene/ $\beta$ -carotene+ $\beta$ -cryptoxanthin+zeaxanthin (Figure 5B) and for lycopene/zeinoxanthin+lutein (Figure 5C) as compared to the control group. In fact, in ethylene and 1-MCP treated groups the pathway to  $\gamma$ -carotene was favoured,

whereas in the control group the pathway was dislocated to cyclization in both end-groups. Thus, most probably ethylene and 1-MCP inhibit the lycopene cyclases. This fact was already reported for orange, when ethylene application rapidly reduced transcription of the  $\epsilon$ -LCY gene to undetectable levels in the flavedo of this fruit (Rodrigo and Zacarias, 2007), and since this gene is involved in the  $\epsilon$ -cyclization of lycopene, the important decline in the  $\epsilon$ -LCY expression observed in the ethylene-treated fruit could be responsible for the decrease in  $\alpha$ -carotene and lutein levels in orange.

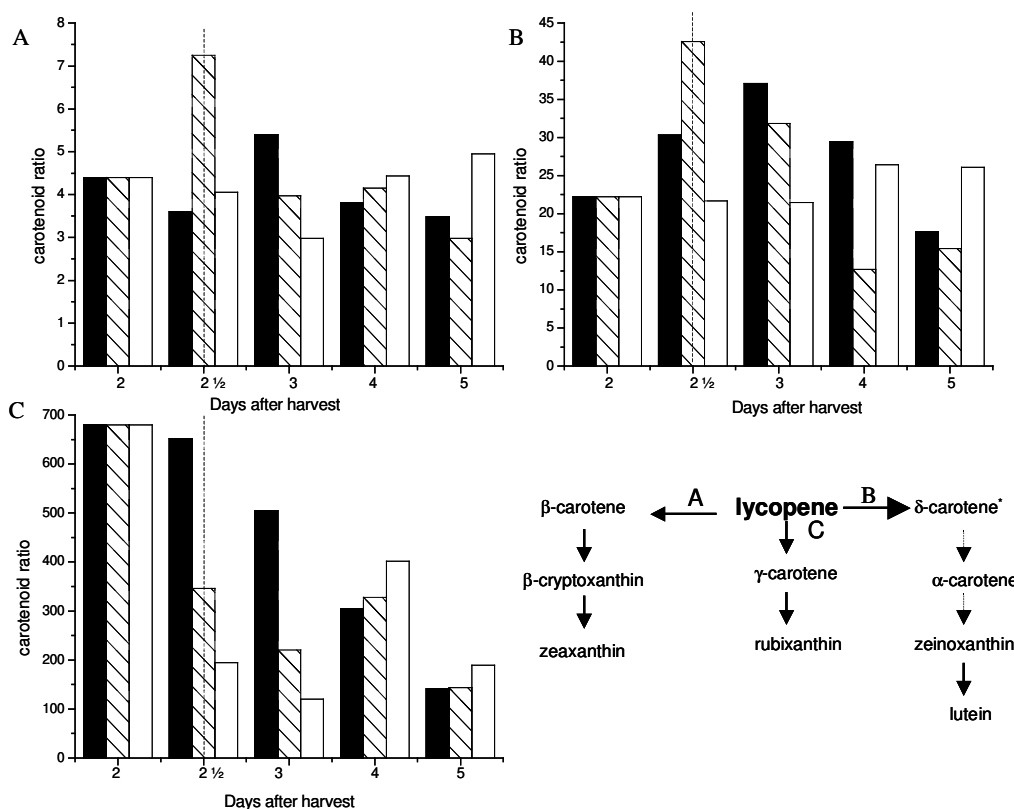


Figure 5. Carotenoid concentration ratios (A) lycopene/ $\beta$ -carotene+ $\beta$ -cryptoxanthin+zeaxanthin, (B) lycopene/zeinoxanthin+lutein, (C) lycopene/ $\gamma$ -carotene+rubixanthin from papaya fruit. Control: black column, ethylene: striped column and 1-MCP: white column. The dash line shows the end of gas treatments.

The  $\beta$ -cryptoxanthin+zeaxanthin+rubixanthin/ $\gamma$ -carotene+ $\beta$ -carotene values were similar for all 3 groups during ripening (Figure 6), indicating that both ethylene and 1-MCP did not influence the balance between the activities of  $\beta$ -carotene hydroxylase and  $\beta$ -lycopene cyclase.

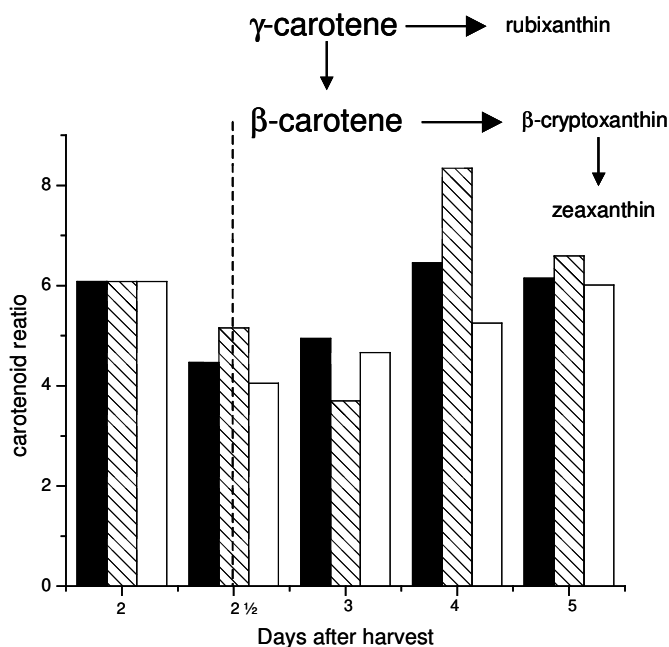


Figure 6. Carotenoid concentration ratio of  $\beta$ -cryptoxanthin+zeaxanthin+rubixanthin/ $\gamma$ -carotene+ $\beta$ -carotene, from papaya fruits. Control: black column, ethylene: striped column and 1-MCP: white column. The dash line shows the end of gas treatments.

The  $\beta$ -cryptoxanthin+zeaxanthin+rubixanthin/antheraxanthin+violaxanthin+cis-violaxanthin+neoxanthin+5,6-epoxy- $\beta$ -cryptoxanthin values calculated for control and ethylene groups were higher than that found for the 1-MCP group (Figure 7). In addition, this ratio values did not change during ripening of 1-MCP treated fruits. These facts indicated that 1-MCP treatment inhibited or delayed the



zeaxanthin epoxidase and neoxanthin synthase enzymes, whereas  $\beta$ -carotene hydroxylase was stimulated in control and ethylene groups by increasing the biosynthesis of polyhydroxy carotenoids with no epoxide groups.

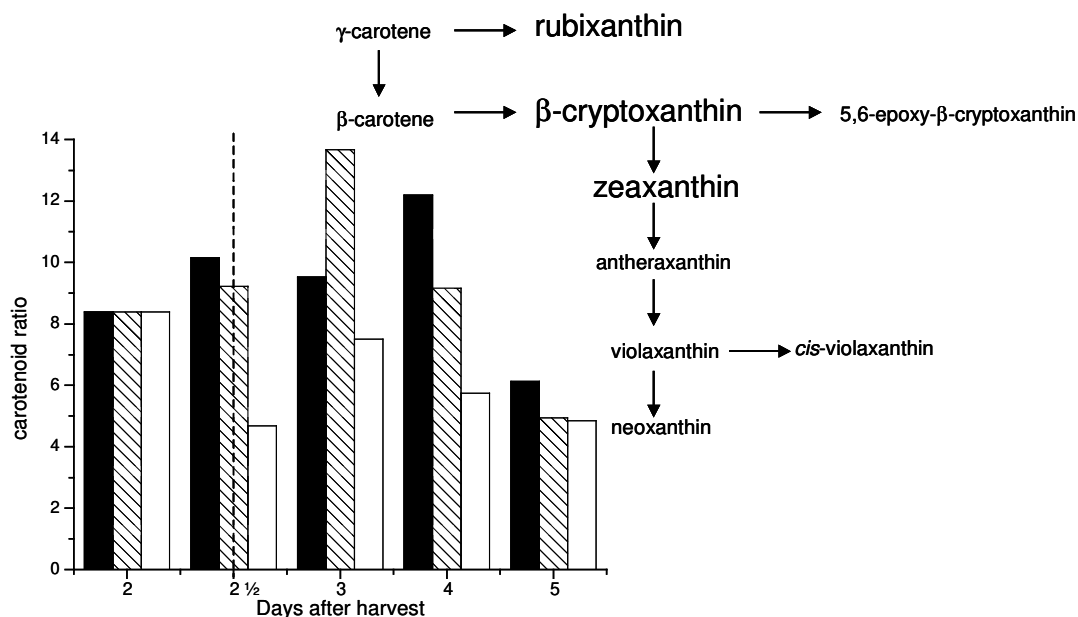


Figure 7. Carotenoid concentration ratio of  $\beta$ -cryptoxanthin + zeaxanthin + rubixanthin/ antheraxanthin+violaxanthin+cis-violaxanthin+neoxanthin+5,6-epoxy- $\beta$ -cryptoxanthin, from papaya fruits. Control: black column, ethylene: striped column and 1-MCP: white column. The dash line shows the end of gas treatments.

The fruits treated with ethylene showed maximum lycopene/cis-lycopene+prolycopene+cis- $\zeta$ -carotene value 12 h after treatment. Since the maximum value for this ratio was found only in the third day for the control group, carotene cis-trans isomerase was probably stimulated by ethylene (Figure 8). On the other hand, no significant change in this ratio value was observed during ripening of 1-MCP treated fruits, indicating that the isomerase was either inhibited or delayed by 1-MCP.

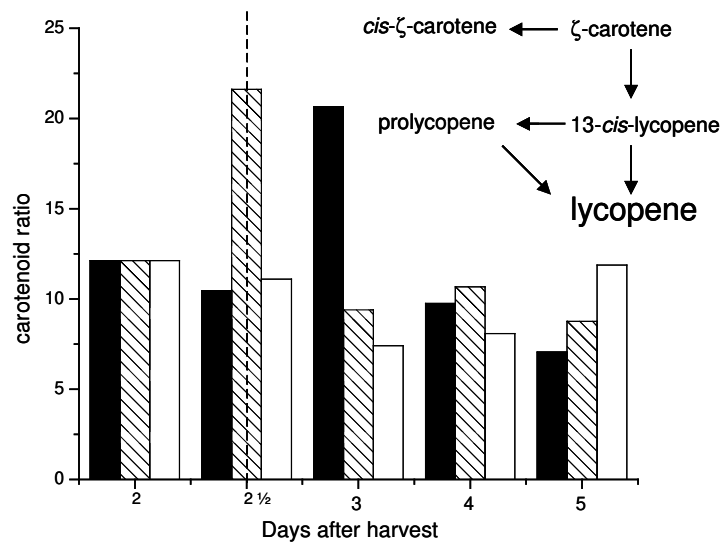


Figure 8. Carotenoid concentration ratio of lycopene/cis-lycopene+prolycopene +cis- $\zeta$ -carotene., from papaya fruits. Control: black column, ethylene: striped column and 1-MCP: white column. The dash line shows the end of gas treatments.

### 2.3. Correlation of carotenoids and colour parameters changes during ripening of treated and untreated papaya fruits

The variation in papaya fruit colour is derived from carotenoids present in fruit cells. Colour of ripe papaya fruit can vary from pale yellow, through orange, to red, depending on the carotenoid composition. Figure 9a compares the accumulation of  $\beta$ -cryptoxanthin contents with  $b^*$  values during ripening, since this carotenoid possesses 11 conjugated double bonds and reflects light in the yellow region, whilst lycopene, that reflects red light, was correlated to  $a^*$  value (Figure 9b).

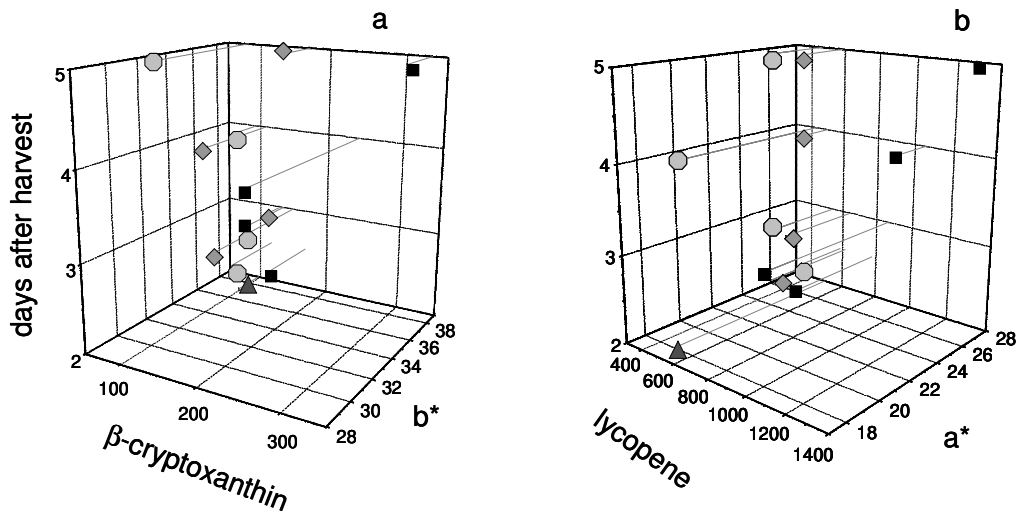


Figure 9. Carotenoid contents and colour parameters during ripening of untreated (control, black square), ethylene treated (grey lozenge) and 1-MCP treated (grey circle) papaya fruits. Contents of  $\beta$ -cryptoxanthin and  $b^*$  values (graph a), lycopene and  $a^*$  values (graph b). The day before treatment is represented by black triangle.

In the end of the experiments, the total carotenoid contents in the control group (2194.38  $\mu\text{g}/100\text{g}$ ) was more than twice those found in both gas treated samples (1018.06 and 654.54  $\mu\text{g}/100\text{g}$  for ethylene and 1-MCP, respectively) (Supplement 2); however, the colour values were all in the same range ( $a=27.2$ ,  $b=36.0$ ) for the control as compared to gas treated samples ( $a=24.5-25.2$ ,  $b=31.6-36.4$ ), Figure 9. In fact, fruit colour increased with corresponding increases in lycopene and  $\beta$ -cryptoxanthin accumulation, but only up to a certain point. Thereafter, the carotenoids continued to accumulate, but there was no further increase in the colour values.

Similar behaviour was also reported by Opiyo & Ying (2005) for cherry tomato, who observed that increase in the colour index was not directly related to pigment accumulation. This is possible since there is no linear relationship between perceived fruit colour and pigments accumulation.

### **3. Conclusions**

The treatment of papaya fruits with 1-MCP and ethylene gave some clues on the carotenoid biosynthesis of these fruits, since changes on the enzyme activities could be verified by determination of the carotenoid composition by HPLC. Both gas treatments negatively affected carotenoid accumulation; however this change did not reflect on the colour values ( $a^*$  and  $b^*$ ) since they were all in the same range for the control and gas treated samples during ripening.

## 4. Experimental

### 4.1. Plant material

The fruits were harvested and treated according to our previous study (Fabi et al., 2007).

### 4.2. Methods

Colour measurement was carried out in a HunterLab ColorQuest XE instrument (Hunter Associates Laboratories) using the same parameters described earlier by Fabi et al. (2007). Postprocess CIELAB L\*, a\*, b\* values were recorded, and pulp colour measurements were taken five times.

The carotenoids were exhaustively extracted with acetone, followed by saponification (De Rosso and Mercadante, 2005; Fabi et al., 2007). All extractions were conducted in duplicate.

Carotenoids were separated and quantified by high performance liquid chromatography (HPLC) connected to a photodiode array detector (PDA), using the same conditions set before for papaya: C<sub>18</sub> Nova-Pak ODS column with a linear gradient of acetonitrile (0.1% triethylamine (TEA))/water/ethyl acetate from 88:2:10 to 85:0:15 (v/v) in 15 minutes, maintaining this proportion for 25 minutes, at a flow rate of 1 mL/min and column temperature set at 25°C (Fabi et al., 2007). Chromatograms were processed at 450, 400, 350 and 285 nm and the spectra were obtained between 250 and 600 nm. For quantification, calibration curves

were constructed for all-trans-lycopene, all-trans- $\beta$ -cryptoxanthin and all-trans- $\beta$ -carotene with a minimum of seven concentration levels, and the concentration levels were chosen to include those of the samples. Since the following carotenoids were present in the samples at low concentrations or the respective standards were not available, all-trans-neoxanthin, all-trans-violaxanthin, cis-violaxanthin, all-trans-lutein, all-trans-zeaxanthin and all-trans-rubixanthin were quantified using the all-trans- $\beta$ -cryptoxanthin area; cis-lycopene, prolycopene,  $\gamma$ -carotene,  $\zeta$ -carotene and phytofluene using the all-trans- $\beta$ -carotene area.

For identification purposes, one carotenoid extract from papaya was also separated on a C<sub>30</sub> column by HPLC connected in series to a PDA and mass spectrometry (MS) detectors using the same equipment and conditions already reported by De Rosso & Mercadante (2007). The same extract was also analyzed by HPLC-PDA-MS/MS using the C<sub>18</sub> column and conditions described above, with exception that TEA was excluded from the mobile phase when the samples were analyzed by the MS detector because TEA shows high proton affinity, being more easily ionized in the APCI source, and as a result the carotenoid ion signals decreased.

The carotenoids were identified according to the following parameters: chromatographic behaviour on the C<sub>18</sub> HPLC column, UV-visible spectra ( $\lambda_{\max}$  and shape) features compared to literature data (Britton, 1995; Davies, 1976; Mercadante and Egeland, 2004) and co-chromatography with authentic standards.

## Acknowledgments

The authors thank the Brazilian Funding Agency CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) and FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) and DSM Nutritional products (Switzerland) for financial support.

## References

- Abdi, N., McGlasson, W.B., Holford, P., Williams, M., Mizrahi, Y., 1998. Responses of climacteric and suppressed-climacteric plums to treatment with propylene and 1-methylcyclopropene. *Postharvest Biol. Technol.* 14, 29-39.
- Balbontín, C., Gaete-Eastman, C., Vergara, M., Herrera, R., Moya-León, M.A., 2007. Treatment with 1-MCP and the role of ethylene in aroma development of mountain papaya fruit. *Postharvest Biol. Technol.*, 43, 67-77.
- Bauchot, A.D., Mottram, D.S., Dodson, A.T., John, P., 1998. Effect of aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase on the formation of volatile esters in cantaloupe charentais melon (Cv. Védrandais). *J. Agric. Food Chem.* 46, 4787-4792.
- Blankenship, S.M., Dole, J.M., 2003. 1-methylcyclopropene: a review. *Postharvest Biol. Technol.* 28, 1-25.
- Britton, G., 1995. UV/vis spectroscopy. In *Carotenoids*. 1<sup>st</sup>B vol.; Britton G.; Liaaen-Jensen S.; Pfander H. Birkhauser: Basel, Switzerland, p. 13-62.

- Bron, I.U., Jacomino, A.P., Pinheiro, A.L., 2006. Influence of ripening stage on physical and chemical attributes of 'Golden' papaya fruit treated with 1-methylcyclopropene. *Bragantia*, 65, 553-558.
- Burns, J., Fraser, P.D., Bramley, P.M., 2003. Identification and quantification of carotenoids, tocopherols and chlorophylls in commonly consumed fruits and vegetables. *Phytochemistry* 62, 939-947.
- Davis, B.H., Goodwin, T.W., 1976. Carotenoids. In *Chemistry and biochemistry of plant pigments*, vol. 2<sup>nd</sup>. London, pp. 38-165.
- De Rosso, V.V., Mercadante, A.Z., 2005. Carotenoid composition of two Brazilian genotypes of acerola (*Malpighia puniceifolia* L.) from two harvests. *Food Res. Int.* 38, 1073-1077.
- De Rosso, V.V., Mercadante, A.Z., 2007. Identification and quantification of carotenoids, by HPLC-PDA-MS/MS, from Amazonian fruits. *J. Agric. Food Chem.*, 55, 5062-5072.
- Devitt, L.C., Sawbridge, T., Holton, T.A., Mitchelson, K., Dietzgen, R.G., 2006. Discovery of genes associated with fruit ripening in *Carica papaya* using expressed sequence tags. *Plant Sci.* 170, 356-363.
- Fabi J.P., Cordenunsi B.R., Barreto G.P.M., Mercadante A.Z., Lajolo F.M., Nascimento J.R.O., 2007. Papaya fruit ripening: response to ethylene and 1-methylcyclopropene (1-MCP). *J. Agric. Food Chem.* 55, 6118-6123.
- Feng, X., Apelbaum, A., Sisler, E.C., Goren, R., 2000. Control of ethylene responses in avocado fruit with 1-methylcyclopropene. *Postharvest Biol. Technol.* 20, 143-150.



- Fox, A.J., Del Pozo-Insfran, D., Lee, J.H., Sargent, S.A., Talcote, S.T., 2005. Ripening-induced chemical and antioxidant changes in bell peppers as affected by harvest maturity and postharvest ethylene exposure. *Hortscience* 40, 732-736.
- Fraser, P.D., Bramley, P.M., 2004. The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. *Prog. Lipid Res.* 43, 228-265.
- Gao, H.Y., Zhu, B.Z., Zhu, H.L., Zhang, Y.H., Xie, Y.H., Li, Y.C., Luo, Y.B., 2007. Effect of suppression of ethylene biosynthesis on flavour products in tomato fruits. *Russ. J. Plant Phys.*, 54, 80-88.
- Giovannucci, E., 1999. Tomatoes, tomato-based products, lycopene, and cancer: review of the epidemiological literature. *J. Natl. Cancer Inst.* 91, 317–331.
- Goodwin, T.W., 1980. *The biochemistry of the carotenoids*. 2<sup>nd</sup> ed, vol. I. London, Chapman and Hall.
- Howitt, C.A., Pogson, B.J., 2006. Carotenoid accumulation and function in seeds and non-green tissues. *Plant Cell Environ.* 29, 435-445.
- Krinsky, N.I., 1994. The biological properties of carotenoids. *Pure Appl. Chem.* 66, 1003-1010.
- Manenoi, A., Bayogan, E.R.V., Thumdee, S., Paull, R.E., 2007. Utility of 1-methylcyclopropene as a papaya postharvest treatment. *Postharvest Biol. Technol.* 44, 55-62.

- Mercadante, A. Z., 2007. Carotenoids in foods: sources and stability during processing and storage. In: Food Colorants: Chemical and Functional Properties, C. Socaciu (ed.). CRC Press, Boca Raton, p. 213-240.
- Mercadante, A.Z. Egeland E.S., Britton G., Liaaen-Jensen S., Pfander H., 2004. Carotenoids Handbook, vol 1<sup>st</sup>. Birkhauser, Basel, Switzerland.
- Mir, N.A., Perez, R., Schwallier, P., Beaudry, R., 1999. Relationship between ethylene response manipulation and volatile production in jonagold variety apples. J. Agric. Food Chem. 47, 2653-2659.
- Mostofi, Y., Toivonen, P.M.A., Lessani, H., Babalar, M., Lu, C., 2003. Effects of 1-methylcyclopropene on ripening of greenhouse tomatoes at three storage temperatures. Postharvest Biol. Technol. 27, 285-292.
- Moya-León, M.A., Moya, M., Herrera, R., 2004. Ripening of mountain papaya (*Vasconcellea pubescens*) and ethylene dependence of some ripening events. Postharvest Biol. Technol., 34, 211-218.
- Opiyo, A.M., Ying, T.J., 2005. The effects of 1-methylcyclopropene treatment on the shelf life and quality of cherry tomato (*Lycopersicon esculentum* var. *cerasiforme*) fruit. Int. J. Food Sci. Technol., 40, 665-673.
- Rodrigo, M.J., Zacarias, L., 2007. Effect of postharvest ethylene treatment on carotenoid accumulation and the expression of carotenoid biosynthetic genes in the flavelo of orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck) fruit. Postharvest Biol. Technol. 43, 14-22.
- Sisler, E.C., Serek, M., 1997. Inhibitors of ethylene responses in plants at the receptor level: recent developments. Physiol. Plant. 100, 577-582.

Sozzi, G.O., Trincherò, G.D., Frascina, A.A., 1999. Controlled-atmosphere storage of tomato fruit: low oxygen or elevated carbon dioxide levels alter pectinase activity and inhibit exogenous ethylene action. *J. Sci. Food Agric.* 79, 1065-1070.

Stahl, W., Sies, H., 2005. Bioactivity and protective effects of natural carotenoids. *Biochim. Biophys. Acta* 1740, 101-107.

Watkins, C.B., 2006. Review: The use of 1-methylcyclopropene (1-MCP) on fruits and vegetables. *Biotechnol. Adv.* 24, 389-409.



## 5. CONCLUSÃO GERAL

No método ABTS para análise da atividade anti-radical livre de carotenóides puros, foi observado que a escolha do solvente é muito importante, entretanto não houve diferença entre as temperaturas de análise. Entre os padrões de carotenóides estudados o valor de TEAC obtido, em ordem decrescente, foi:  $\beta$ -caroteno, zeaxantina,  $\beta$ -criptoxantina, 8-apo-carotenal, 10-apo-carotenal, 12-apo-carotenal e astaxantina, portanto, o grupo carbonila e o menor número de ligações duplas conjugadas (l.d.c.) reduziram a atividade anti-radical livre do carotenóide. Em relação às coordenadas de cor ( $a^*$  e  $b^*$ ) o  $\beta$ -caroteno,  $\beta$ -criptoxantina e zeaxantina apresentaram aumento de 2,7 vezes do valor negativo de  $a^*$  com o aumento da concentração, já o valor positivo de  $b^*$  aumentou 5,5 vezes, indicando maior tonalidade da cor amarela. Entre os apo-carotenais, o 8-apo-carotenal foi o único que apresentou valor positivo de  $a^*$  a partir da concentração 6  $\mu$ M, enquanto que, a astaxantina apresentou valor positivo de  $a^*$  em todas as concentrações analisadas, portanto estes carotenóides mostraram maior tonalidade da cor vermelha. O parâmetro croma ( $C^*$ ) e a porcentagem de inibição dos carotenóides estudados apresentaram correlação linear para os carotenóides com comprimento de onda máximo de absorção em torno de 450 nm.

Ao realizar a análise da atividade anti-radical livre, pelo método ABTS, com extratos complexos (polpas de frutas tropicais) os resultados confirmaram a alta correlação positiva entre atividade anti-radical livre e compostos fenólicos e flavonóides, além de indicar que os carotenóides e ácido ascórbico apresentam menor contribuição à atividade anti-radical livre medida pelo método ABTS<sup>•+</sup>. As frutas buriti, cajá-manga, canistel, murici, physalis, piquia e tucumã, apresentaram maior conteúdo de compostos bioativos entre as 18 frutas tropicais estudadas.

No estudo realizado a partir de ingredientes provenientes do caju clone CCP-076, dentre o bagaço de caju (retentado) e derivados (extrato bruto e concentrado), o retentado mostrou ser um ingrediente de cor amarela intensa, rico em compostos fenólicos e carotenóides, além de apresentar a maior atividade anti-radical livre. Por outro lado, o extrato pode ser considerado um ingrediente para fornecer ácido ascórbico, além de também apresentar atividade anti-radical livre.

No estudo realizado com mamão papaia, que foi submetido aos tratamentos com etileno e 1-MCP (1-metilciclopropeno), foi observado que ambos tratamentos interferiram negativamente na síntese de carotenóides. A biosíntese de carotenóides foi retardada na presença do 1-MCP, exceto a rota bioquímica do  $\gamma$ -caroteno. Na presença do etileno, somente a rota bioquímica para ciclização de ambos os grupos finais foi retardada, entretanto a biosíntese do licopeno foi estimulada, assim como a biosíntese dos carotenóides polihidroxilados, sem grupo epóxido, e a isomerização. Em relação aos parâmetros de cor ( $a^*$  e  $b^*$ ), os valores observados dos grupos etileno e 1-MCP estavam na mesma faixa do grupo controle, porém o teor de carotenóides totais do grupo controle foi mais que o dobro do encontrado nos grupos etileno e 1-MCP.

# **ANEXOS**





**TABELAS COMPLEMENTARES DO  
CAPÍTULO 2**



Tabela 1. Porcentagem de inibição do  $\beta$ -caroteno (2 a 10 $\mu$ M, concentração final) medida pelo método ABTS, após 10 minutos de reação, sob duas condições: na presença de ar e com saturação de nitrogênio.

Concentração ( $\mu$ M)	Ar*	Nitrogênio*
2	28,71 $\pm$ 1,51 <sup>f</sup>	30,42 $\pm$ 0,95 <sup>f</sup>
3	36,61 $\pm$ 0,48 <sup>de</sup>	35,43 $\pm$ 0,24 <sup>e</sup>
4	39,88 $\pm$ 1,11 <sup>d</sup>	39,66 $\pm$ 3,02 <sup>d</sup>
6	54,47 $\pm$ 0,43 <sup>c</sup>	56,39 $\pm$ 0,35 <sup>c</sup>
8	64,00 $\pm$ 2,83 <sup>b</sup>	66,02 $\pm$ 0,56 <sup>b</sup>
10	80,51 $\pm$ 0,48 <sup>a</sup>	80,25 $\pm$ 0,26 <sup>a</sup>

\*- para as concentrações 2, 4 e 8  $\mu$ M, n= 4 e para as concentrações 3, 6 e 10  $\mu$ M, n= 2; diferente letra indica diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

Tabela 2. Porcentagem de inibição do  $\beta$ -caroteno (2 e 10  $\mu$ M, concentração final) medida pelo método ABTS, após 10 minutos de reação, sob duas temperaturas diferentes (30  $^{\circ}$ C e 22  $^{\circ}$ C).

Concentração ( $\mu$ M)	30 $^{\circ}$ C*	22 $^{\circ}$ C*
2	29,62 $\pm$ 0,59 <sup>b</sup>	29,47 $\pm$ 0,08 <sup>b</sup>
10	79,64 $\pm$ 0,37 <sup>a</sup>	78,15 $\pm$ 0,43 <sup>a</sup>

\*- média dos valores (n= 3); diferente letra indica diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

Tabela 3. Valor da coordenada de cor L\* de diferentes carotenóides em diferentes concentrações e variação do valor L\* entre a menor concentração e a maior concentração ( $\Delta L^*$ ).

Carotenóide	Concentração ( $\mu\text{M}$ )					$\Delta L^*$
	2*	4*	6*	8*	10*	
$\beta$ -caroteno	$37,85 \pm 0,04^c$	$37,20 \pm 0,01^d$	$36,60 \pm 0,02^d$	$36,07 \pm 0,03^e$	$35,82 \pm 0,07^d$	$2,03 \pm 0,09^c$
$\beta$ -criptoxantina	$38,13 \pm 0,04^b$	$37,34 \pm 0,03^c$	$36,86 \pm 0,04^c$	$36,54 \pm 0,01^c$	$36,28 \pm 0,01^c$	$1,86 \pm 0,05^d$
Zeaxantina	$37,81 \pm 0,01^c$	$37,04 \pm 0,05^e$	$36,52 \pm 0,06^d$	$36,19 \pm 0,04^d$	$35,91 \pm 0,06^d$	$1,90 \pm 0,06^{cd}$
Astaxantina	$36,05 \pm 0,03^e$	$34,27 \pm 0,07^g$	$32,73 \pm 0,02^f$	$31,69 \pm 0,05^g$	$30,80 \pm 0,05^f$	$5,26 \pm 0,04^a$
8-apo-carotenal	$37,53 \pm 0,02^d$	$36,43 \pm 0,02^f$	$35,25 \pm 0,06^e$	$34,67 \pm 0,02^f$	$34,02 \pm 0,03^e$	$3,51 \pm 0,03^b$
10-apo-carotenal	$38,15 \pm 0,02^b$	$37,67 \pm 0,01^b$	$37,18 \pm 0,03^b$	$36,88 \pm 0,03^b$	$36,56 \pm 0,03^b$	$1,59 \pm 0,03^e$
12-apo-carotenal	$38,73 \pm 0,03^a$	$38,16 \pm 0,02^a$	$37,78 \pm 0,02^a$	$37,66 \pm 0,02^a$	$37,42 \pm 0,02^a$	$1,31 \pm 0,04^f$

\*- média dos valores (n= 3); diferente letra na mesma coluna indica diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

**DADOS COMPLEMENTARES DO  
CAPÍTULO 3**



Tabela 1: Exportação do total de produtos agrícolas e de frutas e porcentagem de exportação de frutas no Brasil.

Ano	Total de produtos agrícolas exportados	Frutas <sup>1</sup>	
	bilhões de US\$	bilhões de US\$	%
1990	326,23	13,72	4,21
1991	329,22	15,40	4,68
1992	357,96	15,47	4,32
1993	339,27	14,96	4,41
1994	389,02	17,15	4,41
1995	443,49	19,32	4,36
1996	465,81	20,34	4,37
1997	457,85	20,09	4,39
1998	438,24	19,89	4,54
1999	417,60	19,31	4,63
2000	412,16	18,18	4,41
2001	413,73	18,63	4,50
2002	442,39	20,24	4,58
2003	524,56	24,11	4,60
2004	604,92	26,94	4,45

<sup>1</sup> incluem as frutas: bananas, maçã, laranjas, uvas, passas, pêras, pêssegos, morangos, kiwis, grapefruits, melancias, mangas, abacaxis, abacates, cerejas, limões, limas, mamões e melões.

Tabela 2: Exportação de frutas (tonelada líquida) no Brasil durante o período de 1996 a 2006

Frutas	Ano										
	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006
Banana	29957	40071	68555	81227	71812	105112	241038	220771	188087	212176	179923
Abacaxi	11542	12965	13003	15814	16023	14457	8660	12096	23375	19630	18650
Manga	-	-	-	-	-	-	-	4823	104475	113688	103291
Laranja	99223	91662	65614	103086	75345	139582	40374	68016	90119	30652	50139
Uva	4516	3705	4405	8083	14344	20660	26357	37601	28815	51213	59509
Mamão (papaia)	5693	7869	9878	15709	21510	22804	28541	39492	35930	38757	30163
Maçã	3309	20725	10706	57438	64480	35786	65927	76466	153043	99332	57147
Pêra	-	10	0	0	0	3	5	8	4	0	21
Pêssego	2	0	-	8	0	8	19	0	0	0	-
Morango	181	92	32	67	252	228	67	130	188	50	18



**Resolução nº 18, de 30 de abril de 1999 (\*)**

(republicada em 03/12/1999)

Diretor-Presidente da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, no uso de suas atribuições legais, considerando a necessidade de constante aperfeiçoamento das ações de controle sanitário na área de alimentos visando a proteção à saúde da população e a necessidade de estabelecer as DIRETRIZES BÁSICAS PARA ANÁLISE E COMPROVAÇÃO DE PROPRIEDADES FUNCIONAIS E OU DE SAÚDE ALEGADAS EM ROTULAGEM DE ALIMENTOS, e considerando:

que diversas forças motivadoras em todo o mundo têm fortalecido o interesse no uso da alimentação como determinante importante da saúde;

que o consenso da relação estreita entre alimentação-saúde-doença, novos conceitos sobre as necessidades de nutrientes em estados fisiológicos especiais, efeitos benéficos de outros compostos não nutrientes, fatores ligados à urbanização, aumento da expectativa de vida, são fatores que vêm estimulando a produção de novos alimentos;

que há muitos aspectos positivos demonstrados por pesquisas científicas motivando o uso correto da alimentação e a produção de alimentos específicos na manutenção da saúde;

que freqüentemente o consumidor é confundido com uma nomenclatura e alegações ("claims") de propriedades não demonstradas cientificamente;

a tendência do Codex Alimentarius e de vários países de disciplinar as alegações sobre as propriedades funcionais dos alimentos ou de seus componentes, como também a segurança de uso com base em evidências científicas;

que os princípios gerais do Regulamento Técnico para Rotulagem de Alimentos Embalados já estabelecem que :

a) não se pode apresentar no rótulo atributos de efeitos ou propriedades que não possam ser demonstrados;

b) é proibida a indicação de que o alimento possui propriedades medicinais ou terapêuticas, resolve:

Art. 1º Aprovar o REGULAMENTO TÉCNICO QUE ESTABELECE AS DIRETRIZES BÁSICAS PARA ANÁLISE E COMPROVAÇÃO DE PROPRIEDADES FUNCIONAIS E OU DE SAÚDE ALEGADAS EM ROTULAGEM DE ALIMENTOS, constante do anexo desta Portaria.

Art. 2º O descumprimento aos termos desta Portaria constitui infração sanitária sujeita aos dispositivos da Lei nº 6.437, de 20 de agosto de 1977, e demais disposições aplicáveis.

Art. 3º Esta Portaria entra em vigor na data de sua publicação, revogando-se as disposições em contrário.

GONZALO VECINA NETO

**ANEXO**

REGULAMENTO TÉCNICO QUE ESTABELECE AS DIRETRIZES BÁSICAS PARA ANÁLISE E COMPROVAÇÃO DE PROPRIEDADES FUNCIONAIS E OU DE SAÚDE ALEGADAS EM ROTULAGEM DE ALIMENTOS

## 1. ÂMBITO DE APLICAÇÃO.

O presente regulamento se aplica às alegações de propriedades funcionais e ou de saúde de alimentos e ingredientes para consumo humano, veiculadas nos rótulos de produtos elaborados, embalados e comercializados prontos para a oferta ao consumidor.

Este regulamento se aplica sem prejuízo das demais disposições das legislações de rotulagem de alimentos.

## 2. DEFINIÇÃO.

Para efeito deste regulamento, considera-se:

2.1. ALEGAÇÃO DE PROPRIEDADE FUNCIONAL: é aquela relativa ao papel metabólico ou fisiológico que o nutriente ou não nutriente tem no crescimento, desenvolvimento, manutenção e outras funções normais do organismo humano.

2.2. ALEGAÇÃO DE PROPRIEDADE DE SAÚDE: é aquela que afirma, sugere ou implica a existência de relação entre o alimento ou ingrediente com doença ou condição relacionada à saúde.

## 3. DIRETRIZES PARA UTILIZAÇÃO DA ALEGAÇÃO DE PROPRIEDADES FUNCIONAIS E OU DE SAÚDE.

3.1. A alegação de propriedades funcionais e ou de saúde é permitida em caráter opcional.

3.2. O alimento ou ingrediente que alegar propriedades funcionais ou de saúde pode, além de funções nutricionais básicas, quando se tratar de nutriente, produzir efeitos metabólicos e ou fisiológicos e ou efeitos benéficos à saúde, devendo ser seguro para consumo sem supervisão médica.

3.3. São permitidas alegações de função e ou conteúdo para nutrientes e não nutrientes, podendo ser aceitas aquelas que descrevem o papel fisiológico do nutriente ou não nutriente no crescimento, desenvolvimento e funções normais do organismo, mediante demonstração da eficácia. Para os nutrientes com funções plenamente reconhecidas pela comunidade científica não será necessária a demonstração de eficácia ou análise da mesma para alegação funcional na rotulagem.

3.4. No caso de uma nova propriedade funcional, há necessidade de comprovação científica da alegação de propriedades funcionais e ou de saúde e da segurança de uso, segundo as Diretrizes Básicas para Avaliação de Risco e Segurança dos Alimentos.

3.5. As alegações podem fazer referências à manutenção geral da saúde, ao papel fisiológico dos nutrientes e não nutrientes e à redução de risco a doenças. Não são permitidas alegações de saúde que façam referência à cura ou prevenção de doenças.

## 3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

3.1. FAO/WHO, Codex Alimentarius, CAC/GL 23-1997, Guidelines for the Use of Nutrition Claims.

3.2. FAO/WHO Codex Alimentarius, ALINORM 97/22, Appendix II.

3.3. FAO/WHO Codex Alimentarius, ALINORM 99/22, Appendix X.

## 4. COMPROVAÇÃO DA ALEGAÇÃO DE PROPRIEDADES FUNCIONAIS OU DE SAÚDE.

4.1. A comprovação da alegação de propriedades funcionais e ou de saúde de alimentos e ou de ingredientes, deve ser conduzida com base em:

consumo previsto ou recomendado pelo fabricante;

finalidade, condições de uso e valor nutricional, quando for o caso;

evidência(s) científica(s) descrita(s) no item 4.2..

4.2. Evidências científicas aplicáveis, conforme o caso, à comprovação da alegação de propriedade funcional e ou de saúde:

composição química com caracterização molecular, quando for o caso, e ou formulação do produto;

ensaios bioquímicos;

ensaios nutricionais e ou fisiológicos e ou toxicológicos em animais de experimentação;

estudos epidemiológicos;

ensaios clínicos;

evidências abrangentes da literatura científica, organismos internacionais de saúde e legislação internacionalmente reconhecida sobre as propriedades e características do produto;

comprovação de uso tradicional, observado na população, sem associação de danos à saúde.

4.3. Informações documentadas sobre aprovação de uso do alimento ou ingrediente em outros países, blocos econômicos, Codex Alimentarius e outros organismos internacionalmente reconhecidos.

## 5. DISPOSIÇÕES GERAIS.

Embora já se conheçam metodologias de avaliação de risco para comprovar a segurança de alimentos e ingredientes, podem ocorrer situações não previstas. Desta forma, a avaliação das alegações de propriedade funcional e ou de saúde deve ser gerenciada, caso a caso, por uma Comissão de Assessoramento Técnico-científica em Alimentos Funcionais e novos Alimentos instituída por portaria específica, com base em conhecimentos científicos atuais, levando-se em conta a natureza do material sob exame.



# **SUPPLEMENTAL INFORMATION 1**



Table 1. Chromatographic, UV-Visible spectroscopic and mass spectrometric characteristics of carotenoids from *Carica papaya* cv. Solo var. Golden.

Peak <sup>a</sup>	carotenoid	t <sub>R</sub> range (min) <sup>b</sup>	λ <sub>max</sub> (nm) <sup>c</sup>	% III/II	% A <sub>B</sub> /II	[M+H] <sup>+</sup> (m/z)	MS/MS (m/z)
1	all-trans-neoxanthin	6.7-7.1	418, 443, 472	89	0	601	583, 565, 547, 509, 491, 393, 221
2	all-trans-violaxanthin	9.0-11.5	416, 442, 471	93	0	601	583, 565, 509, 491, 221
3	cis-violaxanthin	9.6-10.9	327, 413, 437, 466	90	6	601	583, 565, 509, 491, 221
4	antheraxanthin	12.9-15.8	(426), 448, 476	60	0	585	567, 549, 531, 221
5	all-trans-lutein	16.3-17.3	423, 447, 476	69	0	569	551, 533, 477, 459
6	lactucaxanthin <sup>d</sup>	16.3-19.2	417, 442, 471	96	0	569	n.d.
7	all-trans-zeaxanthin	17.2-16.8	(430), 453, 481	33	0	569	551, 533, 463
8	5,6-epoxy-β-criptoxanthin	18.1-21.1	(425), 448, 476	60	0	569	551, 533, 221
9	zeinoxanthin	19.8-23.0	(428), 448, 476	53	0	553	535, 495
10	all-trans-rubixanthin	21.9-25.4	(439), 463, 492	36	0	553	535, 497, 461
11	1,2 epoxy-lycopene <sup>d</sup>	22.6-24.2	446, 472, 503	82	0	553	n.d.

Continuation of Table 1

Peak <sup>a</sup>	carotenoid	t <sub>R</sub> range (min) <sup>b</sup>	λ <sub>max</sub> (nm) <sup>c</sup>	% III/II	% A <sub>B</sub> /II	[M+H] <sup>+</sup> (m/z)	MS/MS (m/z)
12	all-trans-β-cryptoxanthin	23.1-25.1	(432), 454, 481	25	0	553	535, 495, 461
13	all-trans-lycopene	26.0-30.7	447, 474, 505	75	0	537	467, 444
14	13-cis-lycopene	27.7-30.1	360, 441, 466, 498	54	62	537	467, 444
15	polycopene	28.2-32.7	(424), 441, (464)	0	0	537	467, 444
16	all-trans-γ-carotene	28.6-31.3	437, 464, 494	35	0	537	467, 444
17	cis-ζ-carotene	29.8-34.8	378, 401, 425	68	0	541	472, 404
18	all-trans-ζ-carotene	32.0-35.0	379, 402, 426	95	0	541	472, 404
19	all-trans-β-carotene	34.9-38.8	(433), 454, 481	20	0	537	444
20	phytofluene	36.5-40.2	332, 348, 366	65	0	543	461, 406, 338
21	phytoene	40.9-45.4	276, 286, 300	0	0	545	489, 435, 395, 339

n.d., not detected; <sup>a</sup> Numbered according to Figure 1; <sup>b</sup> Retention time on the C<sub>18</sub> column; <sup>c</sup> Linear gradient of acetonitrile/EtOAc/H<sub>2</sub>O; <sup>d</sup> Tentative identification. Parenthesis indicates shoulder instead of peak.

% III/II: Spectral fine structure: ratio of the height of the longest wavelength absorption peak (III) and that of the middle absorption peak (II).

% A<sub>B</sub>/A<sub>II</sub>: Cis peak intensity: ratio of the height of the cis peak (A<sub>B</sub>) and that of the middle main absorption peak (A<sub>II</sub>).



## **SUPPLEMENTAL INFORMATION 2**



Table 1. Carotenoid composition from untreated samples of papaya cv. Solo var. Golden, during ripening.

Peak <sup>a</sup>	carotenoid	Concentration ( $\mu\text{g}/100\text{g}$ ) <sup>b</sup>				
		2 days	2 <sup>1</sup> / <sub>2</sub> days	3 days	4 days	5 days
1	all-trans-neoxanthin	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
2	all-trans-violaxanthin	n.d.	1.3 $\pm$ 0.0	1.8 $\pm$ 0.0	1.7 $\pm$ 0.2	7.6 $\pm$ 0.0
3	cis-violaxanthin	n.d.	n.d.	0.9 $\pm$ 0.0	n.d.	2.2 $\pm$ 0.0
4	anteraxanthin	n.d.	1.4 $\pm$ 0.1	2.6 $\pm$ 0.0	3.7 $\pm$ 0.5	13.7 $\pm$ 0.1
5	all-trans-lutein	2.1 $\pm$ 0.0	2.9 $\pm$ 0.1	3.5 $\pm$ 0.0	2.4 $\pm$ 0.0	6.0 $\pm$ 0.1
6	lactucaxanthin	1.9 $\pm$ 0.0	1.4 $\pm$ 0.1	1.8 $\pm$ 0.0	2.8 $\pm$ 0.1	7.5 $\pm$ 0.2
7	all-trans-zeaxanthin	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
8	5,6-epoxy- $\beta$ -cryptoxanthin	11.5 $\pm$ 0.2	14.8 $\pm$ 1.7	8.8 $\pm$ 0.1	14.5 $\pm$ 1.0	31.1 $\pm$ 0.1
9	zeinoxanthin	20.1 $\pm$ 0.5	22.7 $\pm$ 1.9	19.9 $\pm$ 1.0	33.6 $\pm$ 2.5	68.9 $\pm$ 0.1
10	all-trans-rubixanthin	n.d.	n.d.	0.3 $\pm$ 0.0	n.d.	3.5 $\pm$ 0.1
11	1,2-epoxy-lycopene	3.8 $\pm$ 0.0	3.7 $\pm$ 0.3	2.4 $\pm$ 0.1	n.d.	15.3 $\pm$ 0.1
12	all-trans- $\beta$ -cryptoxanthin	96.4 $\pm$ 6.2	168.2 $\pm$ 9.0	135.1 $\pm$ 16.3	242.4 $\pm$ 8.9	331.2 $\pm$ 14.4
13	all-trans-lycopene	491.3 $\pm$ 55.4	777.0 $\pm$ 102.6	869.5 $\pm$ 94.0	1057.6 $\pm$ 30.3	1321.6 $\pm$ 58.2
14	13-cis-lycopene	27.3 $\pm$ 0.7	44.8 $\pm$ 0.7	23.6 $\pm$ 0.0	69.1 $\pm$ 5.0	115.5 $\pm$ 2.4
15	prolycopene	0.9 $\pm$ 0.0	3.6 $\pm$ 0.0	1.1 $\pm$ 0.0	4.2 $\pm$ 0.2	11.0 $\pm$ 0.3
16	all-trans- $\gamma$ -carotene	0.7 $\pm$ 0.0	1.2 $\pm$ 0.0	1.4 $\pm$ 0.0	3.5 $\pm$ 0.2	5.9 $\pm$ 0.0
17	cis- $\zeta$ -carotene	12.3 $\pm$ 0.9	25.8 $\pm$ 1.4	17.4 $\pm$ 0.6	35.2 $\pm$ 1.4	60.6 $\pm$ 4.6
18	all-trans- $\zeta$ -carotene	1.8 $\pm$ 0.0	4.5 $\pm$ 0.1	2.5 $\pm$ 0.0	3.6 $\pm$ 0.1	7.3 $\pm$ 0.3
19	all-trans- $\beta$ -carotene	15.1 $\pm$ 0.5	38.5 $\pm$ 2.4	26.0 $\pm$ 0.4	34.1 $\pm$ 0.4	48.5 $\pm$ 1.4
20	phytofluene	17.1 $\pm$ 1.0	41.5 $\pm$ 1.0	29.5 $\pm$ 0.8	57.2 $\pm$ 0.5	82.0 $\pm$ 3.0
21	phytoene	7.1 $\pm$ 0.3	16.2 $\pm$ 0.3	12.2 $\pm$ 0.8	24.0 $\pm$ 0.0	55.0 $\pm$ 0.3
Total carotenoids		709.4	1169.4	1160.4	1589.5	2194.4

<sup>a</sup> Numbered according to the chromatogram shown in Figure 1; <sup>b</sup> Average and standard deviation of duplicated analyses. n.d.- not detected

Table 2. Carotenoid composition from samples of ethylene treated papaya cv. Solo var. Golden, during ripening.

Peak <sup>a</sup>	carotenoid	concentration ( $\mu\text{g}/100\text{g}$ ) <sup>b</sup>			
		2 $\frac{1}{2}$ days	3 days	4 days	5 days
1	all-trans-neoxanthin	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
2	all-trans-violaxanthin	0.6 $\pm$ 0.0	n.d.	2.1 $\pm$ 0.3	6.4 $\pm$ 0.4
3	cis-violaxanthin	n.d.	n.d.	n.d.	5.6 $\pm$ 0.5
4	anteraxanthin	1.3 $\pm$ 0.1	2.0 $\pm$ 0.7	2.2 $\pm$ 0.2	9.4 $\pm$ 0.6
5	all-trans-lutein	1.8 $\pm$ 0.3	3.2 $\pm$ 0.1	2.5 $\pm$ 0.2	4.1 $\pm$ 0.7
6	lactucaxanthin	0.8 $\pm$ 0.1	1.3 $\pm$ 0.1	1.6 $\pm$ 0.0	3.3 $\pm$ 0.1
7	all-trans-zeaxanthin	n.d.	n.d.	n.d.	4.7 $\pm$ 0.1
8	5,6-epoxy- $\beta$ -cryptoxanthin	5.9 $\pm$ 0.5	8.2 $\pm$ 2.9	7.6 $\pm$ 0.4	14.7 $\pm$ 0.6
9	zeinoxanthin	12.6 $\pm$ 1.2	17.1 $\pm$ 0.6	36.5 $\pm$ 2.1	33.8 $\pm$ 5.7
10	all-trans-rubixanthin	0.6 $\pm$ 0.0	0.7 $\pm$ 0.0	n.d.	1.9 $\pm$ 0.0
11	1,2-epoxy-lycopene	3.3 $\pm$ 0.3	3.3 $\pm$ 0.0	n.d.	2.1 $\pm$ 0.01
12	all-trans- $\beta$ -cryptoxanthin	71.9 $\pm$ 5.5	130.7 $\pm$ 42.8	108.8 $\pm$ 7.4	171.3 $\pm$ 12.9
13	all-trans-lycopene	614.6 $\pm$ 41.0	646.7 $\pm$ 4.2	499.0 $\pm$ 20.2	584.0 $\pm$ 74.6
14	13-cis-lycopene	13.7 $\pm$ 1.0	42.3 $\pm$ 2.3	28.2 $\pm$ 2.3	31.4 $\pm$ 1.6
15	prolycopene	1.7 $\pm$ 0.1	3.0 $\pm$ 0.0	3.5 $\pm$ 0.3	7.3 $\pm$ 0.4
16	all-trans- $\gamma$ -carotene	1.2 $\pm$ 0.1	2.3 $\pm$ 0.0	1.5 $\pm$ 0.1	2.2 $\pm$ 0.1
17	cis- $\zeta$ -carotene	13.1 $\pm$ 1.1	23.4 $\pm$ 0.3	15.0 $\pm$ 0.9	28.0 $\pm$ 1.3
18	all-trans- $\zeta$ -carotene	1.7 $\pm$ 0.1	2.4 $\pm$ 0.0	1.7 $\pm$ 0.1	3.5 $\pm$ 0.1
19	all-trans- $\beta$ -carotene	12.9 $\pm$ 0.5	33.0 $\pm$ 0.7	11.5 $\pm$ 2.1	24.8 $\pm$ 0.3
20	phytofluene	21.5 $\pm$ 1.7	32.8 $\pm$ 0.7	22.6 $\pm$ 1.6	48.0 $\pm$ 0.7
21	phytoene	13.3 $\pm$ 1.4	13.9 $\pm$ 0.4	16.8 $\pm$ 0.5	31.7 $\pm$ 0.3
Total carotenoids		792.5	966.4	761.3	1018.1

<sup>a</sup> Numbered according to the chromatogram shown in Figure 1; <sup>b</sup> Average and standard deviation of duplicated analyses. n.d.-not detected

Table 3. Carotenoid composition from samples of 1-MCP treated papaya cv. Solo var. Golden, during ripening.

Peak <sup>a</sup>	carotenoid	concentration ( $\mu\text{g}/100\text{g}$ ) <sup>b</sup>			
		2 $\frac{1}{2}$ days	3 days	4 days	5 days
1	all-trans-neoxanthin	0.7 $\pm$ 0.03	n.d.	n.d.	n.d.
2	all-trans-violaxanthin	3.9 $\pm$ 0.2	2.4 $\pm$ 0.04	1.5 $\pm$ 0.07	1.4 $\pm$ 0.1
3	cis-violaxanthin	2.3 $\pm$ 0.1	n.d.	n.d.	n.d.
4	anteraxanthin	4.5 $\pm$ 0.4	5.9 $\pm$ 0.2	2.7 $\pm$ 0.02	2.2 $\pm$ 0.2
5	all-trans-lutein	n.d.	3.1 $\pm$ 0.03	3.0 $\pm$ 0.01	1.9 $\pm$ 0.2
6	lactucaxanthin	1.7 $\pm$ 0.2	1.6 $\pm$ 0.03	0.8 $\pm$ 0.05	1.6 $\pm$ 0.1
7	all-trans-zeaxanthin	n.d.	2,9 $\pm$ 0.1	n.d.	n.d.
8	5,6-epoxy- $\beta$ -cryptoxanthin	13.7 $\pm$ 0.5	12.3 $\pm$ 0.1	8.0 $\pm$ 0.04	7.0 $\pm$ 0.4
9	zeinoxanthin	26.9 $\pm$ 0.9	22.0 $\pm$ 0.01	13.3 $\pm$ 0.7	15.8 $\pm$ 0.9
10	all-trans-rubixanthin	0.8 $\pm$ 0.03	1.7 $\pm$ 0.01	n.d.	1.0 $\pm$ 0.04
11	1,2-epoxy-lycopene	3.7 $\pm$ 0.1	3.8 $\pm$ 0.1	4.0 $\pm$ 0.2	3.7 $\pm$ 0.2
12	all-trans- $\beta$ -cryptoxanthin	117.1 $\pm$ 12.7	150.4 $\pm$ 10.1	94.1 $\pm$ 4.8	81.1 $\pm$ 4.3
13	all-trans-lycopene	582.2 $\pm$ 51.6	538.5 $\pm$ 6.6	429.1 $\pm$ 32.4	461.5 $\pm$ 74.7
14	13-cis-lycopene	29.2 $\pm$ 1.3	43.6 $\pm$ 0.1	42.8 $\pm$ 1.3	23.3 $\pm$ 1.5
15	polycopene	n.d.	4.5 $\pm$ 0.04	n.d.	1.4 $\pm$ 0.1
16	all-trans- $\gamma$ -carotene	2.2 $\pm$ 0.2	2.8 $\pm$ 0.03	1.1 $\pm$ 0.2	1.4 $\pm$ 0.04
17	cis- $\zeta$ -carotene	23.3 $\pm$ 5.7	24.5 $\pm$ 0.2	10.2 $\pm$ 5.2	14.1 $\pm$ 0.6
18	all-trans- $\zeta$ -carotene	2.8 $\pm$ 0.3	3.8 $\pm$ 0.02	2.3 $\pm$ 0.5	1.6 $\pm$ 0.04
19	all-trans- $\beta$ -carotene	26.9 $\pm$ 2.4	30.4 $\pm$ 0,5	16.2 $\pm$ 0.4	12.2 $\pm$ 0.4
20	phytofluene	35.9 $\pm$ 5.5	38.27 $\pm$ 0.3	17.77 $\pm$ 6.7	17.61 $\pm$ 0.2
21	phytoene	24.3 $\pm$ 4.7	14.0 $\pm$ 0.7	12.8 $\pm$ 0.5	5.6 $\pm$ 0.5
Total carotenoids		902.7	906.4	659.7	654.5

<sup>a</sup> Numbered according to the chromatogram shown in Figure 1; <sup>b</sup> Average and standard deviation of duplicated analyses. n.d.- not detected