

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

**DEGRADAÇÃO DE  $\beta$ -CAROTENO E CANTAXANTINA EM  
SISTEMA-MODELO DE BAIXA UMIDADE À TEMPERATURA  
AMBIENTE. FORMAÇÃO DE PRODUTOS NÃO-VOLÁTEIS E  
VOLÁTEIS.**

**PARECER**

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por Marisa Padula aprovada pela Comissão Julgadora em 26 de fevereiro de 1999.

Campinas, 26 de fevereiro de 1999

  
Profa. Dra. Délia Rodrigues Amaya  
Presidente da Banca

**Marisa Padula**

Engenheira de Alimentos  
Mestre em Ciência de Alimentos

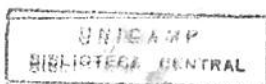
**Profa. Délia Rodriguez-Amaya**

Orientadora

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

Campinas – SP

1999



**BANCA EXAMINADORA**

*Délia R. Amaya*

**DÉLIA RODRIGUEZ-AMAYA (ORIENTADORA)**

*Isabel Cristina Sales Fontes Jardim*

**ISABEL CRISTINA SALES FONTES JARDIM**

*João Bosco Faria*

**JOÃO BOSCO FARIA**

*Maria Regina Bueno Franco*

**MARIA REGINA BUENO FRANCO**

*Paulo Roberto Nogueira Carvalho*

**PAULO ROBERTO NOGUEIRA CARVALHO**

*Felix Guillermo Reyes Reyes*

**FELIX GUILVERMO REYES REYES**

*Helena Teixeira Godoy*

**HELENA TEIXEIRA GODOY**

**Campinas, de fevereiro de 1999.**

*A minha mãe, Gilda,  
com carinho*

*À Victoria, ao Daniel  
e ao Waldir, de  
todo meu coração*

# ÍNDICE

|                               |            |
|-------------------------------|------------|
| <b>Introdução Geral .....</b> | <i>i</i>   |
| <b>Resumo Geral .....</b>     | <i>iii</i> |

## CAPÍTULO 1

### **Degradação de Carotenóides Conhecimentos atuais**

|                                                               |    |
|---------------------------------------------------------------|----|
| Resumo .....                                                  | 2  |
| 1. Introdução .....                                           | 3  |
| 2. Cinética de degradação de carotenóides .....               | 6  |
| 3. Produtos de degradação de carotenóides.....                | 10 |
| 3.1 Produtos de degradação não-voláteis .....                 | 11 |
| 3.2 Produtos de degradação voláteis .....                     | 17 |
| 4. Fatores que influenciam a degradação de carotenóides ..... | 24 |
| 4.1 Estrutura do carotenóide e natureza do sistema .....      | 24 |
| 4.2 Oxigênio .....                                            | 25 |
| 4.3 Luz .....                                                 | 26 |
| 4.4 Atividade de água ou conteúdo de umidade .....            | 27 |
| 4.5 Temperatura .....                                         | 29 |
| 4.6 Antioxidantes e pró-oxidantes .....                       | 30 |
| 5. Considerações finais .....                                 | 30 |
| Abstracts .....                                               | 31 |
| Referências Bibliográficas .....                              | 31 |

## CAPÍTULO 2

### **Cinética de degradação de $\beta$ -caroteno em sistema-modelo de baixa umidade a temperatura ambiente**

|               |    |
|---------------|----|
| Resumo .....  | 40 |
| Summary ..... | 40 |



|                                                                                               |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. Introdução .....                                                                           | 41 |
| 2. Material e Métodos .....                                                                   | 43 |
| 2.1 Material .....                                                                            | 43 |
| 2.2 Métodos .....                                                                             | 43 |
| 2.2.1 Construção do aparelho para oxidação do pigmento .....                                  | 43 |
| 2.2.2 Preparação do sistema-modelo .....                                                      | 45 |
| 2.2.3 Oxidação do $\beta$ -caroteno .....                                                     | 45 |
| 2.2.4 Determinação da isoterma de adsorção de umidade da CMC .....                            | 46 |
| 2.2.5 Determinação da atividade de água ( $A_w$ ) do sistema-modelo .....                     | 46 |
| 2.2.6 Determinação do teor de $\beta$ -caroteno total .....                                   | 46 |
| 2.2.7 Compostos de degradação não-voláteis. Cromatografia líquida de alta<br>eficiência ..... | 47 |
| 3. Resultados .....                                                                           | 47 |
| 3.1 Isoterma de adsorção de umidade e atividade de água .....                                 | 47 |
| 3.2. Cinética de degradação .....                                                             | 49 |
| 3.3 Formação de compostos de degradação não-voláteis .....                                    | 54 |
| 4. Conclusão .....                                                                            | 57 |
| 5. Referências Bibliográficas .....                                                           | 57 |

### CAPÍTULO 3

#### **Degradation of $\beta$ -carotene in a low-moisture model system at ambient temperature. Formation of non-volatile and volatile products.**

|                                                         |    |
|---------------------------------------------------------|----|
| Abstract .....                                          | 62 |
|                                                         | 63 |
| Introduction .....                                      |    |
| Materials and Methods .....                             | 64 |
| Materials .....                                         | 64 |
| Preparation of model system .....                       | 64 |
| Oxidation of $\beta$ -carotene .....                    | 64 |
| Determinations of total $\beta$ -carotene .....         | 65 |
| Identification of non-volatile oxidation products ..... | 66 |
| Identification of volatile oxidation products .....     | 66 |

|                                           |    |
|-------------------------------------------|----|
| Results and Discussion .....              | 67 |
| Degradation of $\beta$ -carotene .....    | 67 |
| Formation of non-volatile compounds ..... | 68 |
| Formation of volatile compounds .....     | 71 |
| References .....                          | 75 |

## CAPÍTULO 4

### Degradação de cantaxantina em sistema-modelo de baixa umidade a temperatura ambiente. Formação de compostos voláteis e não-voláteis.

|                                                                                                                                     |     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Resumo .....                                                                                                                        | 81  |
| Introdução .....                                                                                                                    | 82  |
| Materiais e Métodos .....                                                                                                           | 83  |
| Materiais .....                                                                                                                     | 83  |
| Métodos .....                                                                                                                       | 83  |
| Identificação de compostos de degradação não-voláteis .....                                                                         | 84  |
| Identificação de compostos de degradação voláteis .....                                                                             | 81  |
| Resultados e Discussão .....                                                                                                        | 85  |
| Carotenóide total .....                                                                                                             | 85  |
| Compostos de degradação não-voláteis .....                                                                                          | 87  |
| Compostos de degradação voláteis .....                                                                                              | 90  |
| Referências .....                                                                                                                   | 93  |
| <b>ANEXO I</b> – Espectros de absorção obtidos para os compostos de degradação não-voláteis provenientes do $\beta$ -caroteno ..... | 96  |
| <b>ANEXO II</b> - Espectros de massas obtidos para os compostos de degradação voláteis provenientes do $\beta$ -caroteno .....      | 107 |
| <b>ANEXO III</b> - Espectros de absorção obtidos para os compostos de degradação não-voláteis provenientes da cantaxantina .....    | 117 |
| <b>ANEXO IV</b> - Espectros de massas obtidos para os compostos de degradação voláteis provenientes da cantaxantina .....           | 123 |

## INTRODUÇÃO GERAL

Carotenóides estão largamente distribuídos na natureza e são responsáveis pelas cores amarela, laranja e vermelha de frutas, raízes, flores, peixes, crustáceos, aves, e ainda são encontrados em algas, bactérias, leveduras e fungos.

A importância dos carotenóides extrapola sua importância como pigmento natural. Os carotenóides apresentam funções ou ações biológicas importantes como atividade pró-vitâmica A, fortalecimento do sistema imunológico e decréscimo do risco de doenças degenerativas como câncer, doenças cardiovasculares e formação de catarata. Estes últimos efeitos biológicos são independentes da atividade pró-vitâmica A e têm sido atribuídos às propriedades antioxidantes dos carotenóides, através do seqüestro de oxigênio singlete e desativação de radicais livres.

Os carotenóides são moléculas altamente insaturadas e, portanto, instáveis e susceptíveis à oxidação e isomerização. É conhecido que calor, luz e ácidos induzem a isomerização. A oxidação depende da disponibilidade de oxigênio e é estimulada pela luz, calor, presença de metais, enzimas, peróxidos e é inibida por antioxidantes.

No entanto, os conhecimentos atuais sobre a degradação destes pigmentos são ainda insuficientes e maiores investigações são necessárias para a sua melhor compreensão. As dificuldades para avaliação dos produtos de degradação resultam principalmente das dificuldades analíticas em vista da grande variedade de carotenóides presentes em alimentos e das interações entre componentes. Sistemas-modelos têm sido utilizados para se conhecer os mecanismos e produtos de degradação de carotenóides. Embora um sistema-modelo não reflita a natureza da matriz e a complexidade de interações que ocorrem em alimentos, é uma forma para conhecer de maneira mais simples a degradação de carotenóides e a natureza dos compostos formados.

O presente trabalho teve como objetivo estudar a cinética de degradação de  $\beta$ -caroteno e a formação de compostos voláteis e não-voláteis, em sistema-modelo de baixa umidade, na presença e ausência de luz e à temperatura ambiente (30°C). Foram

consideradas para o estudo, a concentração do pigmento e a atividade de água, que melhor representassem os alimentos desidratados. A temperatura de 30°C foi escolhida para que os passos iniciais da degradação deste pigmento e os compostos voláteis e não-voláteis formados pudessem ser detectados.

A degradação da cantaxantina também foi acompanhada no mesmo sistema e condições, para avaliação dos primeiros passos da degradação de um cetocarotenóide. Como forma de ajudar a elucidar os mecanismos de degradação de carotenóides e a formação de compostos voláteis e não-voláteis, estes resultados foram confrontados com os obtidos na degradação do  $\beta$ -caroteno.

Dada a grande importância de carotenóides como corantes naturais e compostos biologicamente ativos, este é um campo de pesquisa que merece mais interesse e empenho.

## RESUMO GERAL

Corantes naturais responsáveis pela cor atraente de muitos alimentos, os carotenóides ganharam maior destaque mundial com a descoberta das suas funções ou ações biológicas. São compostos insaturados e a sua estabilidade durante o processamento e estocagem de alimentos é uma grande preocupação. Os conhecimentos sobre a degradação de carotenóides são limitados e estudos são necessários para sua melhor compreensão.

No presente trabalho, para simular o comportamento do  $\beta$ -caroteno em alimentos desidratados e constatar os passos iniciais da degradação, foi estudada a sua oxidação em sistema-modelo de baixa umidade, à temperatura ambiente, na presença e ausência de luz. Um aparelho foi especialmente construído para oxidação em condições controladas. O oxigênio foi mantido constante durante todo o experimento, e houve pouca alteração da atividade de água do sistema-modelo. O trabalho foi conduzido à temperatura de 30°C. Os compostos não-voláteis foram identificados por cromatografia líquida de alta eficiência - detector de conjunto de diodos - detector de massas (CLAE-DAD-EM) e reações químicas. Os compostos voláteis foram identificados por cromatografia gasosa-espectrometria de massa (CG-EM). Foram identificados apocarotenóides, epoxicarotenóides e um hidroxicarotenóide, confirmando que a epoxidação, formação de apocarotenóides e hidroxilação constituem os primeiros passos para a degradação, a última sendo mostrada apenas recentemente. A fragmentação levou à formação de compostos voláteis e foram identificados aldeídos, cetonas e álcoois, de dois a 10 carbonos. Com exceção de  $\beta$ -ciclocitral, estes compostos de baixa massa molecular são acíclicos e vieram da cadeia poliênica. Isso difere dos resultados até então publicados que apontam os anéis terminais como produtos da fragmentação. Outros compostos cíclicos foram constatados como consequência da termodegradação. Mecanismos para a hidroxilação, formação de apocarotenóides e as fragmentações foram sugeridos.

A cinética de degradação do  $\beta$ -caroteno, na presença e ausência de luz, foi também acompanhada. Na ausência de luz foi observada curva típica de reação de radicais livres, tendo períodos de indução, propagação e terminação. A reação seguiu uma cinética de primeira ordem após o período de indução. Na presença de luz, não foi observado o período de indução e uma cinética de ordem zero foi a que melhor se adequou. O  $\beta$ -caroteno

encapsulado mostrou grande estabilidade, apresentando um período de indução de 120 dias na ausência de luz, porém, degradando rapidamente após este período. Mesmo na presença de luz, o  $\beta$ -caroteno encapsulado encontrou-se ainda no período de indução após 51 dias.

A degradação da cantaxantina foi estudada também em sistema modelo de baixa umidade, à temperatura ambiente, na presença e ausência de luz. A cantaxantina mostrou-se mais estável que o  $\beta$ -caroteno. Após 75 dias de oxidação na ausência de luz, a degradação estava apenas se iniciando. Na presença de luz, a degradação começou após 22 dias. Foram identificados, como produtos de degradação não-voláteis, três apocarotenóides e um *cis*-isômero. A fragmentação levou a formação de alguns compostos voláteis, dos quais três foram identificados, dois aldeídos e um álcool. Estes compostos por serem encontrados também na degradação do  $\beta$ -caroteno confirmaram sua origem na cadeia poliênica e não nos anéis terminais.

## CAPÍTULO 1

### REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

# **DEGRADAÇÃO DE CAROTENÓIDES. CONHECIMENTOS ATUAIS**

Trabalho a ser enviado à Revista de Farmácia e Bioquímica da Universidade de São Paulo.

## DEGRADAÇÃO DE CAROTENÓIDES. CONHECIMENTOS ATUAIS

Marisa Padula\*, Délia Rodriguez-Amaya\*\*

Corantes naturais responsáveis pela cor atraente de muitos alimentos, os carotenóides ganharam maior destaque mundial com a descoberta das suas funções ou ações biológicas. No entanto, por serem compostos altamente insaturados, a sua estabilidade durante processamento e estocagem de alimentos é uma grande preocupação. Tanto a isomerização como a oxidação ocorrem, mas a última é a principal causa de perda de carotenóides. Conhecimentos atuais sobre a degradação são ainda limitados e maiores investigações são necessárias para a sua melhor compreensão. Para tal, é de fundamental importância o isolamento e a elucidação estrutural dos produtos iniciais, intermediários e finais da oxidação. Em geral, os estudos apontam uma cinética de degradação de primeira ordem, embora alguns autores relatem uma cinética de ordem zero. Os primeiros passos envolvem a formação de epoxicarotenóides e apocarotenóides. Mais recentemente, a hidroxilação também foi constatada. Fragmentações subseqüentes levam à perda completa de cor e da atividade biológica, com formação de compostos voláteis (de baixa massa molecular) que podem contribuir positiva ou negativamente ao sabor do alimento. Os principais fatores que influenciam a oxidação dos carotenóides são: estrutura do carotenóide e natureza da matriz alimentícia, disponibilidade de oxigênio, presença de luz, atividade ou conteúdo de água, presença de antioxidantes e pró-oxidantes e temperatura.

**Unitermos:** carotenóides, degradação, cinética, produtos não-voláteis, produtos voláteis.

\* Instituto de Tecnologia de Alimentos. Av. Brasil, 2880 – Campinas – SP – CEP: 13.073-001

\*\* Departamento de Ciência de Alimentos – Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP – Barão Geraldo – Campinas – SP – CEP: 13.083-970



## 1. INTRODUÇÃO

Carotenóides são pigmentos naturais amplamente distribuídos na natureza e são responsáveis pelas cores amarela, laranja e vermelha de frutas, flores, raízes, peixes, crustáceos e aves. São também encontrados em algas, bactérias, fungos e leveduras.

Nas plantas os carotenóides ocorrem universalmente nos cloroplastos, embora a clorofila mascare a sua presença. Estão também presentes nos cromoplastos e assim são responsáveis pelas cores amarela, laranja e vermelha de frutas e flores. Apesar de não ser muito comum, os carotenóides estão presentes em raízes, como cenoura e batata doce, e mesmo em grãos como milho.

Em animais são responsáveis pela cor da pele de frango e da gema do ovo. Também conferem a cor rosada ao salmão e à truta. Em camarão e lagosta e outros crustáceos, estão associados a proteínas, formando complexos que são verdes, azuis ou roxos. No cozimento, com a desnaturação da proteína, a cor vermelha é revelada.

A estrutura básica do carotenóide é simétrica, linear, com 40 carbonos, formada a partir de 8 unidades isoprênicas de 5 carbonos e ligados de tal maneira que a ordem é invertida no centro da molécula. Os dois grupos metilas laterais, próximos ao centro, são separados por 6 átomos de carbono e os outros por 5 átomos de carbono. O extenso sistema de duplas ligações conjugadas é responsável pelas propriedades especiais, ações e funções dos carotenóides. O esqueleto básico pode ser modificado de várias maneiras como hidrogenação, dehidrogenação, ciclização, migração de duplas ligações, extensão ou diminuição da cadeia, rearranjo, isomerização, introdução do oxigênio ou a combinação destes processos, resultando em uma grande diversidade de estruturas.

Os carotenóides que contêm somente carbono e hidrogênio são chamados de carotenos. Os carotenóides, que também contêm oxigênio, são chamados de xantofilas. Os grupos funcionais mais comuns são hidroxilas (-OH) e epóxidos (5,6- ou 5,8-), embora grupos aldeídicos, cetônicos, carboxílicos e outros também sejam encontrados.

Os carotenóides podem ser acíclicos como o licopeno, monocíclicos como o  $\gamma$ -caroteno ou bicíclicos como o  $\beta$ -caroteno. A ciclização ocorre em uma ou nas duas extremidades da molécula, formando um ou dois anéis de 6 carbonos. Ocasionalmente, podem ser encontrados anéis de 5 carbonos.

Os carotenóides apresentam importantes propriedades físico-químicas como: absorver luz, sequestrar oxigênio singlete, bloquear reações de radicais livres. São lipofílicos (insolúveis em água), facilmente isomerizados e oxidados, e podem se ligar a superfícies hidrofóbicas.<sup>56</sup>

Além da sua importância como pigmento natural, os carotenóides apresentam funções biológicas importantíssimas: atividade pró-vitáminica A, fortalecimento do sistema imunológico, diminuição do risco a doenças degenerativas como câncer, doenças cardiovasculares, degeneração macular e formação de catarata.

A atividade pró-vitáminica A dos carotenóides é conhecida há muito tempo. Entre os mais de 600 carotenóides já conhecidos, é estimado que 50 destes possuam alguma atividade pró-vitáminica A. O carotenóide mais importante neste sentido é o  $\beta$ -caroteno, por sua maior bioatividade e ampla distribuição na natureza.

Estruturalmente, a vitamina A é a metade de uma molécula do  $\beta$ -caroteno, com adição de uma molécula de água na cadeia lateral. Portanto, o  $\beta$ -caroteno tem 100% de atividade de pró-vitamina A. Para um carotenóide ter atividade pró-vitáminica A, é necessário ter um anel  $\beta$ -ionona não substituído ligado a uma cadeia poliênica de 11 carbonos. Carotenóides acíclicos e carotenóides com os  $\beta$ -anéis substituídos não apresentam esta propriedade. Carotenóides com substituição em um só anel, possuem a metade da bioatividade do  $\beta$ -caroteno.<sup>56</sup>

Vários pesquisadores como MATHEWS-ROTH<sup>38</sup>, KRINSKY<sup>30,31</sup>, BYERS e PERRY<sup>9</sup>, entre outros, têm atribuído aos carotenóides outras funções biológicas. Estas funções são independentes da atividade de pró-vitamina A e têm sido relacionadas à capacidade antioxidante dos carotenóides, através das propriedades de desativação dos radicais livres e seqüestro do oxigênio singlete.<sup>29, 44</sup>

A habilidade dos carotenóides em seqüestrar oxigênio singlete é devida ao sistema de duplas ligações conjugadas e a maior proteção é dada por aqueles que têm nove ou mais ligações duplas conjugadas. Segundo di MASCIO *et al.*<sup>14</sup> o licopeno se mostrou mais efetivo que o  $\beta$ -caroteno no seqüestro do oxigênio singlete. Foi demonstrado também por TERAOKA<sup>68</sup> que astaxantina e cantaxantina são melhores antioxidantes que  $\beta$ -caroteno.

Considerando as importantes ações e funções dos carotenóides, a sua retenção durante processamento e estocagem de alimentos deve ser um objetivo fundamental.

Por serem moléculas altamente insaturadas, os carotenóides são vulneráveis à oxidação e isomerização. Calor, luz e ácidos favorecem a isomerização de *trans*-carotenóides, configuração usual na natureza, para a forma *cis*. A oxidação, principal causa da perda de carotenóides, é estimulada pela luz, calor, enzimas, presença de metais e peróxidos. As conseqüências imediatas são a diminuição da cor e do valor nutricional, e eventualmente, a perda total dos carotenóides.

A degradação de carotenóides durante a estocagem de alimentos foi muito pouco estudada em comparação com os efeitos de diversos processamentos sobre estes pigmentos.

As dificuldades da avaliação dos produtos de degradação resultam principalmente das dificuldades analíticas em vista da grande variedade de carotenóides presentes em alimentos e das interações entre componentes.

Portanto, para se conhecer os mecanismos, produtos de degradação e fatores que influenciam a degradação de carotenóides, sistemas-modelos têm sido utilizados. A extrapolação dos resultados para alimentos, contudo, não é direta. Um sistema-modelo não reflete a natureza da matriz e a complexidade de interações que ocorrem em alimentos. Porém, é uma forma simples para o conhecimento da degradação de carotenóides e identificação de compostos formados.

## 2. CINÉTICA DE DEGRADAÇÃO DE CAROTENÓIDES

A cinética de degradação do  $\beta$ -caroteno e de outros carotenóides foi estudada por vários pesquisadores em sistemas-modelos secos ou líquidos, e mesmo em alimentos desidratados.

Os sistemas-modelos secos, simulando alimentos desidratados, consistiam no pigmento adsorvido, na maioria das vezes, em celulose microcristalina (CMC). A velocidade de descoloração do  $\beta$ -caroteno ou outro carotenóide foi medida geralmente pela diminuição da absorção a 450-470nm.

Em geral, a cinética de degradação para o  $\beta$ -caroteno em sistemas-modelos secos foi de primeira ordem ou pseudo primeira ordem.<sup>3, 12, 50, 63, 67.</sup>

A constante de velocidade de degradação ( $k$ ) decrescia com a diminuição do oxigênio disponível, porém a ordem de reação não se alterava<sup>3, 67.</sup> Por outro lado, com o aumento da atividade de água ( $a_w$ ), o valor de  $k$  diminuía, embora a ordem da reação permanecesse a mesma<sup>12, 50.</sup>

BALOGH *et al.*<sup>3</sup>, comparando a degradação do  $\beta$ -caroteno em sistemas-modelos com e sem sulfito, também obtiveram cinética de primeira ordem. A presença de sulfito reduziu significativamente a velocidade de degradação, aproximadamente 4, 10 e 8 vezes para as atividades de água de 0,11, 0,31 e 0,51, respectivamente, sem alterar, contudo, a forma da curva de degradação.

CHOU e BREENE<sup>12</sup> registraram um aumento na velocidade de reação de aproximadamente sete vezes devido ao aumento da temperatura de 5 para 35°C. BALOGH *et al.*<sup>3</sup> relataram um aumento de 100% no valor de  $k$ , com o aumento de temperatura de 37 para 50°C.

Alguns autores detectaram a presença de um período de indução na degradação do  $\beta$ -caroteno em sistemas-modelos. CHOU e BREENE<sup>12</sup> observaram um aumento do período de indução com uso do antioxidante hidroxitolueno butilado (BHT). Porém, após este

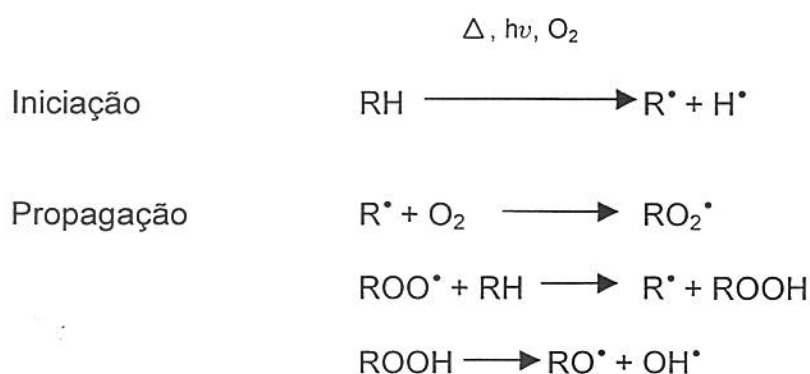
período as constantes de velocidade foram semelhantes para os sistemas-modelos com e sem BHT.

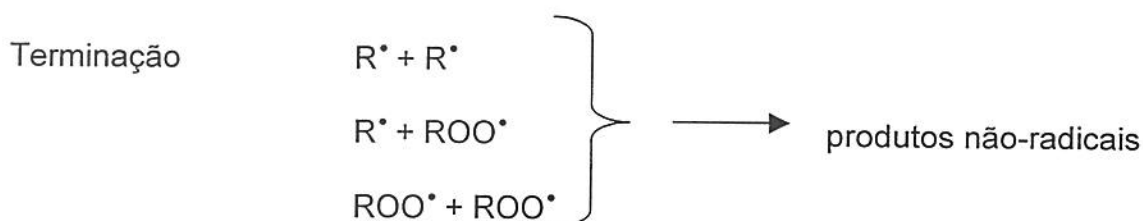
STEFANOVICH e KAREL<sup>63</sup> estudaram a degradação de  $\beta$ -caroteno em sistemas-modelos, com CMC, a concentrações entre 0,1 e 1,0mg/g e a temperaturas entre 60 e 80°C, simulando as condições encontradas durante a secagem de alimentos. Obtiveram uma curva com formato sigmoidal para a degradação do  $\beta$ -caroteno com o tempo. A extensão do período de indução dependia da concentração do pigmento.

Estes autores também estudaram alguns alimentos desidratados (abóbora, batata doce e milho) e concluíram que a cinética de primeira ordem se ajustava bem para estes produtos nas temperaturas estudadas. Os valores de  $k$  para os alimentos estudados foram bastante inferiores aos determinados nos sistemas-modelos, mais de 10 vezes, dependendo da temperatura.

A curva de degradação com formato sigmoidal, com três regiões (períodos de indução, propagação e terminação) foi observada também por GOLDMAN *et al.*<sup>22</sup>, quando avaliaram a descoloração do  $\beta$ -caroteno em sistema-modelo com CMC, a atividades de água variando entre seco e 0,84, e disponibilidade de  $O_2$  entre 0 e 20,9%, à temperatura de 35°C. Este formato de curva com as três regiões é típico de reações autocatalíticas. Antioxidantes retardavam a reação, enquanto a presença de radicais (como 2,2'-azo-bisisobutiro nitrila) acelerava a reação. GOLDMAN *et al.*<sup>22</sup> concluíram que a degradação do  $\beta$ -caroteno seguia um processo de radicais livres.

Baseados na teoria da formação de peróxidos, estes autores resumiram o mecanismo de oxidação do  $\beta$ -caroteno como:





Onde RH é o  $\beta$ -caroteno.

É importante ressaltar que a presença do período de indução na degradação do  $\beta$ -caroteno não é um consenso entre os pesquisadores.

SAGUY *et al.*<sup>59</sup> desenvolveram um modelo matemático/cinético para prever a degradação de  $\beta$ -caroteno, simulando o que ocorre na estocagem de alimentos desidratados. Este modelo baseou-se nos dados obtidos por GOLDMAN *et al.*<sup>22</sup> e foi estendido para prever a perda do  $\beta$ -caroteno em condições dinâmicas. Segundo os autores, os resultados mostraram uma excelente concordância quando um fator de correção apropriado foi aplicado. Este fator foi requerido para compensar diferentes geometrias que afetam a difusão do oxigênio.

A cinética de degradação de  $\beta$ -apo-8'-carotenal e cantaxantina em sistemas-modelos com CMC, à temperatura de 25°C e atividade de água entre seco e 0,75, foi avaliada por RAMAKRISHNAN e FRANCIS.<sup>50</sup> Para os dois pigmentos, a degradação acompanhou a cinética de primeira ordem. Os valores de  $k$ , quando comparados ao do  $\beta$ -caroteno, foram menores para a cantaxantina, mostrando ser este pigmento mais estável. O aumento da atividade de água diminuiu a velocidade de degradação dos dois pigmentos, como observado para o  $\beta$ -caroteno.

A cinética de primeira ordem ou pseudo primeira ordem foi observada também para a degradação de pigmentos em outros alimentos desidratados.<sup>4, 5, 34, 71</sup>

Os valores de  $k$  determinados por MARTINEZ e LABUZA<sup>34</sup> para salmão liofilizado, à temperatura de 37°C foram da ordem de 0,1 a  $1,1 \times 10^{-3} \text{ hr}^{-1}$ , dependendo da atividade de água. Demonstraram também que o valor de  $k$  decrescia com o aumento da umidade e atividade de água.



Em flocos de batata doce desidratados, a velocidade de degradação do  $\beta$ -caroteno ligado a lipídeos foi 100 vezes menor que a do  $\beta$ -caroteno exposto na superfície dos lipídeos. Porém em ambos os casos, a cinética de degradação foi de primeira ordem.<sup>71</sup>

Para cenoura submetida a vários tratamentos antes da desidratação, a cinética de degradação dos carotenóides durante a estocagem a 37°C foi de primeira ordem.<sup>5</sup>

ALONSO *et al.*<sup>1</sup> e TSIMIDOU e BILIADERIS<sup>69</sup> concordaram que a degradação do pigmento do açafrão (crocin) desidratado segue cinética de primeira ordem. Estes últimos autores mostraram também que a constante da velocidade de degradação aumentava com o aumento da temperatura de estocagem. Porém, ao contrário dos outros autores, relataram que o aumento da atividade de água aumentava a velocidade de degradação, justificando este aspecto pela alta solubilidade do crocin em água.

A cinética de pseudo primeira ordem, segundo MINGUEZ-MOSQUERA e GANDUL-ROJAS,<sup>40</sup> foi o modelo que melhor descreveu, em azeitonas verdes, a transformação das xantofilas com grupo 5,6-epóxido (violaxantina e neoxantina) para seus derivados 5,8-epóxido correspondentes (auroxantina e neocromo). A reação aconteceu em meio ácido e os valores de  $k$  obtidos variaram de  $-0,0257$  a  $-0,0651 \text{ dia}^{-1}$  para violaxantina e de  $0,0303$  a  $0,0685 \text{ dia}^{-1}$  para a neoxantina, dependendo do processo de fermentação utilizado (mais rápido ou lento).

Em sistemas-modelos aquosos, a fotodegradação de  $\beta$ -caroteno foi acompanhada por PESEK e WARTHESEN.<sup>48</sup> Encontraram cinética de primeira ordem e constante de velocidade de  $0,040 \pm 0,005 \text{ dia}^{-1}$  para a fotodegradação de todas as formas de  $\beta$ -caroteno.

Para  $\beta$ -caroteno em dispersões aquosas, com diferentes matrizes (gelatina/açúcar e goma acácia/açúcar), estes mesmos autores<sup>47</sup> encontraram a mesma ordem de reação para as diversas temperaturas estudadas e estado físico da dispersão. Como esperado, a degradação dos sistemas expostos à luz foi maior.

MINGUEZ-MOSQUERA e JAREN-GALAN<sup>39</sup> também constataram cinética de primeira ordem para os pigmentos  $\beta$ -caroteno, capsantina e capsantina diesterificada em sistemas

modelos aquosos, estocados em diversas temperaturas, na presença e na ausência de luz.

Para os carotenóides licopeno,  $\alpha$ -caroteno e  $\beta$ -caroteno em sucos vegetais e pigmentos do açafrão em extrato aquoso, mais uma vez a cinética de degradação acompanhou a prevista para reações de primeira ordem, nas temperaturas estudadas e em presença ou não de luz.<sup>46, 70</sup>

Ao contrário do observado até aqui, KANASAWUD e CROUZET<sup>27</sup> encontraram cinética de ordem zero para a degradação de  $\beta$ -caroteno em água, à temperatura de 97°C em presença de ar ou oxigênio. Justificaram este resultado como um indicativo que o oxigênio estava presente em excesso.

Para  $\beta$ -caroteno nos solventes tolueno, aquecido a 60°C, e ciclohexano e etanol absoluto, aquecidos a temperaturas entre 15 e 45°C, a cinética de reação de ordem zero foi a que melhor se adequou em todos os casos estudados, inclusive na presença e ausência de luz.<sup>16, 39</sup>

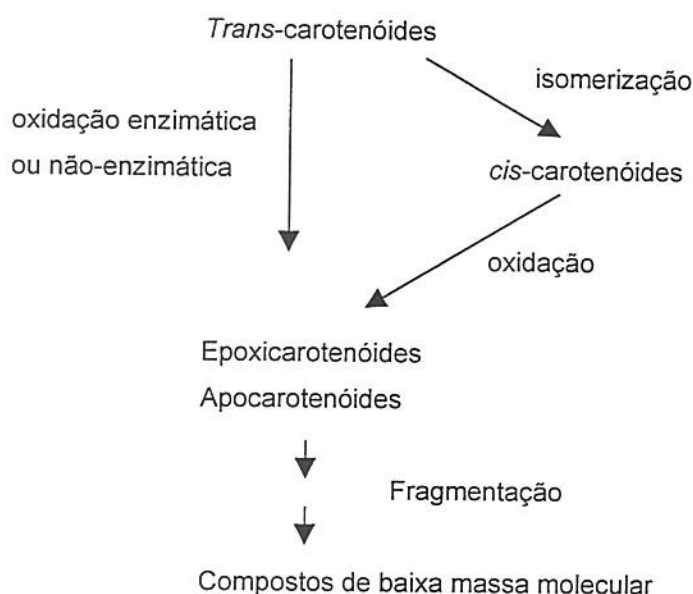
### 3. PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO DE CAROTENÓIDES

Os produtos de degradação dos carotenóides formados durante processamento e estocagem são pouco estudados. As dificuldades analíticas encontradas na análise dos alimentos, onde a composição dos carotenóides é complexa e há interações com os demais constituintes, tornam este estudo complicado. Soma-se a isto o fato de que vários produtos de degradação podem ser encontrados como constituintes naturais em diversos alimentos.

A formação dos produtos de degradação tem sido então acompanhada em sistemas-modelos com condições controladas e a identificação dos compostos formados tem sido feita aliando-se os métodos clássicos, cromatografia em coluna clássica, cromatografia em camada delgada, espectrometria ultra-violeta/visível e reações químicas, com técnicas mais avançadas como cromatografia líquida de alta eficiência, cromatografia gasosa de alta resolução, espectrometria de massa (EM) e ressonância magnética nuclear (RMN), entre outros.



Ao contrário da oxidação de lipídeos, os diversos passos na oxidação de carotenóides ainda não estão bem delineados. RODRIGUEZ-AMAYA<sup>57</sup> reuniu o que é conhecido até o momento (Figura 1).



**FIGURA 1.** Esquema de degradação de carotenóides. (Referência: RODRIGUEZ-AMAYA<sup>57</sup>)

### 3.1 Produtos de degradação não-voláteis

Há consenso entre os pesquisadores que os primeiros compostos formados na degradação de carotenóides são os epóxidos e os apocarotenais.

A Tabela I apresenta um resumo dos vários compostos de degradação formados pela oxidação do  $\beta$ -caroteno em diversos meios e condições de temperatura, disponibilidade de oxigênio e luz. Normalmente, foram utilizadas condições drásticas, altas temperaturas e oxigênio puro. Pela sua importância e maior facilidade na obtenção do pigmento puro, o  $\beta$ -caroteno é o mais estudado.

Segundo CHICHESTER e McFEETERS<sup>11</sup>, o ataque inicial do oxigênio ao pigmento parece ser na posição 5,6 ou 5',6' ou em ambas, em carotenóides que possuam o anel  $\beta$ -ionona, os quais são facilmente convertidos para 5,8 ou 5',8'-furanóxidos. A ligação dupla terminal possui alta densidade eletrônica e parece que a consequência lógica é que a reação de epoxidação ocorra preferencialmente nesta dupla ligação.

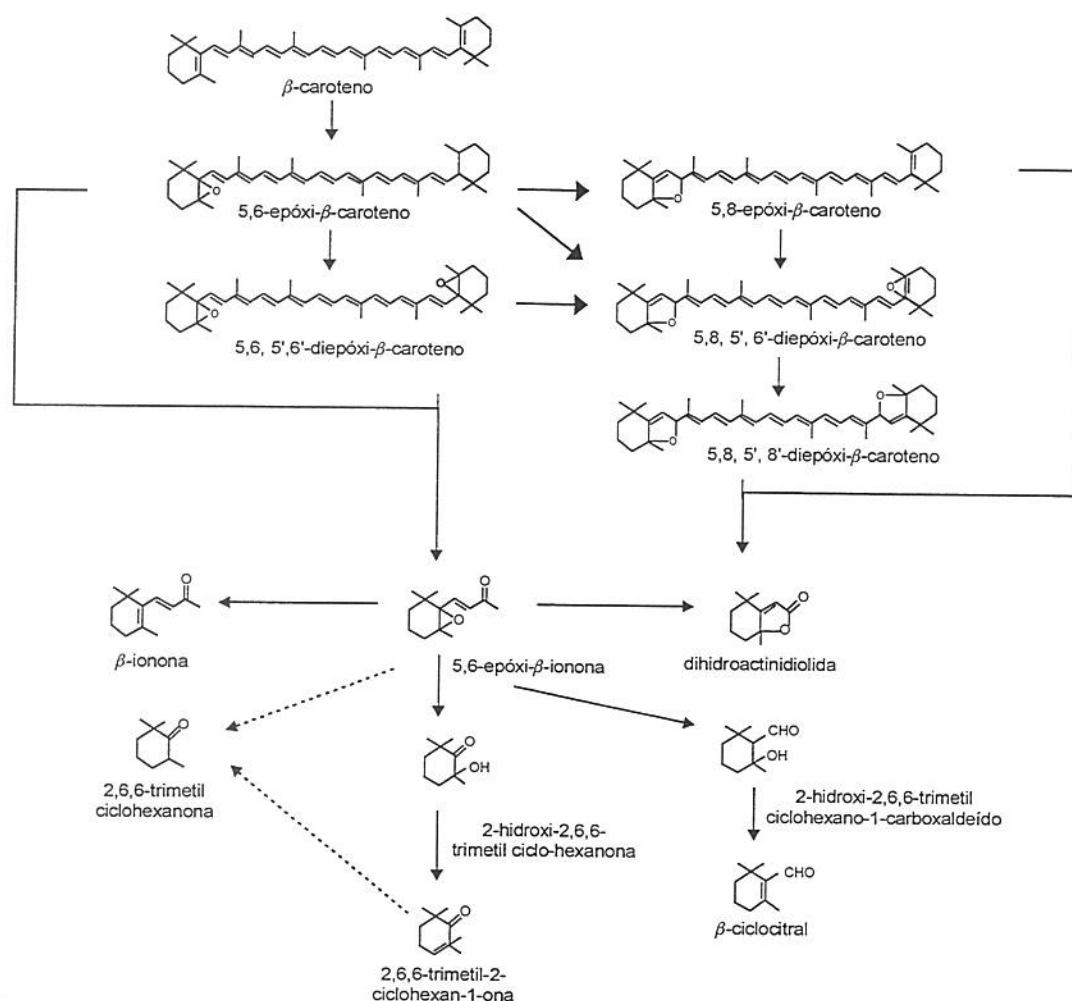
**TABELA I.** Compostos não voláteis formados na degradação de  $\beta$ -caroteno em sistemas-modelos.

| Referência                          | Condições utilizadas                                                          | Crítérios de identificação                                           | Compostos identificados                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
|-------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| EL TINAY e CHICHESTER <sup>16</sup> | $\beta$ -caroteno em benzeno a 60°C, sem luz, 3 horas                         | Valor de Rf, espectro UV-visível, teste epifásico                    | 5,6-monoepóxido, isômero do 5,6-monoepóxido, 5,6, 5',6'-diepóxido, 5,8-monoepóxido, isômero do 5,8-monoepóxido, 5,8, 5',8'-diepóxido e polieno carbonil                                                                                                                                                                                                                                         |
| OUYANG <i>et al.</i> <sup>43</sup>  | Óleo de dendê 210°C / 4 horas a vácuo (4-6 mm Hg)                             | CCD, CL, CLAE, EM, IV                                                | $\beta$ -apo-13-carotenona, $\beta$ -apo-15-carotenal e $\beta$ -apo-14'-carotenal                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
| MARTY e BERSET <sup>35</sup>        | $\beta$ -caroteno 180°C / 2 horas sem luz                                     | Espectro UV-visível, reações químicas, EM e EM com ionização química | 5,6-monoepóxido, 5,6, 5',6'- diepóxido e 5,8-epóxido                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
| MARTY e BERSET <sup>36</sup>        | $\beta$ -caroteno 180°C / 50sec extrusão, velocidade rosca: 150rpm            | CLAE, espectro UV-visível, IV, EM e EM com ionização química         | 13, 13' di- <i>cis</i> - $\beta$ -caroteno, 9,13-di- <i>cis</i> - $\beta$ -caroteno, 15- <i>cis</i> , 13- <i>cis</i> , 9,9' di- <i>cis</i> - e 9- <i>cis</i> - $\beta$ -caroteno<br>$\beta$ -apo-15-carotenal, $\beta$ -apo-14'-carotenal, 5,8,5', 8'- diepóxido- $\beta$ -caroteno, $\beta$ -apo-12'-carotenal, $\beta$ -apo-8'- carotenal, $\beta$ -apo-10'-carotenal, $\beta$ -caroten-4-ona |
| PESEK <i>et al.</i> <sup>49</sup>   | $\beta$ -caroteno em solvente 45°C / 28 dias em ausência de luz               | CLAE, espectro UV-visível, comparação com resultados publicados      | 9- <i>cis</i> - $\beta$ -caroteno e 13- <i>cis</i> - $\beta$ -caroteno                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| KANASAWUD e CROUZET <sup>27</sup>   | 97°C / 3h, $\beta$ -caroteno em água, ausência de luz                         | CCD, espectro UV-visível, RMN                                        | 5,6-epóxi- $\beta$ -caroteno, neo-T-5,6,5', 6'-diepóxi- $\beta$ -caroteno, mutacromo, aurocromo                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| ONYEWU <i>et al.</i> <sup>41</sup>  | $\beta$ -caroteno em glicerol 210°C / 4h, com N <sub>2</sub>                  | CL, CCD, espectro UV-visível, IV, EM                                 | 3,7,10-trimetil-1,12-bis-(2,6,6-trimetil ciclohex-1-enil) dodeca-1,3,5,7,9,11-hexaeno<br>3,6-dimetil-1,8-bis-(2,6,6-trimetil ciclohex-1-enil)-octa-1,3,5,7-tetraene                                                                                                                                                                                                                             |
| ONYEWU <i>et al.</i> <sup>42</sup>  | $\beta$ -caroteno em glicerol 210°C, 4 horas, 1 hora, 15 e 5 minutos          | CL, CCD, CLAE, IV, EM                                                | 3,7,10-trimetil-1,12-bis - (2,6,6-trimetil-ciclohexan-1-enil)-dodeca - 1,3,5,7,9,11 - hexaeno; 3,7-dimetil-8-toluenil-1-(2,6,6-trimetil-ciclohex-1-enil)-octa-1,3,5,7-tetraeno; $\beta$ -apo-13-carotenal; dihidroactinidiolida; 2-hidroximetil-1,3,3-trimetil-1,2-ciclohexanodiol; $\beta$ -apo-14-carotenol e 1-(2,6,6-trimetil-ciclohex-1-enil)-3-hidroxi-2-butanona                         |
| BYERS <sup>8</sup>                  | $\beta$ -caroteno em n-dodecano ou hexano 170-200°C, 15-18 horas e 1 a 5 dias | CLAE, EM, GC/EM, RMN                                                 | 1,12-bis-(2,6,6-trimetil-ciclohex-1-enil)-3,6,10-trimetil-dodeca-1,3,5,7,9,11-hexaeno; 1,12-bis-(2,6,6-trimetil-ciclohex-1-enil)-3,7-dimetil-dodeca-1,3,5,7,9,11-hexano; 1,6-bis-(2,6,6-trimetil-ciclohex-1-enil)-3-metil-hexa-1,3,5-trieno e 1,6-bis-(2,6,6-trimetil-ciclohex-1-enil)-hexa-1,3,5-trieno                                                                                        |

UV = ultra-violeta, CLAE= cromatografia líquida de alta eficiência, IV= infravermelho, EM= espectrometria de massa  
RMN= ressonância magnética nuclear, CCD = cromatografia em camada delgada, CL = cromatografia líquida (clássica)

De acordo ainda com CHICHESTER e McFEETERS<sup>11</sup>, assumindo um mecanismo de radicais livres para a degradação dos carotenóides, cada porção da molécula inicialmente oxidada pode ser reoxidada para fragmentos menores e de grande diversidade, tornando a identificação dos compostos formados bastante complexa.

Os epóxidos são os primeiros compostos de degradação formados e como mostra a Tabela I, são identificados praticamente em todos os estudos que abordam a degradação de  $\beta$ -caroteno e mesmo outros carotenóides como a criptoxantina.<sup>51</sup> A seqüência sugerida para formação dos epóxidos, segundo MARTY e BERSSET<sup>35</sup> e KANASAWUD e CROUZET<sup>27</sup>, é mostrada na Figura 2. Estes últimos autores sugeriram também os epóxidos como precursores de produtos de degradação voláteis, o que será abordado, em detalhe, posteriormente.



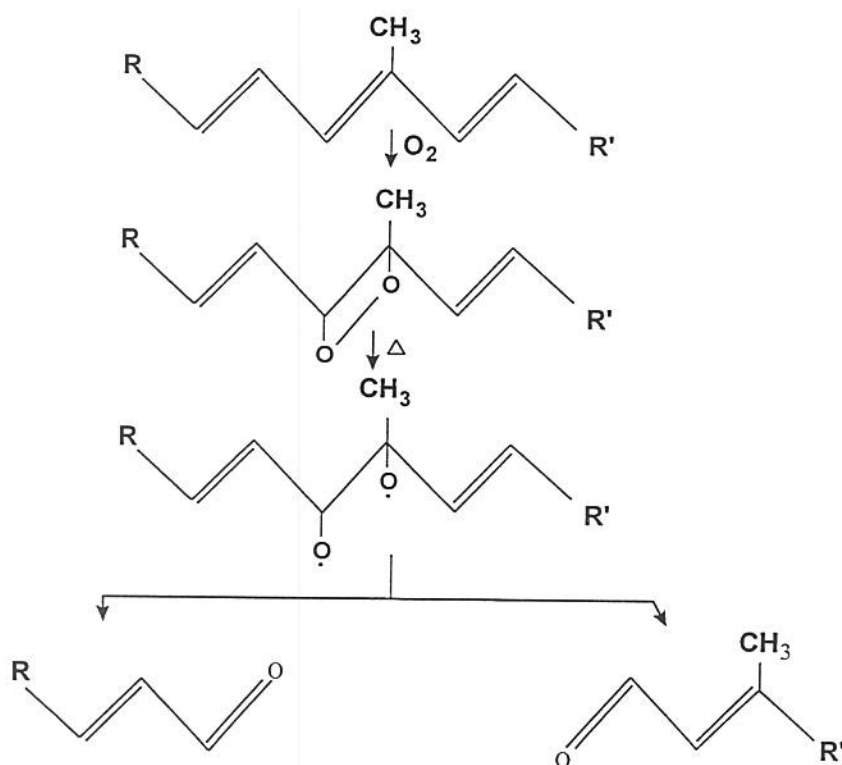
**FIGURA 2.** Formação de compostos voláteis e não-voláteis a partir da degradação de  $\beta$ -caroteno. (Referências: MARTY e BERSSET<sup>35</sup>; KANASAWUD e CROUZET<sup>27</sup>).

MARTY e BERSET<sup>37</sup>, estudando a degradação de  $\beta$ -caroteno em diversas condições, como aquecimento a 180°C/2h, a 180°C por 2 horas com circulação forçada de ar, em condições simulando o processo de extrusão e durante a extrusão em si, simulando o processo de extrusão de alimentos, constataram a formação de diversos apocarotenais, entre outros produtos de degradação.  $\beta$ -Apo-8'-carotenal e  $\beta$ -apo-10'-carotenal apareceram em todos os tratamentos. Os demais ( $\beta$ -apo-12'-carotenal,  $\beta$ -apo-14'-carotenal e  $\beta$ -caroten-4-ona) de cadeia mais curta também se formaram, com a maior severidade dos tratamentos.

Segundo PULLMANN conforme citado por MARTY e BERSET<sup>37</sup>, a ligação  $C_7 = C_8$  possui um alto índice de mobilidade, calculado pelo método de orbitais moleculares, o que favorece a quebra desta ligação e formação do  $\beta$ -apo-8'-carotenal. MARTY e BERSET<sup>37</sup> levantaram a hipótese que os demais apocarotenais apareceriam por quebras sucessivas da cadeia, do final para o centro da molécula, sem contudo apresentar nenhuma evidência, mesmo porque estas autoras não estudaram produtos voláteis. Especularam ainda que a quebra oxidativa das duplas ligações do  $\beta$ -caroteno levaria à formação de dois fragmentos, por exemplo,  $\beta$ -apo-8'-carotenal e  $\beta$ -ciclocitral;  $\beta$ -apo-10'-carotenal e  $\beta$ -ionona.

MARTY e BERSET<sup>37</sup> não descartaram a possibilidade de ataque direto a todas as duplas ligações, em particular na posição  $C_{15} = C_{15'}$ , pois  $\beta$ -apo-15-carotenal foi detectado após todos os tratamentos realizados, independente da agressividade de cada um. Estas autoras mostraram também, na avaliação dos produtos de degradação, que os derivados oxidados são intermediários no processo de degradação térmica do  $\beta$ -caroteno.

OUYANG *et al.*<sup>43</sup>, simulando a desodorização comercial de óleo de dendê (aquecimento a 210°C por 4 horas, a vácuo de 4-6 mm Hg), encontraram como produto de degradação dois apocarotenais e um apocarotenona (cetocarotenóide), conforme mostrado na Tabela I, com uso de espectroscopia de infravermelho e espectrometria de massas. Sugeriram que a formação dos compostos carbonílicos a partir do  $\beta$ -caroteno, se dá pelo ataque do oxigênio nas posições  $C_{13} = C_{14}$ ,  $C_{15} = C_{15'}$  e  $C_{14'} = C_{13'}$  e que o mecanismo dioxetano de Ohloff's poderia explicar a formação destes compostos (Figura 3).



**FIGURA 3.** Formação de compostos carbonílicos a partir de  $\beta$ -caroteno. (Referência: OUYANG *et al.* <sup>43</sup>)

A possibilidade de formação de hidroxicarotenóides durante a degradação do  $\beta$ -caroteno foi sugerida por MARTY e BERSET<sup>36</sup>, durante a simulação do processo de extrusão. Porém, algumas considerações devem ser feitas.

A identificação destes compostos foi baseada na massa molecular obtida por espectrometria de massas, absorção máxima nas regiões ultra-violeta/visível e reações químicas, quanto à presença de grupos epóxidos, carbonilas e hidroxí. Os dois compostos hidroxilados foram tentativamente identificados como *trans*- $\beta$ -caroteno-3,3'-diol ou zeaxantina e *trans*- $\beta$ -caroteno-3-ol, 5,8,5',8'-diepóxido ou *trans*- $\beta$ -caroteno-4-ol, 5,8,5',8'-diepóxido. Segundo as autoras, este último composto deveria ser analisado por ressonância magnética nuclear para identificar corretamente a posição do grupo hidroxílico. Apesar da reação positiva para desidratação, que é específica para hidroxila na posição alílica, as autoras identificaram o primeiro composto como zeaxantina, com grupos hidroxílicos em posições não-alílicas.

KANASAWUD e CROUZET<sup>27</sup> identificaram quatro compostos formados durante o aquecimento do  $\beta$ -caroteno em água à temperatura de 97°C durante 3 horas: 5,6-epóxi- $\beta$ -caroteno, neo-T,5,6,5',6'-diepóxi- $\beta$ -caroteno, mutatocromo e aurocromo. Indicaram também a presença de um composto não identificado, com absorção máxima próxima a do  $\beta$ -caroteno, porém com fator de retenção (Rf) menor que o do aurocromo e mutatocromo. Embora os autores não tenham discutido, a presença deste componente indica a possibilidade de hidroxilação durante a degradação do  $\beta$ -caroteno.

ONYEWU *et al.*<sup>41</sup> detectaram dois compostos não-voláteis provenientes da degradação do  $\beta$ -caroteno dissolvido em glicerol e aquecido em presença de oxigênio a 210°C por 4 horas. Estes compostos com seis e oito duplas ligações eram incolores, absorviam na região do ultra-violeta e foram tentativamente identificados como 3,7,10-trimetil-1,12-bis(2,6,6-trimetil-ciclohexan-1-enil)-dodeca-1,3,5,7,9,11-hexaeno e 3,6-dimetil-1,8-bis(2,6,6-trimetil-ciclohex-1-enil)-octa-1,3,5,7-tetraeno. A hipótese para a formação destes compostos durante a degradação térmica do  $\beta$ -caroteno, e que não tinham sido reportados até então, é a perda de tolueno e dimetil-ciclodecapentaeno da cadeia poliênica do  $\beta$ -caroteno. Segundo os autores, esta tese é consistente com o mecanismo proposto por Edmunds and Johnstone em 1965. SCHWIETER *et al.*<sup>62</sup> trabalhando com caroteno marcado (deutério) reforçou a tese que a perda do tolueno tem origem na parte central da cadeia poliênica. Segundo ONYEWU *et al.*<sup>41</sup>, não houve evidência que o glicerol tivesse interferido na formação destes compostos.

Estes mesmos autores<sup>42</sup>, avaliando ainda a degradação  $\beta$ -caroteno em glicerol à temperatura de 210°C por 4 horas, 1 hora, 15 min e 5 min, detectaram a formação de sete compostos de degradação, entre eles, o composto 3, 7, 10-trimetil-1, 12-bis-(2, 6, 6-trimetil-ciclohexan-1-enil)-dodeca-1, 3, 5, 7, 9, 11-hexaeno já detectado anteriormente. Foram encontrados ainda os compostos: 3,7-dimetil-8-toluenil-1-(2,6,6-trimetil-ciclohex-1-enil)-octa-1,3,5,7-tetraeno, formado pela quebra da molécula ioneno;  $\beta$ -apo-13-carotenal, já identificado anteriormente por OUYANG *et al.*<sup>43</sup>; dihidroactinidiolida, 2-hidroximetil-1,3,3-trimetil-1,2-ciclohexanodiol,  $\beta$ -apo-14-carotenol e 1-(2,6,6-trimetil-ciclohex-1-enil)-3-hidroxi- 2-butanona, formados, segundo os autores, pelo mecanismo de radicais livres.



BYERS<sup>8</sup> isolou e identificou por ressonância magnética nuclear e espectrometria de massas, quatro compostos intermediários na degradação térmica do  $\beta$ -caroteno em soluções de hexano ou n-dodecano a temperaturas acima de 170°C por 15-18 horas. São eles: 1,12-bis-(2,6,6-trimetil-ciclohex-1-enil)-3,6,10-trimetil-dodeca-1,3,5,7,9,11-hexaeno; 1,12-bis-(2,6,6-trimetil-ciclohex-1-enil)-3,7-dimetil-dodeca-1,3,5,7,9,11-hexaeno; 1,6-bis-(2,6,6-trimetil-ciclohex-1-enil)-3-metil-hexa-1,3,5-trieno e 1,6-bis-(2,6,6-trimetil-ciclohex-1-enil)-hexa-1,3,5-trieno. O mecanismo de ciclização e expulsão de moléculas de tolueno e xileno da cadeia poliênica do  $\beta$ -caroteno também foi sugerido pelo autor para explicar a formação destes compostos.

PESEK *et al.*<sup>49</sup> estudaram a isomerização espontânea de  $\beta$ -caroteno à temperatura de 45°C, no escuro, por até 28 dias. Embora fosse possível teoricamente a formação de diversos isômeros, estes autores detectaram somente 9-*cis*- $\beta$ -caroteno e 13-*cis*- $\beta$ -caroteno. A isomerização e a proporção dos *cis* isômeros formados dependeram do sistema de solvente na qual o pigmento estava dissolvido.

### 3.2 Produtos de degradação voláteis

Os produtos voláteis formados a partir da biodegradação de carotenóides têm atraído a atenção de vários pesquisadores. Os compostos voláteis formados dessa forma são desejáveis e fazem parte do aroma característico de chá preto<sup>54, 60</sup>, de tabaco<sup>13, 18</sup> e de frutas como maracujá<sup>17, 45</sup>, goiaba<sup>23</sup>, uvas<sup>61, 65, 66</sup>, tomate<sup>7, 64</sup> e marmelo.<sup>33</sup>

Em alguns alimentos processados, a degradação e quebra dos carotenóides são indesejáveis, pois além da perda de cor e do valor nutricional, são responsáveis pelo aparecimento de odor estranho, como o que acontece com cenouras desidratadas<sup>19</sup> e mesmo em alguns tipos específicos de vinhos.<sup>53</sup>

Os mecanismos de formação de compostos voláteis não são ainda totalmente compreendidos. Segundo ENZELL<sup>18</sup>, os apocarotenais são importantes precursores dos componentes voláteis. A quebra dos carotenóides em compostos menores pode ser enzimática, por seqüestro do oxigênio singleto ou mesmo pelo mecanismo de autooxidação.



Algumas enzimas têm "sítios" específicos para quebra de molécula, enquanto outras são capazes de quebrar a cadeia poliênica em várias posições, semelhante ao que ocorre com o ataque do oxigênio singlete. Portanto, a formação de compostos voláteis é complexa, assim como é complexa a sua identificação e quantificação.

SANDERSON *et al.*<sup>60</sup> identificaram  $\beta$ -ionona como sendo um dos produtos de oxidação primária, do chá preto, proveniente do  $\beta$ -caroteno, e sugeriram este componente como precursor da dihidroactinidiolida, 2,2,6-trimetil ciclohexanona, 5,6-epoxi-ionona e 2,2,6-trimetil-6-hidroxi ciclohexanona. Ainda sugeriram a formação de  $\alpha$ -ionona, 3-hidroxi- $\beta$ -ionona, 3-hidroxi-5,6-epóxi ionona e linalool, a partir de diversos carotenóides como  $\alpha$ -caroteno, luteína, neoxantina, entre outros. RENOLD *et al.*<sup>54</sup> identificaram  $\beta$ -ciclocitral, safranal e  $\alpha$ - $\beta$ -damascone entre os voláteis do chá preto, como tendo sua origem na fragmentação dos carotenóides.

ENZELL<sup>18</sup> apresentou uma série de compostos voláteis, de 9 a 13 átomos de carbono, formados a partir da degradação de carotenóides e que fazem parte do aroma de muitas plantas. As discussões apresentadas neste trabalho focalizaram a formação dos compostos voláteis no tabaco, por ser uma fonte rica destes componentes, o que permitiu também sugestões sobre os possíveis mecanismos de degradação.

STEVENS<sup>64</sup> discutiu a relação entre o conteúdo de carotenóides e a composição dos voláteis de tomate. Encontrou uma alta correlação entre os carotenóides presentes e voláteis formados em cinco variedades de tomate estudados. Segundo este autor, aparentemente a primeira ligação dupla conjugada é oxidada primeiro e conforme aumenta o grau de insaturação, diminui o comprimento do composto carbonil formado. A oxidação seria favorecida na ligação dupla adjacente ao grupo metil possivelmente pelo efeito indutivo. As correlações obtidas entre voláteis e carotenóides estão apresentadas na Tabela II. Os autores concluíram também que a ação das enzimas é muito importante na produção de voláteis.

**TABELA II.** Possíveis compostos voláteis provenientes de carotenóides em tomate.

| Composto                         | Carotenóide de origem                                                          |
|----------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------|
| Farnesilacetona                  | 2 fitoeno e fitoflueno                                                         |
| Geranilacetona e farnesal        | fitoflueno, $\zeta$ -caroteno e neusporeno                                     |
| 6-metil-hept-5-en-2 ona e citral | neusporeno, 2-licopeno, 2 prolicopeno, $\gamma$ -caroteno e $\delta$ -caroteno |
| $\beta$ -ionona                  | $\beta$ -caroteno, 2- $\beta$ -caroteno e $\alpha$ -caroteno                   |
| $\alpha$ -ionona                 | $\delta$ -caroteno e $\alpha$ -caroteno                                        |

Referência: STEVENS<sup>64</sup>

Os compostos voláteis farnesilacetona (6,10,14-trimetil-pentadec-5,9,13-trien-2-ona), geranilacetona e 6-metil-hep-5-en-2-ona também foram detectados por BUTTERY *et al.*<sup>7</sup> como componentes do aroma do tomate e provavelmente provenientes da fragmentação do caroteno licopeno.

LUTZ e WINTERHALTER<sup>33</sup> avaliaram as possíveis quebras na degradação dos carotenóides presentes em frutas de marmelo e formação de compostos voláteis de 13 e 15 carbonos. Mecanismos de degradação de diversos carotenóides foram sugeridos envolvendo a quebra enzimática das moléculas nas plantas intactas.

JOSEPHSON *et al.*<sup>26</sup> estudaram a contribuição de produtos voláteis provenientes da oxidação de carotenóides para o aroma de salmão cozido. Utilizaram sistema-modelo de óleo de salmão contendo várias concentrações de carotenóides impregnados em Celite. A oxidação foi acompanhada à temperatura ambiente, por 24h. Concluíram que os carotenóides de salmão são provavelmente os precursores dos voláteis tolueno, p, m e o-xileno, limoneno, 6-metil-3,5-heptadien-2-ona, 3,5,5-trimetil-2-ciclohexan-1-ona e 4,4-dimetil-2-buten-4-olida.

DIRINCK *et al.*<sup>15</sup> identificaram, entre os principais componentes voláteis do óleo de dendê cru,  $\beta$ -ionona em concentração relativamente alta e também sugeriram a sua formação através da oxidação do caroteno, responsável pela cor vermelha do óleo.

Assim como conduzido para identificação de compostos de degradação não-voláteis de carotenóides, a formação de compostos voláteis foi estudada por vários autores em

sistemas-modelos. Em geral, foram utilizados sistemas líquidos a altas temperaturas, como mostra a Tabela III.

**TABELA III.** Compostos voláteis provenientes do  $\beta$ -caroteno e zeaxantina detectados em sistemas-modelos.

| Referência                          | Condições utilizadas                                                 | Critérios de identificação            | Compostos identificados                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
|-------------------------------------|----------------------------------------------------------------------|---------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| ISOE <i>et al.</i> <sup>24</sup>    | $\beta$ -caroteno em benzeno e metanol, presença de luz, catalisador | IV, EM e RMN                          | $\beta$ -ionona, 6-hidroxi-2,2,6-trimetil-ciclohexanona, dihidroactinidiolida                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
| ISOE <i>et al.</i> <sup>25</sup>    | $\beta$ -caroteno em benzeno e em presença de luz e traços de água   | IV e RMN                              | Ácido gerônico e desoxi-xantonin dihidroactinidiolida, $\beta$ -ionona e 2-hidroxi-2,6,6-trimetil-ciclohexanona                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
|                                     | Zeaxantina em benzeno e em presença de luz                           | IV e RMN                              | 2,4 dihidroxi-2,6,6-trimetil ciclohexanona, hidroxi ácido gerônico, 3-hidroxi- $\beta$ -ciclocitral, loliolida, iso-loliolida, 3-hidroxi-5,6-epoxi- $\beta$ -ionona                                                                                                                                                                                                                                                                              |
| LA ROE e SHIPLEY. <sup>32</sup>     | $\beta$ -caroteno aquecido a 188°C por 72 horas                      | GC, padrões e GC/EM                   | tolueno, m-xileno, 2,6 dimetil naftaleno, $\alpha$ -ionona, $\beta$ -ionona e ioneno (1,1,6-trimetil-1,2,3,4 - tetrahidronaftaleno)                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
|                                     | $\beta$ -caroteno em água aquecido a 100°C durante 30 minutos        | GC / EM                               | $\alpha$ -ionona, $\beta$ -ionona e ioneno                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
| KAWAKAMI. <sup>28</sup>             | $\beta$ -caroteno em água aquecido a 90, 120 e 150°C                 | GC / EM                               | 2,6,6-trimetil-2-hidroxi-ciclohexanona, $\beta$ -ciclocitral, 2,6,6-trimetil-2-hidroxi-ciclohexano-1-aldeído, $\beta$ -ionona, 5,6-epoxi- $\beta$ -ionona, 2,6,6-trimetil-2,3-epoxi-ciclohexiliden-1-acetaldeído, dihidroactinidiolida<br>n-tridecano, 2,6,6-trimetil-ciclohexanona, 2-metil-2-hepten-4-ona, 2,6,6-trimetil-ciclohex-2-enona, n-tetradecano, benzaldeído, ioneno, $\beta$ -damascone, $\alpha$ -cadinol, 3-ceto- $\beta$ -ionona |
| KANASA-WUD e CROUZET. <sup>27</sup> | $\beta$ -caroteno em água aquecido a 97°C por 3h                     | GC / EM, índice de retenção e padrões | 2,6,6-trimetil ciclohexanona, 2-metil-2-hepten-6-ona, 2-metil-2-hepten-4-ona, 2,6,6-trimetil-2-ciclohexen-1-ona, decanal, 2-hidroxi-2,6,6-trimetil-ciclohexanona, $\beta$ -ciclocitral, ioneno, naftaleno, 2-hidroxi-2,6,6-trimetil-ciclohexano-1-carboxialdeído, $\beta$ -ionona, 5,6-epoxi- $\beta$ -ionona, 2,6-dimetil decahidronaftaleno (tentativamente identificados), dihidroactinidiolida, 4-ceto-ionona                                |

IV= infra-vermelho, RMN= ressonância magnética nuclear, GC/EM= cromatografia a gás / espectrometria de massa

Os principais compostos voláteis formados, em comum, foram  $\beta$ -ionona, 5,6-epoxi- $\beta$ -ionona, dihidroactinidiolida,  $\beta$ -ciclocitral, 2,6,6 trimetil ciclohexanona.

KANASAWUD e CROUZET<sup>27</sup> identificaram vários compostos voláteis provenientes da termodegradação do  $\beta$ -caroteno em sistema aquoso à temperatura de 97°C, conforme mostrado na Tabela III. Segundo os autores, decanal, 4-etil-benzaldeído e cetoisoforona (2,6,6-trimetil-2-ciclohexeno-1,4-diona) foram identificados pela primeira vez como produtos voláteis resultante da termodegradação do  $\beta$ -caroteno. Mostraram que a formação de compostos voláteis foi maior em presença de oxigênio, do que em ar atmosférico e nitrogênio. Estudaram também a influência da temperatura na formação dos compostos voláteis durante tratamento de 3 horas a temperaturas variando entre 30 e 90°C. Observaram que a 30°C somente dihidroactinidolida foi produzida. A maioria dos compostos foram observados quando a temperatura alcançou 50°C, acima da qual a produção de voláteis foi acelerada. A formação dos voláteis 2-hidroxi-2,6,6-trimetil-ciclohexano-1-carboxialdeído e dihidroactinidolida foi maior na primeira hora de oxidação e alcançaram a estabilidade entre 2 a 4 horas. Porém, a concentração de 5,6-epoxi- $\beta$ -ionona decresceu após 2 horas de oxidação, confirmando ser este um produto intermediário na formação dos compostos voláteis.

KANASAWUD e CROUZET<sup>27</sup> ainda sugeriram um mecanismo de formação de compostos voláteis a partir de produtos de degradação não voláteis do  $\beta$ -caroteno, como apresentado na Figura 2.

GLORIA *et al.*<sup>20</sup> e GLÓRIA e GRAY<sup>21</sup> estudaram o efeito da temperatura de 20 e 80°C na formação dos produtos voláteis durante a autooxidação do  $\beta$ -caroteno em um sistema-modelo com CMC, na presença de oxigênio. Compararam os voláteis formados neste sistema, com os obtidos pela fotooxidação do  $\beta$ -caroteno a 20°C, em presença de luz e oxigênio. Neste caso, o  $\beta$ -caroteno estava dissolvido em etanol absoluto e o catalisador rose bengala foi utilizado. Identificaram ainda os voláteis obtidos pela oxidação química do  $\beta$ -caroteno dissolvido em cloreto de metileno com ácido metacloroperbenzóico, à temperatura de 0°C. Para todos os processos estudados, foram encontrados produtos de degradação similares, porém, suas concentrações relativas variaram. A Tabela IV apresenta os compostos detectados em cada uma das condições estudadas.

A autooxidação foi estudada à temperatura de 20°C, porém, o sistema modelo foi submetido ao aquecimento à temperatura de 60°C por 90 minutos, durante a coleta dos voláteis, o que pode ter gerado alguns dos produtos detectados.

Na amostra controle, foram detectados os voláteis  $\beta$ -ciclocitral, 2,2,6-trimetil-ciclohexano-carboxaldeído e  $\beta$ -ionona. Segundo os autores, estes compostos poderiam ter se originado do ataque do oxigênio à ligação 7-8 da molécula de  $\beta$ -caroteno durante a preparação da amostra, porém não fizeram referência ao aquecimento na coleta dos voláteis.

**TABELA IV.** Compostos voláteis formados da degradação térmica, química e fotoquímica do  $\beta$ -caroteno em sistemas-modelos.

| Condições                                                                                                                  | Parâmetros de identificação          | Produtos voláteis                                                                                                                                       |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Sistema-modelo seco, com oxigênio puro, temperatura 20°C                                                                   | GC/MS e índice de retenção e padrões | $\alpha$ -isoforona, 2,2,6-trimetil-ciclohexano-carboxaldeído, $\beta$ -ciclocitral, dihidroactinidiolida, $\beta$ -ionona e 5,6-epóxi- $\beta$ -ionona |
| Mesmas condições anteriores, temperatura 80°C                                                                              | GC/MS, índice de retenção e padrões  | Dihidroactinidiolida, $\beta$ -ionona, 5,6 epóxi- $\beta$ -ionona e 2,2,6-trimetil-ciclohexano-carboxaldeído                                            |
| Solução $\beta$ -caroteno + rose bengala e etanol absoluto, com oxigênio puro a 20°C e luz- 20W a 5 cm do frasco de reação | GC/MS, índice de retenção e padrões  | $\beta$ -ionona, 5,6-epóxi- $\beta$ -ionona, dihidroactinidiolida, 2,2,6-trimetil-ciclohexano-carboxaldeído, $\beta$ -ciclocitral e neral               |
| $\beta$ -caroteno em cloreto de metileno + ácido meta perclorobenzóico, temperatura 0°C                                    | GC/MS, índice de retenção e padrões  | $\beta$ -ionona, dihidroactinidiolida, $\beta$ -ciclocitral, 5,6-epóxi- $\beta$ -caroteno, 2,2,6-trimetil-ciclohexano-carboxaldeído e neral             |

Referência: GLORIA et al.<sup>20</sup> e GLÓRIA e GRAY<sup>21</sup>

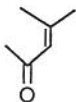
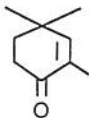
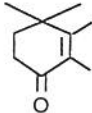
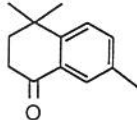
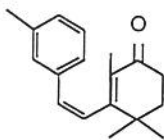
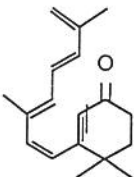
À temperatura de 20°C, o principal componente encontrado foi o 2,2,6-trimetil-ciclohexano-carboxaldeído, seguido pelo 5,6-epoxi- $\beta$ -ionona e dihidroactinidiolida, enquanto a 80°C, o principal volátil foi a dihidroactinidiolida seguida pela 5,6-epoxi- $\beta$ -ionona. Nesta última condição, não foram detectados os compostos voláteis de menor massa molecular.

Para as duas outras condições utilizadas, a fotodegradação e a degradação química, o principal volátil formado foi o  $\beta$ -ionona.

A formação de compostos voláteis provenientes da cantaxantina foi estudada por ROSHDY e DAUN.<sup>58</sup> O sistema-modelo consistia em cantaxantina dissolvida em glicerol e aquecida a 210°C por 30 minutos, 1, 2 e 4 horas.

Os compostos voláteis foram condensados após passagem por uma série de armadilhas imersas em gelo seco e acetona, extraídos com éter etílico, concentrados e analisados por CG e CG/EM. Foram tentativamente identificados seis compostos voláteis mostrados na Tabela V. Os autores ainda sugeriram o mecanismo para formação dos três últimos compostos citados, aqueles de maior massa molecular.

**TABELA V.** Compostos voláteis tentativamente identificados na degradação térmica da cantaxantina em sistema-modelo.

| Composto identificado                                                        |                                                                                     | Fórmula molecular                 | Massa molecular |
|------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------|-----------------|
| 4-metil-3-penten-2-ona                                                       |   | C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> O  | 98              |
| 2,4,4-trimetil-2-ciclohexen-1-ona                                            |  | C <sub>9</sub> H <sub>14</sub> O  | 138             |
| 1,1,5,6-tetrametil-4-ceto-5-ciclohexeno                                      |  | C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O | 152             |
| 1,2,3,4-tetrahidro-4-ceto-1,1,6-trimetil naftaleno                           |  | C <sub>13</sub> H <sub>16</sub> O | 188             |
| 2-(1,1,5-trimetil-4-ceto-5-ciclohexen-6-il)-1-tolileno                       |  | C <sub>18</sub> H <sub>22</sub> O | 254             |
| 2,6-dimetil-8-(1,1,5-trimetil-4-ceto-5-ciclohexen-6-il)-1,3,5,7-octatetraeno |  | C <sub>19</sub> H <sub>26</sub> O | 270             |

Referência: ROSHDY e DAUN<sup>58</sup>



À temperatura ambiente, similar ao que ocorre na estocagem de alimentos, não foram encontrados estudos de degradação de carotenóides e formação de compostos voláteis. Apesar de GLÓRIA *et al.*<sup>20</sup> e GLÓRIA e GRAY<sup>21</sup> terem realizado a oxidação à temperatura de 20° C, a coleta dos voláteis envolveu aquecimento à temperatura de 60°C por 90 minutos, como mencionado acima.

#### 4. FATORES QUE INFLUENCIAM A DEGRADAÇÃO DE CAROTENÓIDES

Uma revisão completa dos fatores que podem influenciar a degradação de carotenóides foi publicada recentemente.<sup>55</sup> Os fatores mais importantes são discutidos abaixo.

##### 4.1 Estrutura do carotenóide e natureza do sistema

RAMAKRISHNAN e FRANCIS<sup>50, 52</sup> mostraram que a estrutura do carotenóide influencia a velocidade de degradação. No estudo publicado em 1979, foi comparada a velocidade de degradação de três carotenóides,  $\beta$ -caroteno,  $\beta$ -apo-8'-carotenol e cantaxantina em sistemas-modelos com CMC e amido, equilibrados em umidades relativas diferentes. A cantaxantina foi a mais estável e o  $\beta$ -caroteno o menos estável em ambos sistemas. Os carotenóides no sistema de amido se mostraram mais estáveis que no sistema com celulose, provavelmente devido ao efeito protetor adicional do amido.

Em 1980 este trabalho foi estendido à susceptibilidade à oxidação de sete carotenóides, diferentes no tipo, número e posição dos grupos funcionais. Em cinco pigmentos que continham a estrutura básica com um ou dois anéis  $\beta$ -ionona ( $\beta$ -caroteno,  $\beta$ -apo-8'-carotenol, criptoxantina, cantaxantina e zeaxantina), a susceptibilidade decrescia com o aumento da polaridade relativa. O  $\beta$ -caroteno foi o mais susceptível à oxidação. A introdução de substituintes na posição 3, como ocorre na criptoxantina, ofereceu alguma estabilidade à molécula. A zeaxantina com os dois anéis substituídos nas posições 3 e 3' demonstrou grande resistência. Mesmo as substituições nas posições 4 e 4' pareceram também conferir relativa estabilidade ao pigmento, como no caso da cantaxantina. Este tipo de relação não se verificou com os pigmentos capsantina e capsorubina, que possuem um ou dois anéis com cinco carbonos, diferentes do anel  $\beta$ -ionona.



MINGUEZ-MOSQUERA e JAREN-GALAN<sup>39</sup> estudaram a descoloração de  $\beta$ -caroteno, capsantina e capsantina diesterificada, em diferentes sistemas líquidos (em ciclohexano, etanol absoluto e água) e determinaram a influência da temperatura e da luz. O  $\beta$ -caroteno degradou mais rápido; não houve diferença evidente na velocidade de degradação da capsantina e capsantina diesterificada. Em meio anidro (em ciclohexano e etanol absoluto), a degradação foi mais rápida do que em meio aquoso, para os três pigmentos estudados.

PESEK e WARTHESEN<sup>46</sup> avaliaram a fotodegradação em sucos vegetais, contendo principalmente tomate e cenoura, expondo as amostras em frascos de vidro (simulando embalagem transparente) à luz de 230- $\mu$ m a 40°C. A degradação do licopeno foi um quinto da observada para  $\alpha$  e  $\beta$ -caroteno com constantes de velocidades de 0,061, 0,273 e 0,309  $\text{dia}^{-1}$ , respectivamente. A diferença nas velocidades de degradação foram atribuídas às diferenças estruturais. O efeito do oxigênio no espaço-livre foi considerado mínimo.

A influência do adsorvente de um sistema-modelo seco na degradação de  $\beta$ -caroteno foi demonstrada por GOLDMAN *et al.*<sup>22</sup> Foram avaliados os adsorventes celulose microcristalina (CMC), óxido de magnésio (MgO) e óxido de alumínio ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ). A perda de 50% do  $\beta$ -caroteno ocorreu a 25, 10 e 1 dia para CMC, MgO e  $\text{Al}_2\text{O}_3$ , respectivamente. As diferenças foram explicadas pelas diferentes capacidades de adsorção dos adsorventes;  $\text{Al}_2\text{O}_3$  possui a maior capacidade e a CMC a menor. Segundo estes autores, a oxidação neste caso dependia mais do oxigênio contido no adsorvente do que da pressão parcial de  $\text{O}_2$ .

A degradação do  $\beta$ -caroteno em dispersões aquosas demonstrou também ser dependente da matriz, em trabalho conduzido por PESEK e WARTHESEN<sup>47</sup>, sendo mais estável na dispersão de gelatina/açúcar do que na dispersão de goma acácia/açúcar, após 5 dias de exposição à luz.

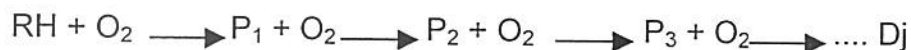
## 4.2 Oxigênio

A quantidade de oxigênio disponível ou acessível às moléculas de carotenóides é o principal fator para descoloração dos pigmentos, segundo RAMAKRISHNAN e FRANCIS.<sup>50</sup>

TEIXEIRA NETO *et al.*<sup>67</sup> demonstraram que a degradação (ou velocidade de degradação) do  $\beta$ -caroteno aumentou com o aumento da concentração do oxigênio no espaço-livre, utilizando um sistema-modelo composto de  $\beta$ -caroteno, leite em pó desnatado e CMC. Demonstraram que o oxigênio absorvido continuava disponível para oxidação, mesmo após a aplicação de vácuo na embalagem, confirmando a importância do oxigênio residual na estabilidade do alimento.

Observação semelhante foi relatada por GOLDMAN *et al.*<sup>22</sup> que constataram que a 1, 2, 10, 15 e 20,9% de oxigênio, 50% de retenção do  $\beta$ -caroteno ocorreu a 37, 25, 10, 7 e 5 dias, respectivamente. Quando o oxigênio foi excluído do espaço-livre a deterioração do  $\beta$ -caroteno foi de 12%, após 60 dias de estocagem.

TEIXEIRA NETO *et al.*<sup>67</sup> encontraram que até 7 moléculas de oxigênio são consumidas para cada molécula de  $\beta$ -caroteno degradada. GOLDMAN *et al.*<sup>22</sup> observaram que 8 moles de oxigênio são requeridos para oxidação de um mol de  $\beta$ -caroteno. O alto consumo de oxigênio foi explicado por estes últimos autores pela existência de uma sequência de reações e a interação dos produtos intermediários com oxigênio. A reação poderia ser descrita a seguir:



onde :

RH é o  $\beta$ -caroteno

Pi são os produtos intermediários

Dj é o produto final da reação

### 4.3 Luz

São poucos os trabalhos que analisaram a influência da luz na degradação de carotenóides em sistemas secos ou líquidos. No geral, os trabalhos indicam que a luz favorece a degradação e a isomerização dos carotenóides, como esperado.

A fotodegradação do  $\beta$ -caroteno em dispersões aquosas expostas à luz de 250- $\mu$ m e à temperatura variando entre 5 a 28°C foi estudada por PESEK e WARTSEN<sup>47</sup>. As

amostras expostas à luz e à alta temperatura degradaram mais rápido. A formação de *cis*-isômeros foi observada e aumentava com o tempo de exposição à luz, porém, estes não foram individualmente identificados.

Estes mesmos autores<sup>48</sup> estudaram a fotoisomerização e fotodegradação do  $\beta$ -caroteno dissolvido em uma mistura de solventes (acetonitrila, metanol e tetrahidrofurano) e em amostras de suco de cenoura. Em solventes foi observado, quando no escuro, a formação de 13-*cis*- $\beta$ -caroteno a uma taxa aproximadamente 3 vezes mais rápida do que a formação do 9-*cis*- $\beta$ -caroteno. Quando exposto à luz, a formação do 9-*cis*- $\beta$ -caroteno foi favorecida, atingindo até 6 vezes mais deste isômero, quando comparado com o estocado no escuro. Os autores concluíram, porém, que embora a isomerização ocorra, a fotodegradação é a reação predominante. Para as amostras de  $\beta$ -caroteno em suco de cenoura, foi relatado no resumo que a mesma tendência foi observada. No texto, porém, os resultados mostraram que a isomerização ocorreu, mas a fotodegradação não foi significativa. Além disso, a formação do isômero 9-*cis* só foi detectada na presença da luz.

Em sistemas-modelos líquidos em meios anidros e aquosos, MINGUEZ-MOSQUERA e JAREN-GALAN<sup>39</sup> mostraram que a luz favoreceu a degradação dos três pigmentos estudados:  $\beta$ -caroteno, capsantina e capsantina diesterificada.

CARNEVALE *et al.*<sup>10</sup> avaliaram a fotooxidação dos pigmentos de pimentão em pó, quando expostos à luz fluorescente de diferentes intensidades. A degradação dos pigmentos foi correlacionada com a mudança de cor na superfície do produto. Foi observado um período de indução relacionado a reações de radicais livres e que, quanto maior a intensidade da iluminação, menor o período de indução.

#### 4.4 Atividade de água ou conteúdo de umidade

A influência da atividade de água ( $a_w$ ) na velocidade de descoloração de carotenóides tem sido demonstrada por vários pesquisadores.<sup>12, 22, 50</sup> Em sistemas-modelos com CMC, demonstraram que com o aumento da atividade de água, a velocidade de degradação de  $\beta$ -caroteno e de outros carotenóides diminuía.

RAMAKRISHNAN e FRANCIS<sup>50</sup> sugeriram que as moléculas de água formariam pontes de hidrogênio com os hidroperóxidos produzidos durante a reação de radicais livres. As pontes de hidrogênio poderiam proteger os hidroperóxidos da decomposição e, portanto, diminuir a velocidade de degradação. Alternativamente, a água agiria diretamente nos radicais livres produzidos.

Por ser uma reação de radicais livres, é esperado que, a partir de determinada atividade de água, a degradação dos carotenóides voltasse a aumentar, como é observado nas reações de degradação dos lipídeos. Porém, RAMAKRISHNAN e FRANCIS<sup>50</sup> sugeriram que o efeito da água dependia da composição do alimento. O aumento do conteúdo de água, em alguns casos, poderia mobilizar os fatores pró-oxidantes do sistema e acelerar a oxidação. Em um sistema-modelo, não haveria fatores pró-oxidantes como metais, e provavelmente por isso que o aumento da velocidade de degradação, a partir de determinado valor de atividade de água, não foi observado.

Em alimentos desidratados, MARTINEZ e LABUZA<sup>34</sup> já tinham demonstrado a diminuição significativa da velocidade de degradação de astaceno (astaxantina) em salmão liofilizado, à temperatura de 37°C, com o aumento da umidade, do estado seco para  $a_w$  de 0,41. A velocidade de degradação foi maior abaixo da monocamada.

BALOGH *et al.*<sup>3</sup> obtiveram resultados diferentes utilizando um sistema-modelo de CMC e  $\beta$ -caroteno. Verificaram que a velocidade de degradação deste pigmento era menor na atividade de água da monocamada. A velocidade de degradação foi maior a atividades de água maiores ou menores que a monocamada. O aumento da velocidade de degradação foi maior a menores atividades de água, sendo este efeito mais pronunciado em amostras com sulfito do que em amostras sem este tratamento.

Estudando o efeito de uma faixa maior de atividade de água, do estado seco a  $a_w$  de 0,73, em cenoura desidratada, ARYA *et al.*<sup>2</sup> notaram que os pigmentos eram mais estáveis na faixa de 0,32 a 0,57. Acima e abaixo desta faixa, a velocidade de degradação aumentava, sendo este aumento mais pronunciado a menores atividades de água. A aceleração da decomposição dos carotenóides a atividades de água mais altas foi atribuída à solubilização e ao mesmo tempo ao aumento da mobilização dos catalisadores presentes e à exposição de novos sítios na matriz sólida como resultado da absorção de água pela matriz.

TSIMIDOU e BILIADERIS<sup>69</sup> analisaram a perda de carotenóide do açafrão desidratado a atividades de água entre 0,11 a 0,75 e temperaturas de 25, 40 e 60°C. Observaram que com o aumento da atividade de água na faixa de 0,11 a 0,75, houve um aumento gradativo da velocidade de degradação. A quantidade de umidade do açafrão na monocamada variou de 1,82 a 5,19g de água por 100g de sólidos, dependendo da temperatura e equação utilizada (BET ou GAB), o que corresponde à atividade de água próxima ou abaixo de 0,11. Estes resultados mostraram que o açafrão desidratado teve comportamento inverso ao observado para o salmão liofilizado<sup>34</sup> e aos sistemas-modelos de  $\beta$ -caroteno.

Os autores explicaram que este comportamento poderia ser devido a maior solubilidade em água dos pigmentos do açafrão, maior do que de outros carotenóides, favorecendo desta forma maior acesso do oxigênio dissolvido aos pigmentos. Por outro lado, a partir de certo nível de atividade de água, a velocidade de degradação deveria decrescer devido à diluição dos reagentes. Este comportamento foi observado no estudo conduzido à temperatura de 25°C.

#### 4.5 Temperatura

O aumento da temperatura acelera as reações de degradação dos carotenóides. CHOU e BREENE<sup>12</sup> mostraram em um sistema-modelo seco que a constante de velocidade de degradação do  $\beta$ -caroteno foi de  $2,87 \times 10^{-2} \text{ dia}^{-1}$ ,  $10,5 \times 10^{-2}$  e  $21,0 \times 10^{-2} \text{ dia}^{-1}$  a temperatura de 5, 20 e 35°C, respectivamente. STEFANOVICH e KAREL<sup>63</sup> estudaram também a degradação de  $\beta$ -caroteno em um sistema-modelo seco em CMC e em alguns alimentos a temperaturas entre 60 e 80°C, simulando o que ocorre na desidratação de alimentos. Em sistemas-modelos, as constantes da velocidade de reação aumentaram de  $3,7 \times 10^3 \text{ min}^{-1}$  a 60°C para  $23,9 \times 10^3 \text{ min}^{-1}$  a 80°C. Nos alimentos, a degradação foi menor e a velocidade aumentou de aproximadamente  $0,4 \times 10^3 \text{ min}^{-1}$  para cerca de  $1,1 \times 10^3 \text{ min}^{-1}$ , no mesmo intervalo de temperatura.

MINGUEZ-MOSQUERA e JAREN-GALAN<sup>39</sup>, em vários sistemas-modelos líquidos com  $\beta$ -caroteno e capsantina, mostraram a aceleração da degradação com o aumento de temperatura de 15 a 45°C. TSIMIDOU e BILIADERES<sup>69</sup> também constataram aumento da velocidade de degradação do pigmento de açafrão seco (crocin), enquanto a temperatura aumentava de 25 a 60°C.



TSIMIDOU e TSATSARONI<sup>70</sup>, estudando também a estabilidade dos pigmentos do açafrão em extrato aquoso, relataram que a estocagem a 4°C reduz a taxa de degradação a fatores maiores que 3, 8 e 10 vezes, quando comparado as velocidades de degradação a 25, 40 e 62°C, respectivamente.

#### **4.6 Antioxidantes e pró-oxidantes**

Antioxidantes geralmente retardam a degradação de carotenóides, estendendo a vida-de-prateleira de diversos alimentos. A eficácia depende do tipo de antioxidante utilizado, da sua concentração e do tipo de alimento.

Os antioxidantes normalmente utilizados em alimentos, como hidroxitolueno butilado (BHT), butilhidroxianisol (BHA), propil galato (PG), retardam a degradação dos carotenóides, aumentando o período de indução ou diminuindo a constante da velocidade de degradação.<sup>2, 12, 22</sup> Antioxidantes naturais, como  $\alpha$ -tocoferol e “oleoresin of rosemary”, também reduzem a perda de pigmento, porém, para apresentarem a mesma eficiência do BHT, devem ser utilizados em altas concentrações.<sup>6</sup>

Ácido ascórbico, dependendo de sua concentração e tipo de “solução” (com linoleato, em presença de  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ), agem como pró-oxidantes, aumentando a descoloração de pigmentos. Metais como  $\text{Cu}^{2+}$ , mesmo a baixas concentrações, aceleram a degradação de carotenóides.

### **5. CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Os últimos anos testemunharam um aumento nas investigações dedicadas à degradação dos carotenóides. No entanto, as informações obtidas são ainda insuficientes e muito mais incompletas, em comparação com a riqueza de detalhes conhecidos em relação à oxidação de lipídeos. Dada a grande importância de carotenóides como corantes naturais e compostos biologicamente ativos, este é um campo de pesquisa que merece mais interesse e empenho.

## ABSTRACT

Natural pigments responsible for the pleasing color of many foods, carotenoids drew greater worldwide attention with the discovery of their biological functions or actions. However, being highly unsaturated compounds, their instability during the processing and storage of foods is a serious concern. Both isomerization and oxidation occurs, but the latter is the major cause of carotenoid losses. Current knowledge of carotenoid degradation is still limited and more investigations are necessary for a better understanding of this process. Of fundamental importance is the isolation and structural elucidation of the initial, intermediate and final products of oxidation. In general, studies show a first order degradation kinetics, although some authors report a zero order kinetics. The first reactions involve formation of epoxycarotenoids and apocarotenals. More recently, hydroxylation was also observed. Subsequent fragmentations lead to complete loss of color and biological activity, with the formation of volatile compounds (of low molecular weight), which can contribute positively or negatively to the food's flavor. The principal factors that influence the oxidation of carotenoids are: structure of the carotenoid and nature of the food matrix, availability of oxygen, presence of light, water activity or content, presence of antioxidants and pro-oxidants and temperature.

**Uniterms:** carotenoids, degradation, kinetics, non-volatile compounds, volatile compounds

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1) ALONSO, G.L., VARON, R., GOMEZ, R. *et al.* Autoxidation in saffron at 40°C and 75% relative humidity. **J. Food Sci.**, Chicago, v.55, n.2, p.595-596, 1990.
- 2) ARYA, S.S., NATESAN, V., PARIHAR, D.B., VIJAYARAGHAVAN, P.K. Stability of carotenoids in dehydrated carrots. **J. Food Technol.**, London, v.14, p.579-586, 1979.
- 3) BALOCH, A.K., BUCKLE, K.A., EDWARDS, R.A. Stability of  $\beta$ -carotene in model systems containing sulphite. **J. Food Technol.**, London, v.12, p.309-316, 1977.



- 4) BALOCH, A.K., BUCKLE, K.A., EDWARDS, R.A. Effect of processing variables on the quality of dehydrated carrot I-leaching losses and carotenoid content. **J. Food Technol.**, London, v.12, p.285-293, 1977.
- 5) BALOCH, A.K., BUCKLE, K.A., EDWARDS, R.A. Effect of processing variables on the quality of dehydrated carrot II-leaching losses and stability of carrot during dehydration and storage. **J. Food Technol.**, London, v.12, p.295-307, 1977.
- 6) BERSET, C., MARTY, C. Formation of nonvolatile compounds by thermal degradation of  $\beta$ -carotene: Protection by antioxidants. In: PACKER, L. [Ed.]. **Methods in enzymology – carotenoids – Part A – Chemistry, separation, quantitation and antioxidation**. New York: Academic Press, 1992. v.213, cap.13, p.128-142.
- 7) BUTTERY, R.G., SEIFERT, R.M., LING, L.C. Volatile tomato components: characterisation of 6, 10, 14-trimethylpentadec-5, 9, 13-trien-2-one. **Chem. Ind.**, London, p.238, February 1969.
- 8) BYERS, J. Isolation and identification of the polyenes formed during the thermal degradation of  $\beta$ -carotene. **J. Org. Chem.**, Washington, n.48, p. 1515-1522, 1983.
- 9) BYERS, T., PERRY, G. Dietary carotenes, vitamin C, and vitamin E as protective antioxidants in human cancers. **Ann. Rev. Nutr.**, Palo Alto, v.12, p.139-159, 1992.
- 10) CARNEVALE, J., COLE, E.R., CRANK, G. Photocatalyzed oxidation of paprika pigments. **J. Agric. Food Chem.**, Washington, v.28, n.5, p.953-956, 1980.
- 11) CHICHESTER, C.O., McFEETERS, R. Pigment degeneration during processing and storage. In: HULME, A.C. [Ed.]. **The Biochemistry of Fruits and Their Products**. London: Academic Press, 1971. v.2, p.707-719.
- 12) CHOU, H., BREENE, W.M. Oxidative decoloration of  $\beta$ -carotene in low-moisture model systems. **J. Food Sci.**, Chicago, v.37, p.66-68, 1972.
- 13) DAVIS, D.L., STEVENS, K.L., JURD, L. Chemistry of tobacco constituents. Oxidation of  $\alpha$ -ionone and the acid-catalyzed rearrangement of 5-keto- $\alpha$ -ionone. **J. Agric. Food Chem.**, Washington, v.24, n.1, p.187-189, 1976.

- 14)Di MASCIÒ, P., KAISER, S., SIES, H. Lycopene as the most efficient biological carotenoid singlet oxygen quencher. **Arch Biochem Biophys.**, New York. v.274, p.532-538, 1989.
- 15)DIRINCK, P. SCHREYEN, L., DE SCHOENMACKER, L. *et al.* Volatile components of crude palm oil. **J. Food Sci.**, Chicago, v.42, n.3, p.645-648, 1977.
- 16)EL-TINAY, A.H., CHICHESTER, C.O. Oxidation of  $\beta$ -carotene. Site of initial attack. **J. Org. Chem.**, Washington. v.35, n.7, p.2290-2293, 1970.
- 17)ENGEL, K.H., TRESSL, R. Formation of aroma components from nonvolatile precursors in passion fruit. **J. Agric. Food Chem.**, Washington, v.31, n.5, p.998-1002, 1983.
- 18)ENZELL, C. Biodegradation of carotenoids – an important route to aroma compounds. **Pure Appl. Chem.**, London. v.57, n.5, p.693-700, 1985.
- 19)FALCONER, M.E., FISHWICK, M.J., LAND, D.G., SAYER, E.R. Carotene oxidation and off-flavour development in dehydrated carrot. **J. Sci. Food Agric.**, London, v.15, p.897-901, 1964.
- 20)GLÓRIA, M.B.A., GRAY, J.I., GRULKE, E.A. Compostos voláteis formados durante a oxidação do beta-caroteno. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v.11, n.1, p.36-44, 1991.
- 21)GLÓRIA, M.B.A., GRAY, J.I. Effect of type of oxidation on beta-carotene loss and volatile product formation in model system. **Food Chem.**, Oxford. v.46, p.401-406, 1993.
- 22)GOLDMAN, M., HOREV, B., SAGUY, I. Decolorization of beta-carotene in model systems simulating dehydrated foods. Mechanism and kinetic principles. **J. Food Sci.**, Chicago, v.48, p.751-754, 1983.
- 23)IDSTEIN, H., SCHREIER, P. Volatile constituents from guava (*Psidium Guajava*, L.) fruit. **J. Agric. Food Chem.**, Washington, v.33, n.1, p.138-143, 1985.
- 24)ISOE, S., BE HYEON, S., SAKAN, T. Photo-oxygenation of carotenoids I. The formation of dihydroactinidiolide and  $\beta$ -ionone from  $\beta$ -carotene. **Tetrahedron Lett.**, Oxford, n.4, p.279-281, 1969.

- 25)ISOE, S., BE HYEON, S., KATSUMURA, S., SAKAN, T. Photo-oxygenation of carotenoids II. The absolute configuration of loliolide and dihydroactinidiolide. **Tetrahedron Lett.**, Oxford, n.25, p.2517-2520, 1972.
- 26)JOSEPHSON, D.B., LINDSAY, R.C., STUIBER, D.A. Volatile carotenoid – related oxidation compounds contributing to cooked salmon flavor. **Lebensm. Wiss. Technol.**, London. v.24, p.424-432, 1991.
- 27)KANASAWUD, P., CROUZET, J.C. Mechanism of formation of volatile compounds by thermal degradation of carotenoids in aqueous medium 1.  $\beta$ -carotene degradation. **J. Agric. Food Chem.**, Washington, v.38, n.1, p.237-243, 1990.
- 28)KAWAKAMI, M. Ionone species compounds from  $\beta$ -carotene by thermal degradation in aqueous medium. **Nippon Nôgeikagaku Kaishi.**, Tóquio. v.56, n.10, p.917-921, 1982.
- 29)KRINSKY, N.I. Antioxidant functions of carotenoids. **Free Radical Biol. Med.**, Oxford. v.7, p.617-635, 1989.
- 30)KRINSKY, N.I. Carotenoids in medicine. In: KRINSKY, N.I., MATHEWS-ROTH, M.M., TAYLOR, R.F. [Eds.] **CAROTENOIDS: Chemistry and Biology**. New York: Plenum Press, 1990. p.279-291.
- 31)KRINSKY, N.I. The biological properties of carotenoids. **Pure Appl. Chem.**, London. v.66, p.1003-1010, 1994.
- 32)LAROE E.G., SHIPLEY, P.A. Whiskey composition: formation of alpha-and beta-ionone by the thermal decomposition of beta-carotene. **J. Agric. Food Chem.**, Washington, v.18, n.1, p.174-175, 1970.
- 33)LUTZ, A., WINTERHALTER, P. Isolation of additional carotenoid metabolites from quince fruit (*Cydonia oblonga* Mill). **J. Agric. Food Chem.**, Washington, v.40, n.7, p.1116-1120, 1992.
- 34)MARTINEZ, F., LABUZA, T.P. Rate of deterioration of freeze-dried salmon as a function of relative humidity. **J. Food Sci.**, Chicago, v.33, p.241-247, 1968.

- 35)MARTY, C.,BERSET, C. Degradation of *trans*- $\beta$ -carotene during heating in sealed glass tubes and extrusion cooking. **J. Food Sci.**, Chicago, v.51, n.3, p.698-702, 1986.
- 36)MARTY, C., BERSET, C. Degradation products of *trans*- $\beta$ -carotene produced during extrusion cooking. **J. Food Sci.**, Chicago, v.53, n.6, p.1880-1886, 1988.
- 37)MARTY, C.,BERSET, C. Factors affecting the thermal degradation of *all-trans*- $\beta$ -carotene. **J. Agric. Food Chem.**, Washington, v.38, n.4, p.1063-1067, 1990.
- 38)MATHEWS-ROTH, M.M. Carotenoid and cancer prevention – experimental and epidemiological studies. **Pure Appl. Chem.**, London. v.57, p.717-722, 1985.
- 39)MINGUEZ-MOSQUERA, M.I., JAREN-GALAN, M. Kinetics of the decolouring of carotenoid pigments. **J. Sci. Food Agric.**, London, v.67, p.153-161, 1995.
- 40)MINGUEZ-MOSQUERA, M.I., GANDUL-ROJAS, B. Mechanism and kinetics of carotenoid degradation during the processing of green table olives. **J. Agr. Food Chem.**, Washington, v.42, p.1551-1554, 1994.
- 41)ONYEWU, P.N., DAUN, H., HO, C.T. Formation of two thermal degradation products of  $\beta$ -carotene. **J. Agric. Food Chem.**, Washington, v.30, n.6, p.1147-1151, 1982.
- 42)ONYEWU, P.N., HO, C.T., DAUN, H. Characterization of  $\beta$ -carotene thermal degradation products in a model food system. **J. Amer. Oil Chem. Soc.**, Champaign, v.63, n.11, p.1437-1441, 1986.
- 43)OUYANG, J.M., DAUN, H., CHANG, S.S., HO, C.T. Formation of carbonyl compounds from  $\beta$ -carotene during palm oil deodorization. **J. Food Sci.**, Chicago, v.45, p.1214-1217, 1222, 1980.
- 44)PALOZZA, P., KRINSKY, N.I. Antioxidant effects of carotenoids *in vivo* and *in vitro*: An overview. **Methods Enzymol.**, New York, v.213, p.403-420, 1992.
- 45)PARLIMENT, T.H. Some volatile constituents of passion fruit. **J. Agric. Food Chem.**, Washington, v.20, n.5, p.1043-1045, 1972.

- 46) PESEK, C.A., WARTHESEN, J.J. Photodegradation of carotenoids in a vegetable juice system. **J. Food Sci.**, Chicago, v.52, n.3, p.744-746. 1987.
- 47) PESEK, C.A., WARTHESEN, J.J. Characterization of the photodegradation of  $\beta$ -carotene in aqueous model systems. **J. Food Science**, Chicago, v.53, n.5, p.1517-1520, 1988.
- 48) PESEK, C.A., WARTHESEN, J.J. Kinetic Model for photoisomerization and concomitant photodegradation of  $\beta$ -carotenes. **J. Agric. Food Chem.**, Washington, v.38, n.6, p.1313-1315, 1990.
- 49) PESEK, C.A., WARTHESEN, J.J., TAOUKIS, P.S. A kinetic model for equilibration of isomeric  $\beta$ -carotenes. **J. Agric. Food Chem.**, Washington, v.38, p.41-45, 1990.
- 50) RAMAKRISHNAN, T.V., FRANCIS, F.J. Stability of carotenoids in model aqueous systems. **J. Food Qual.**, Westport, v.2, p.177-189, 1979.
- 51) RAMAKRISHNAN, T.V., FRANCIS, F.J. Coupled oxidation of carotenoids in fatty acid esters of varying unsaturation. **J. Food Qual.**, Westport: v.2, p.277-287, 1979.
- 52) RAMAKRISHNAN, T.V., FRANCIS, F.J. Autoxidation of carotenoids and their relative polarity. **J. Food Qual.**, Westport: v.3, p.25-34, 1980.
- 53) RAPP, A., MARAIS, J. The shelf-life of wine: changes in aroma substances during storage and ageing of white wines. In: CHARALAMBOUS, G. [Ed.]. **Shelf-life studies of foods and beverages: Chemical, biological, physical and nutritional aspects**. Netherlands: Elsevier Science Publishers, 1993. p.891-921.
- 54) RENOLD, W., NÄF-MÜLLER, R., KELLER, U. *et al.* 144. An investigation of the tea aroma – Part I – New volatile black tea constituents. **Helv. Chim. Acta**, Basel, v.57, n.143/144, p.1301-1308, 1974. (Fasc.5).
- 55) RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Stability of carotenoids during the storage of foods. In: CHARALAMBOUS, G. [Ed.]. **Shelf-life studies of foods and beverages: Chemical, biological, physical and nutritional aspects**. Netherlands: Elsevier Science Publishers, 1993. p.591-628.

- 56)RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. **Carotenoids and food preparation: The retention of provitamin A carotenoids in prepared, processed and stored foods**. Arlington: USAID, 1997. 88p.
- 57)RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Carotenóides: estruturas, propriedades e funções. In: RODRIGUEZ-AMAYA, D.B., PASTORE, G.M. [Ed.]. **Ciência de alimentos – Avanços e perspectivas na América Latina**. Campinas: Fundação Cargill, 1997. Cap.3, p.20-31.
- 58)ROSHDY, T.H., DAUN, H. Use of GC-MS technique for identification of oxygenated volatile thermal degradation products of canthaxanthin. **J. Agric. Food Chem.**, Washington, v.38, n.6, p.1391-1396, 1990.
- 59)SAGUY, I. GOLDMAN, M., KAREL, M. Prediction of  $\beta$ -carotene decolorization in model system under static and dynamic conditions of reduced oxygen environment. **J. Food Sci.**, Chicago, v.50, p.526-530, 1985.
- 60)SANDERSON, G.W., CO, H., GONZALEZ, J.G. Biochemistry of tea fermentation: the role of carotenes in black tea aroma formation. **J. Food Sci.**, Chicago, v.36, p.231-236, 1971.
- 61)SCHREIER, P., DRAWERT, F., JUNKER, A. Identification of volatile constituents from grapes. **J. Agric. Food Chem.**, Washington, v.24, n.2, p.331-336, 1976.
- 62)SCHWIETER, U., ENGLERT, G., RIGASSI, N., VETTER, W. Physical organic methods in carotenoid research. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON CAROTENOIDS OTHER THAN VITAMIN A. New Mexico: Organic Chemistry Division, 1969. p.365-420.
- 63)STEFANOVICH, A.F., KAREL, M. Kinetics of beta-carotene degradation at temperatures typical of air drying of foods. **J. Food Proc. Preserv.**, Cambridge, v.6, p.227-242, 1982.
- 64)STEVENS, M.A. Relationship between polyene – carotene content and volatile compound composition of tomatos. **J. Amer. Soc. Hort. Sci.**, Alexandria. v.95, n.4, p.461-464, 1970.



- 65) STRAUSS, C.R., DIMITRIADIS, E., WILSON, B., WILLIAMS, P.J. Studies on the hydrolysis of two megastigma-3,6,9-triols rationalizing the origins of some volatile C13 norisoprenoids of *Vitis vinifera* grapes. **J. Agric. Food Chem.**, Washington, v.34, n.1, p.145-149, 1986.
- 66) STRAUSS, C.R., WILSON, B., WILLIAMS, P.J. 3-oxo- $\alpha$ -ionol, vomifoliol and roseoside in *Vitis vinifera* fruit. **Phytochemistry**, Oxford. v.26, n.7, p.1995-1997, 1987.
- 67) TEIXEIRA NETO, R.O., KAREL, M., SAGUY, I., MIZRAHI, S. Oxygen uptake and  $\beta$ -carotene decoloration in a dehydrated food model. **J. Food Sci.**, Chicago, v.46, p.665-676, 1981.
- 68) TERAQ, J. Antioxidant activity of  $\beta$ -carotene-related carotenoid in solution. **Lipids**, Champaign. v.24, p.659-661, 1989.
- 69) TSIMIDOU, M., BILIADERIS, C.G. Kinetic studies of saffron (*Crocus sativus* L) quality deterioration. **J. Agric. Food Chem.**, Washington, v.45, n.8, p.2890-2898, 1997.
- 70) TSIMIDOU, M., TSATSARONI, E. Stability of saffron pigments in aqueous extracts. **J. Food Sci.**, Chicago, v.58, n.5, p.1073-1075, 1993.
- 71) WALTER Jr., W.M., PURCELL, A.E. Lipid autoxidation in precooked dehydrated sweet potato flakes stored in air. **J. Agric. Food Chem.** Washington, v.22, n.2, p.298-302, 1974.

## CAPÍTULO 2

# **CINÉTICA DE DEGRADAÇÃO DE $\beta$ -CAROTENO EM SISTEMA-MODELO DE BAIXA UMIDADE À TEMPERATURA AMBIENTE**

Trabalho a ser enviado à Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos

## CINÉTICA DE DEGRADAÇÃO DE $\beta$ -CAROTENO EM SISTEMA-MODELO DE BAIXA UMIDADE À TEMPERATURA AMBIENTE

Marisa Padula\*, Délia Rodriguez-Amaya\*\*, Paulo Roberto N. Carvalho\*

### RESUMO

A cinética de degradação do  $\beta$ -caroteno, na presença e ausência de luz, e a formação de compostos de degradação não-voláteis foram acompanhadas em sistema-modelo de baixa umidade. Um aparelho foi especialmente construído para oxidação do pigmento em condições controladas. O oxigênio foi mantido constante durante todo o experimento e houve pouca alteração da atividade de água do sistema-modelo. O trabalho foi conduzido à temperatura de 30°C, simulando a estocagem de alimentos desidratados. Na ausência de luz foi observada cinética de primeira ordem, enquanto na presença de luz, a cinética de ordem zero foi a que melhor se adequou. Os produtos não-voláteis formados foram epoxycarotenóides, apocarotenóides, hidroxycarotenóide e isômeros *cis* de  $\beta$ -caroteno. Sendo produtos intermediários da oxidação, as concentrações destes compostos oscilaram no decorrer da oxidação.

**Palavras – chave:**  $\beta$ -caroteno, degradação, cinética, produtos não-voláteis.

### SUMMARY

The kinetics of  $\beta$ -carotene degradation, in the presence or absence of light, and the formation of non-volatile degradation products were investigated in a low-moisture model system. An apparatus was especially constructed for the oxidation of the pigment under controlled conditions. Oxygen was maintained constant throughout the experiment and there was little alteration of the water activity of the model system. The work was conducted at a temperature of 30°C, simulating storage of dehydrated foods. A first order kinetics was observed in the absence of light, while a zero order kinetics was more suitable in the presence of light. Non-volatile oxidation products formed were epoxycarotenoids, apocarotenoids and hydroxycarotenoid. Since these are intermediate products of the degradation process, their concentrations oscillated during the oxidation.

**Key words:**  $\beta$ -carotene, degradation, kinetics, non-volatile compounds.

\* Instituto de Tecnologia de Alimentos. Av. Brasil, 2880 – Campinas – SP – CEP: 13.073-001

\*\* Departamento de Ciência de Alimentos – Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP – Barão Geraldo – Campinas – SP – CEP: 13.083-970

## 1. INTRODUÇÃO

Os carotenóides estão largamente distribuídos na natureza e são responsáveis pelas cores amarela, laranja e vermelha de frutas, raízes, flores, peixes, crustáceos, aves, e ainda são encontrados em algas, bactérias, leveduras e fungos.

A importância dos carotenóides extrapola sua importância como pigmento natural. Os carotenóides apresentam funções ou ações biológicas importantes, como atividade pró-vitâmica A, fortalecimento do sistema imunológico e decréscimo do risco a doenças degenerativas como câncer, doenças cardiovasculares, formação de catarata e degeneração macular. Estes últimos efeitos biológicos são independentes da atividade pró-vitâmica A e têm sido atribuído às propriedades antioxidantes dos carotenóides, através do seqüestro de oxigênio singlete e desativação de radicais livres.

Um dos mais importantes carotenóides é o  $\beta$ -caroteno pela sua atividade pró-vitâmica A e ampla distribuição na natureza. Praticamente todos os alimentos carotenogênicos contêm  $\beta$ -caroteno, ou como pigmento principal ou entre seus menores constituintes.

Porém, o  $\beta$ -caroteno, como os outros carotenóides, é instável e susceptível à oxidação e à isomerização. É conhecido que calor, luz e presença de ácidos induzem a isomerização. A oxidação depende da disponibilidade de oxigênio e é estimulada pela luz, calor, presença de metais, enzimas, peróxidos e é inibida por antioxidantes.

Pela sua importância, a degradação do  $\beta$ -caroteno e os parâmetros que a influenciam têm atraído a atenção de vários pesquisadores. Estudos foram publicados envolvendo a determinação da cinética e a velocidade de degradação do  $\beta$ -caroteno em sistemas-modelos de baixa umidade, simulando alimentos desidratados (2, 4, 19, 20, 21, 22), em sistemas-modelos líquidos (5, 10, 16) e mesmo em sucos de cenoura e tomate (15).

A degradação do  $\beta$ -caroteno em sistemas-modelos de baixa umidade segue a cinética de primeira ordem. A velocidade de degradação nestas condições é afetada pela atividade de água e pela temperatura. Existem algumas divergências, como a presença ou não de período de indução e a influência da pressão parcial de oxigênio na constante de velocidade de reação.

STEFANOVICH e KAREL(21) relataram que a concentração inicial de  $\beta$ -caroteno em um sistema modelo sólido influenciava a velocidade de degradação do pigmento e que esta dependência estava relacionada com a espessura da camada do pigmento no qual a difusão do oxigênio seria um fator limitante. A área específica do suporte sólido utilizado também deveria ser considerada. Porém, concluiu-se que acima de 3mg de  $\beta$ -caroteno por grama de sistema-modelo, a constante da velocidade de degradação era independente da concentração. SAGUY *et al.*(20) concluíram também que, entre aproximadamente 2 a 4 mg/g, a concentração de  $\beta$ -caroteno normalmente encontrada em alimentos desidratados, a velocidade de reação era independente da concentração, sendo afetada somente a concentrações menores que 1mg/g.

Para sistemas-modelos de baixa umidade, a oxidação do  $\beta$ -caroteno foi geralmente conduzida a temperaturas que variaram de 5 a 35°C e em ausência de luz. STEFANOVICH e KAREL (21) acompanharam a degradação a temperaturas entre 60 e 80°C, simulando as condições envolvidas na secagem de alimentos.

Para sistemas líquidos, os resultados foram conflitantes. MINGUEZ-MOSQUERA e JAREN-GALAN (10) e PESEK e WARTHESEN (15, 16) encontraram cinética de primeira ordem para degradação do  $\beta$ -caroteno em sistemas-modelos aquosos, a temperaturas entre 4 e 45°C, com exposição ou não à luz. Já KANASAWUD e CROUZET (5) encontraram cinética de ordem zero para  $\beta$ -caroteno oxidado a 97°C. MINGUEZ-MOSQUERA e JAREN-GALAN (10) observaram cinética de ordem zero para sistemas-modelos líquidos e anidros.

A formação de compostos de degradação não-voláteis foi estudada principalmente em altas temperaturas, como, a 180°C por 2 horas (7, 8, 9), 210°C por 4 horas (13), a 97°C (5) e 210°C por diversos tempos (11, 12).

Na maioria dos trabalhos, foram detectados epoxicarotenóides e apocarotenóides, sendo encontrados também cetocarotenóides e hidroxicarotenóides.

A formação de isômeros foi avaliada por PESEK e WARTHESEN (17, 18) em sistemas-modelos líquidos, a temperaturas de 25 e 45°C na ausência de luz e a 28°C na presença e na ausência de luz. Notaram que a 28°C na presença de luz, a formação do 9-*cis*- $\beta$ -

caroteno era favorecida em relação ao 13-*cis*- $\beta$ -caroteno e que o inverso foi observado na ausência de luz.

O presente trabalho teve como objetivo estudar a cinética de degradação do  $\beta$ -caroteno, na presença e na ausência de luz, e a formação de compostos de degradação não-voláteis, em sistema-modelo de baixa umidade. Foram levadas em conta a concentração do pigmento e a atividade de água que melhor representassem os alimentos desidratados. A temperatura de 30°C foi escolhida pela quase ausência de informações sobre os aspectos citados, a esta temperatura, comum na estocagem de alimentos no Brasil. O oxigênio foi mantido constante durante todo o experimento.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Material

O sistema-modelo foi preparado utilizando-se  $\beta$ -caroteno cristal (Lote 404089) fornecido pela Hoffman-La Roche, Basel, Suíça, e celulose microcristalina (CMC) Sigmacell 50 da Sigma Chemical Company. O experimento na presença de luz, para estudo da cinética, também foi acompanhado com  $\beta$ -caroteno cristal da Sigma Chemical Company. A oxidação também foi estudada com  $\beta$ -caroteno comercial, encapsulado, marca BASF, dispersível em água e em concentração de 10%.

### 2.2 Métodos

#### 2.2.1 Construção do aparelho para oxidação do pigmento

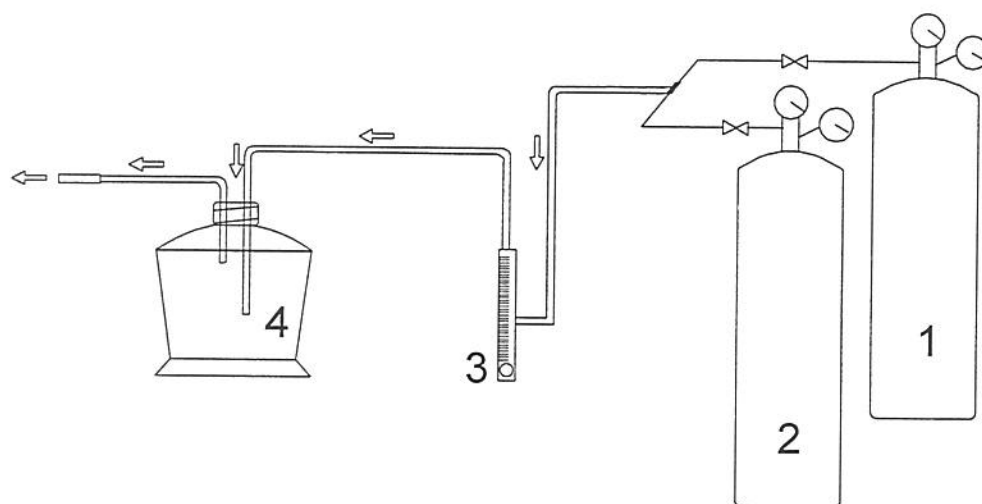
A oxidação de  $\beta$ -caroteno foi acompanhada utilizando-se um aparelho projetado e construído considerando os aspectos descritos a seguir:

- a atividade de água do sistema-modelo deveria ser mantida praticamente constante durante a oxidação do pigmento;
- a pressão parcial de oxigênio deveria ficar constante durante todo o experimento;



- o aparelho não deveria permitir a contaminação do sistema-modelo com agentes pró-oxidantes ou mesmo por outros agentes que poderiam alterar a composição do espaço-livre do dessecador;
- a retirada periódica de amostras para análise dos produtos de degradação não-voláteis deveria ser possível.

A Figura 1 apresenta um esquema do aparelho construído para oxidação de pigmentos.



**FIGURA 1.** Esquema do aparelho de oxidação. 1-cilindro de nitrogênio, 2-cilindro de ar sintético, 3-rotâmetro e 4-dessecador.

Construído em uma câmara com temperatura controlada ( $30 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ), o aparelho consistia em um dessecador de vidro incolor e transparente, com capacidade volumétrica de dois litros, conectado a frasco lavador, rotâmetro e cilindros pressurizados de ar sintético super seco e nitrogênio ultra puro. O aparelho permitia a passagem de ar sintético super seco a uma vazão de 5mL/minuto. Todas as conexões do sistema eram de aço inox e anilhas de teflon e as entradas e saídas do dessecador e frasco lavador eram de vidro para evitar a contaminação do sistema-modelo.

O aparelho permitia também o uso de nitrogênio ( $\text{N}_2$ ), o qual era acionado durante a coleta dos componentes voláteis estudado em outro trabalho (14).

A vazão dos gases era controlada pela pressão de saída do cilindro, através de válvulas de duplo estágio com membrana de aço inox e por um rotâmetro (controlador de vazão) colocado na linha dos gases (Figura 1).

A porcentagem de oxigênio no dessecador ficou constante e próxima a do ar sintético e foi controlada analisando-se alíquotas do espaço-livre do dessecador em um cromatógrafo a gás com detector de condutividade térmica.

Os experimentos foram conduzidos na presença e na ausência de luz. No primeiro caso, foram utilizadas duas lâmpadas incandescentes de 100W da própria câmara, distantes aproximadamente 1,50m, as quais ficavam ligadas 24 horas por dia.

### 2.2.2 Preparação do sistema-modelo

O sistema-modelo foi preparado combinando-se  $\beta$ -caroteno em cloreto de metileno e celulose microcristalina (CMC), de acordo com o procedimento utilizado por CHOU e BREENE (2), GOLDMAN *et al.* (4), RAMAKRISHNAN e FRANCIS (19). A CMC foi previamente seca a 75°C por 24 horas em estufa a vácuo. A mistura foi feita em um almofariz de porcelana com pistilo e homogeneizada até que o  $\beta$ -caroteno estivesse em uma avaliação visual, uniformemente distribuído sobre a CMC. O cloreto de metileno e o oxigênio adsorvidos foram removidos mantendo-se o sistema-modelo preparado sob vácuo por duas horas. Todas as etapas foram conduzidas com o carotenóide protegido da luz. O sistema-modelo continha, ao final, de 2,8 a 4,5mg de  $\beta$ -caroteno por g de sólido seco.

### 2.2.3 Oxidação do $\beta$ -caroteno

Entre 0,8 e 1,0g do sistema-modelo preparado foi cuidadosamente pesado em uma balança analítica e colocado rapidamente e uniformemente distribuído em vidro relógio de tamanho apropriado. Os vidros-relógios foram colocados no dessecador, o qual permitia a colocação de seis vidros-relógios.

O experimento foi conduzido várias vezes à temperatura de  $30 \pm 2^\circ\text{C}$  na presença e na ausência de luz.

#### *2.2.4 Determinação da isoterma de adsorção de umidade da CMC*

A isoterma de adsorção de umidade da CMC foi obtida através da exposição do produto a ambientes com doze diferentes umidades relativas, conseguidas por meio de soluções saturadas de sais, e mantidos à temperatura de 30°C, por tempo suficiente para estabilização do peso da amostra. Após este período, foram calculadas as umidades de equilíbrio, para cada condição de umidade relativa, sendo os dados plotados em um gráfico de umidade de equilíbrio versus atividade de água (umidade relativa/100).

A isoterma foi obtida com auxílio do equipamento Novasina modelo EEJA/3 BAG acoplado a uma câmara condicionadora modelo aw-Box.

#### *2.2.5 Determinação da atividade de água ( $A_w$ ) do sistema-modelo*

A atividade de água do sistema-modelo imediatamente após a sua preparação e ao final do processo de oxidação foi determinada no equipamento Novasina modelo EEJA/3 BAG, acoplado a uma câmara condicionadora modelo aw-Box.

#### *2.2.6 Determinação do teor de $\beta$ -caroteno total*

Periodicamente, amostras do sistema-modelo foram retiradas do dessecador do aparelho de oxidação e avaliadas quanto ao teor de carotenóide total.

O pigmento foi extraído com acetona p.a. resfriada e a seguir transferido, em um funil de separação com auxílio de água, para hexano de pureza adequada para cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

A absorvância do  $\beta$ -caroteno foi medida em um espectrofotômetro UV- Visível Perkin Elmer de feixe duplo, modelo Lambda 3B, acoplado a um registrador. Em alguns casos foi utilizado também um espectrofotômetro UV- Visível Hitachi U-2000 com monitor e impressora acoplados. Todas as etapas foram conduzidas com as luzes apagadas.

A quantificação do  $\beta$ -caroteno foi feita a partir da absorvância máxima, aproximadamente 450nm, usando-se a Lei de Beer. O coeficiente de absorção utilizado, 2592, foi obtido da tabela apresentada por DAVIES (3). Os resultados foram expressos em  $\mu\text{g}$  de  $\beta$ -caroteno/g de sistema-modelo.

### ***2.2.7 Compostos de degradação não-voláteis. Cromatografia líquida de alta eficiência***

A formação de compostos de degradação não-voláteis durante a oxidação do  $\beta$ -caroteno foi acompanhada por CLAE. Foi empregado um cromatógrafo a líquido Varian, modelo 8500 equipado com detector de conjunto de diodos na região de UV-Visível, marca Shimadzu SPD-M6A. A separação foi conduzida em uma coluna de fase reversa  $C_{18}$ , de 250 x 4,6mm de diâmetro interno (d.i.), tamanho de partícula de 5 $\mu\text{m}$ , marca Vydac, com coluna de guarda de 10mm e d.i de 4,6mm. Como fase móvel, foi utilizada 2% de água, deionizada e destilada, em metanol a uma vazão de 1,5mL/min e eluição isocrática. O volume de amostra injetado foi de 10  $\mu\text{L}$ .

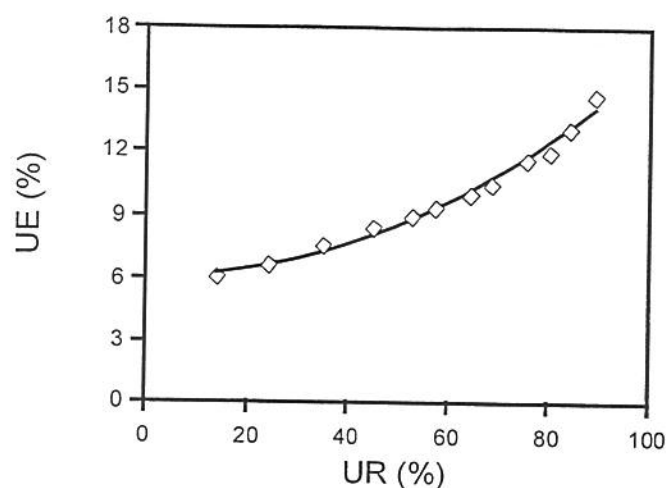
O  $\beta$ -caroteno do sistema-modelo foi extraído conforme descrito para determinação do teor de  $\beta$ -caroteno total, a seguir o extrato foi concentrado em um rotoevaporador, filtrado e injetado no cromatógrafo líquido de alta eficiência.

A identificação dos compostos formados foi feita combinando-se o tempo de retenção, o espectro de absorção na região visível, obtido com o detector de conjunto de diodos, reações químicas monitoradas por CLAE e uso de CLAE com detector de massas. A identificação destes compostos foi discutida em outro trabalho (14).

## **3. RESULTADOS**

### **3.1 Isoterma de adsorção de umidade e atividade de água**

A isoterma de adsorção de umidade obtida para a celulose microcristalina (CMC) está apresentada na Figura 2. A isoterma mostra as variações na umidade de equilíbrio em função de diferentes atividades de água.



**FIGURA 2.** Isoterma de adsorção de umidade da celulose microcristalina (CMC) à temperatura de 30°C. UE – umidade de equilíbrio; UR – umidade relativa.

O conteúdo de umidade na monocamada, calculado utilizando-se a equação de BET (Brunauer-Emmett-Teller), foi de aproximadamente 5g de água/g de produto seco, que corresponde à atividade de água inferior a 0,11.

Este teor de umidade da monocamada é superior aos valores obtidos por CHOU e BREENE (2) e por RAMAKRISHNAN e FRANCIS (19), os quais foram 3,31 e 2,8g de água/100g de produto seco, respectivamente. Por outro lado, a atividade de água de equilíbrio na monocamada está abaixo da observada por estes mesmos pesquisadores, a saber, 0,24 e 0,18, respectivamente.

Embora todos fossem CMC, a diferença de comportamento observada pode ser atribuída às diferentes características dos suportes utilizados, como superfície exposta, tamanho, forma e distribuição dos poros.

A atividade de água inicial do sistema-modelo foi 0,48. Nesta atividade de água, a umidade de equilíbrio do sistema foi em torno de 9,3g de água/ 100g de produto seco. Após a oxidação do  $\beta$ -caroteno, a atividade de água determinada foi de 0,45, que corresponde à umidade de equilíbrio de 9,0%. Estes dados mostram que a atividade de água do sistema-modelo se alterou pouco durante o experimento.

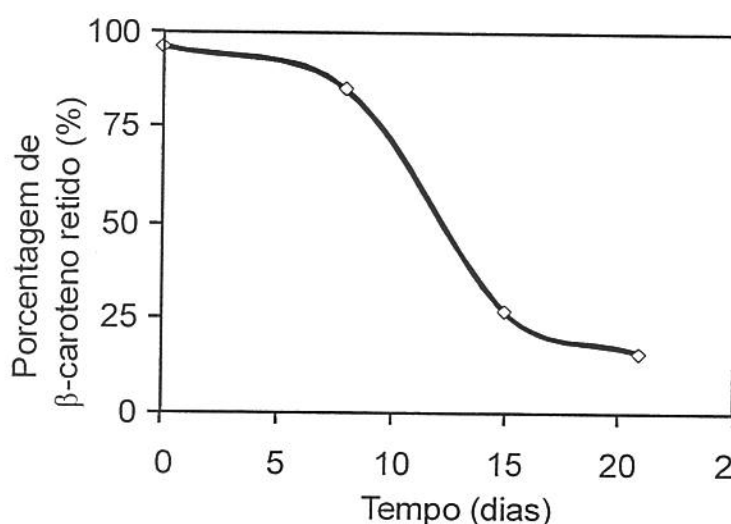
A literatura mostra que a atividade de água de um sistema desidratado influencia a degradação do pigmento. Vários pesquisadores demonstraram que com o aumento da atividade de água, a velocidade de degradação dos pigmentos diminuía (2, 4, 6, 19).

Outros autores indicaram que com o aumento da atividade de água, há também aumento da velocidade de degradação (1, 23).

A atividade de água de 0,45-0,48 é semelhante à normalmente encontrada em alimentos desidratados e próxima à atividade de água de 0,43 encontrada por ARYA *et al.*(1), tida como a mais estável para carotenóides.

### 3.2 Cinética de degradação

A perda de  $\beta$ -caroteno na ausência de luz e a temperatura de 30°C está apresentada na Figura 3. O resultado mostrou uma curva com formato sigmoidal, característica de reações de radicais livres, com períodos de indução, propagação e terminação.



**FIGURA 3.** Retenção de  $\beta$ -caroteno em função do tempo, na ausência de luz e à temperatura de 30°C.

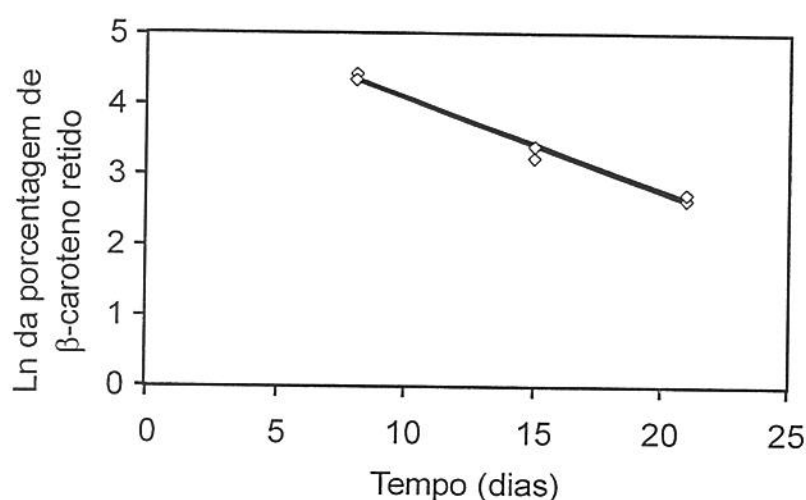
Resultado semelhante foi apresentado por GOLDMAN *et al.* (4), quando avaliaram a degradação de  $\beta$ -caroteno em um sistema-modelo semelhante ao utilizado neste estudo, à temperatura de 35°C e ausência de luz.

No presente trabalho ficou evidente a presença do período de indução. Os resultados apresentados na literatura são conflitantes neste aspecto, já que este foi observado somente por alguns pesquisadores, além de GOLDMAN *et al.* (4), como CHOU e



BREENE (2) que relataram a presença do período de indução quando foi utilizado o antioxidante hidroxitolueno butilado (BHT) para retardar a oxidação do  $\beta$ -caroteno, e por STEFANOVICH e KAREL (21), os quais concluíram que o período de indução varia com a concentração inicial do pigmento e com a temperatura.

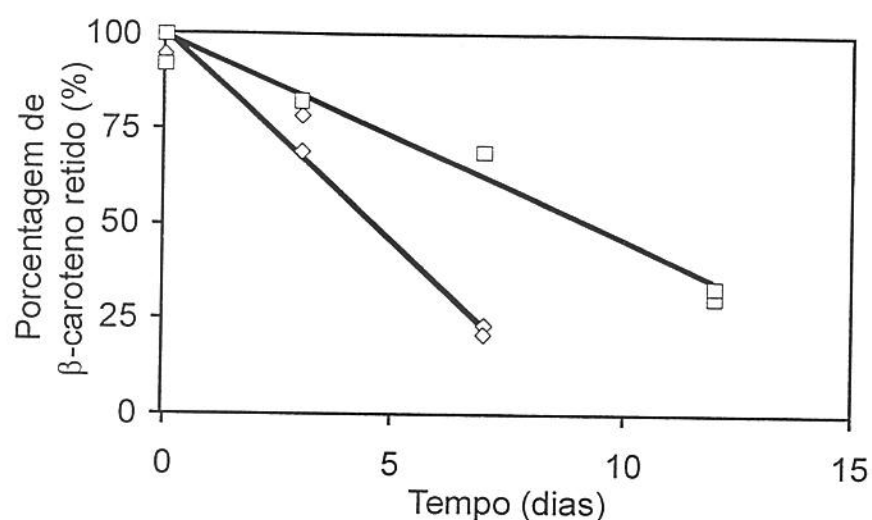
Após o período de indução, a degradação do  $\beta$ -caroteno seguiu a cinética de reação de primeira ordem, como mostra a Figura 4. A perda deste pigmento foi condizente com uma curva em exponencial e com uma reta, quando utilizada a escala semilogarítmica,  $\ln$ .



**FIGURA 4.** Cinética de reação de primeira ordem para degradação de  $\beta$ -caroteno na ausência de luz à temperatura de 30°C.

A constante de velocidade de reação ( $k$ ) determinada foi de 0,1303mg de carotenóide  $\cdot g^{-1} \cdot dia^{-1}$  e o coeficiente de correlação ( $r^2$ ) obtido foi de 0,958. A aplicação do teste  $t$  mostrou que a correlação obtida é significativa a 0,1%.

A perda de  $\beta$ -caroteno, quando exposto à luz e à temperatura de 30°C, foi acompanhada em dois experimentos e está demonstrada na Figura 5.



**FIGURA 5.** Retenção de  $\beta$ -caroteno em função do tempo quando exposto à luz e à temperatura de 30°C. Marca A (  $\diamond$  ) e Marca B (  $\square$  ).

A oxidação do  $\beta$ -caroteno em presença de luz não apresentou a forma sigmoidal observada para este mesmo pigmento na ausência de luz. Não ficou evidente o período de indução e a cinética de reação que melhor se adequou aos experimentos foi de ordem zero. A Tabela 1 apresenta as constantes de velocidade de reação, os coeficientes de correlação e as meias vidas. A aplicação do teste  $t$  mostrou que a significância da correlação para estes experimentos foi de 0,1%.

**TABELA 1.** Constantes de velocidade de degradação de  $\beta$ -caroteno (cinética de ordem zero) obtidas a 30°C e em presença de luz.

|         | Constante de<br>velocidade de<br>reação ( $\text{dia}^{-1}$ ) | Correlação<br>( $r^2$ ) | Meia-vida<br>(dias) |
|---------|---------------------------------------------------------------|-------------------------|---------------------|
| Marca A | -0,3063                                                       | 0,972                   | 4,76                |
| Marca B | -0,1562                                                       | 0,958                   | 9,63                |

Comparando as constantes de velocidade de reação encontradas neste estudo, a velocidade é 1,2 a 2,3 mais rápida na presença de luz que em ausência de luz.

As diferenças obtidas entre os resultados de constante de velocidade observados para a oxidação de  $\beta$ -caroteno em presença de luz pode ser explicada pelo fato dos pigmentos utilizados serem de origens diferentes e terem sido feitos em épocas diferentes, confirmando o cuidado que se deve ter na comparação de resultados.

Vários autores (2, 19, 21, 22) constataram uma cinética de primeira ordem para a degradação do  $\beta$ -caroteno em sistema de baixa umidade, na ausência de luz, em concordância com os resultados do presente trabalho.

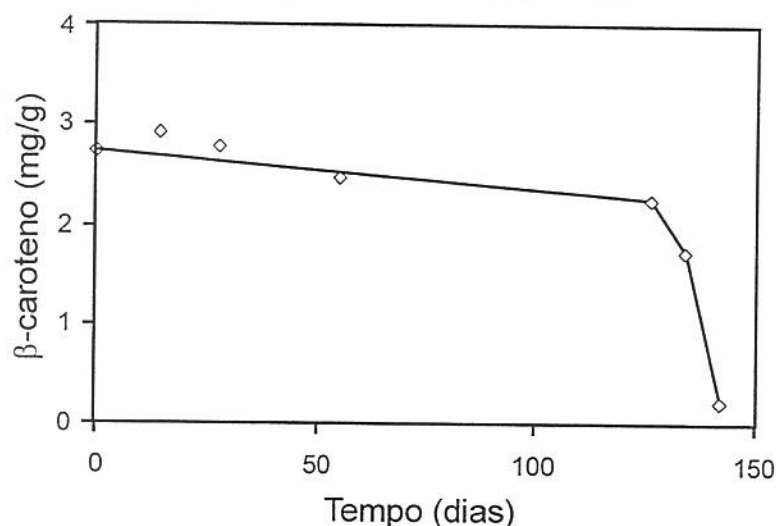
As constantes de velocidade de reação obtidas estão na mesma ordem de grandeza das obtidas por CHOU e BREENE (2); RAMAKRISHNAN e FRANCIS (19) e TEIXEIRA NETO *et al.* (22). As pequenas variações podem ser explicadas por diferenças nos sistemas-modelos, suportes utilizados, atividade de água, concentração inicial do pigmento e mesmo disponibilidade de oxigênio e temperatura.

Na literatura consultada, não foram encontradas referências sobre a cinética de degradação de  $\beta$ -caroteno em sistema-modelo de baixa umidade, na presença de luz.

Autores como KANASAWUD e CROUZET (5) observaram que a cinética de degradação do  $\beta$ -caroteno em sistema aquoso segue cinética de ordem zero quando aquecido a 97°C e em presença de ar atmosférico ou oxigênio. Resultados opostos foram obtidos por MINGUEZ-MOSQUERA e JAREN-GALAN (10), que mostraram que a cinética de descoloração do  $\beta$ -caroteno em meio aquoso, em diferentes temperaturas (15,25,35 e 45°C), exposto ou não à luz, segue cinética de primeira ordem. Estes mesmos autores mostraram que em meio anidro, como em ciclohexano e etanol absoluto, a degradação do  $\beta$ -caroteno segue cinética de ordem zero, em todas as temperaturas e condições estudadas. As constantes de velocidade de degradação foram maiores em meio anidro do que em meio aquoso.

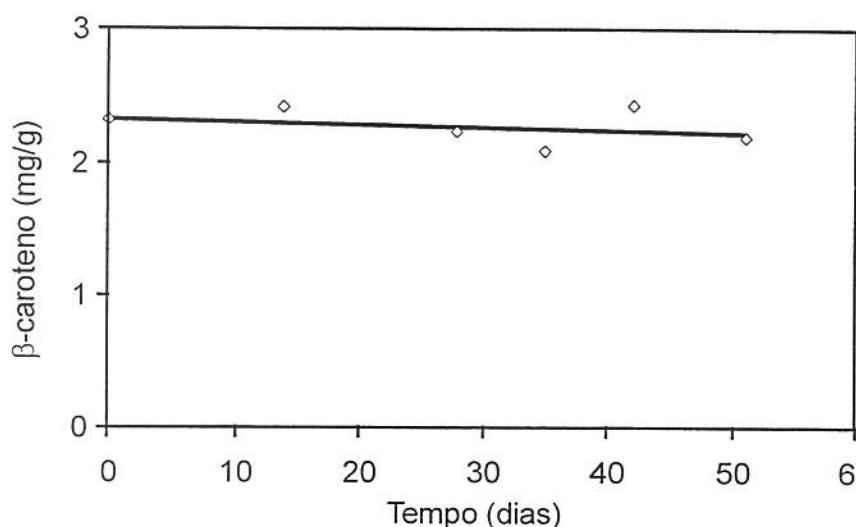
Estes resultados parecem indicar que em condições mais drásticas de degradação como temperaturas mais elevadas, presença de luz e sistemas onde não se tenha água disponível, a cinética de degradação do  $\beta$ -caroteno pode ser alterada, devendo este aspecto ser avaliado com mais cuidado.

A presença do período de indução na oxidação do  $\beta$ -caroteno ficou bastante evidente quando foi conduzida a oxidação de  $\beta$ -caroteno comercial, dispersível em água. Neste caso específico o  $\beta$ -caroteno é protegido (encapsulado), e a sua oxidação é retardada. A Figura 6 apresenta a perda de  $\beta$ -caroteno comercial em função do tempo, a 30° C e em ausência de luz. Como pode ser observado o período de indução é de aproximadamente 120 dias, seguido por uma degradação rápida do pigmento.



**FIGURA 6.** Perda de  $\beta$ -caroteno comercial em função do tempo, a 30°C e em ausência de luz.

A degradação do  $\beta$ -caroteno comercial foi também conduzida na presença de luz, à temperatura de 30°C (Figura 7). Mesmo com a presença de luz até 51 dias, a degradação do pigmento ainda estava no período de indução.



**FIGURA 7.** Perda de  $\beta$ -caroteno comercial em função do tempo na presença de luz e a 30°C.

### 3.3 Formação de compostos de degradação não-voláteis

Nas Tabelas 2 e 3, estão apresentados os compostos de degradação não-voláteis formados durante a degradação do  $\beta$ -caroteno cristal à temperatura de 30°C, quando exposto ou não à luz. Embora haja alguma variação, os produtos não voláteis são epoxycarotenóides, apocarotenóides e hidroxycarotenóide.

**TABELA 2.** Compostos de degradação não-voláteis formados durante a oxidação do  $\beta$ -caroteno cristal à temperatura de 30°C, na presença de luz.

| Carotenóide                              | Tempo (dias) |   |   |
|------------------------------------------|--------------|---|---|
|                                          | 0            | 3 | 7 |
| $\beta$ - apo - 14' - carotenal          | -            | + | + |
| $\beta$ - apo - 12' - carotenal          | -            | - | + |
| 5,8 - epoxi - $\beta$ -caroteno          | +            | - | + |
| $\beta$ - apo - 10' - carotenal          | -            | - | + |
| 4 - hidroxí - $\beta$ -caroteno          | -            | - | + |
| 5,6, 5',6' - diepóxi - $\beta$ -caroteno | -            | + | + |
| 9- <i>cis</i> - $\beta$ -caroteno        | -            | - | + |
| 13- <i>cis</i> - $\beta$ -caroteno       | -            | - | + |

- não detectado; + detectado

**TABELA 3.** Compostos de degradação não-voláteis formados durante a oxidação do  $\beta$ -caroteno cristal à temperatura de 30°C, na ausência de luz.

| Carotenóide                              | Tempo (dias) |   |    |    |
|------------------------------------------|--------------|---|----|----|
|                                          | 2            | 8 | 15 | 21 |
| 5,8, 5',8' - diepóxi - $\beta$ -caroteno | -            | + | -  | -  |
| $\beta$ - apo - 14' - carotenal          | -            | + | +  | +  |
| $\beta$ - apo - 12' - carotenal          | -            | - | +  | -  |
| $\beta$ - apo - 10' - carotenal          | -            | + | -  | +  |
| 5, 8 - epoxi - $\beta$ -caroteno         | -            | - | -  | +  |
| $\beta$ - apo - 8' - carotenal           | -            | + | -  | -  |
| 4 hidroxí - $\beta$ -caroteno            | -            | - | +  | +  |
| 5,6, 5',6' - diepóxi - $\beta$ -caroteno | +            | + | +  | +  |
| 13- <i>cis</i> - $\beta$ -caroteno       | +            | + | +  | +  |

- não detectado; + detectado

Sendo produtos intermediários da oxidação, é de se esperar que as concentrações destes compostos não-voláteis oscilem no decorrer da oxidação.

Foram detectados no presente trabalho os epoxicarotenóides 5,6,5',6'-diepóxi- $\beta$ -caroteno, 5,8-epóxi- $\beta$ -caroteno e 5,8,5',8'-diepóxi do  $\beta$ -caroteno. Estes mesmos compostos foram observados por MARTY e BERSET (7) e por KANASAWUD e CROUZET (5), embora estes autores tenham utilizado temperaturas mais elevadas para degradação do  $\beta$ -caroteno. KANASAWUD e CROUZET (5) também consideraram os epóxidos como produtos intermediários do processo e ainda sugeriram o mutacromo e o aurocromo como precursores de alguns produtos voláteis.

Foi também identificado neste trabalho um composto formado por reação de hidroxilação, 4-hidroxi- $\beta$ -caroteno. A hidroxilação foi sugerida também por MARTY e BERSET (8), embora essas autoras tenham errado na posição do grupo hidroxila apesar do teste positivo para uma hidroxila na posição alílica.

A formação de apocarotenais foi também observada no presente trabalho. No  $\beta$ -caroteno exposto à luz, foram encontrados os apocarotenais  $\beta$ -apo-10'-carotenal,  $\beta$ -apo-12'-carotenal e  $\beta$ -apo-14'-carotenal, enquanto para o  $\beta$ -caroteno oxidado na ausência de luz, foram identificados os compostos  $\beta$ -apo-8'-carotenal,  $\beta$ -apo-10'-carotenal,  $\beta$ -apo-12'-carotenal e  $\beta$ -apo-14'-carotenal. O aparecimento destes mesmos apocarotenais foi relatado por MARTY e BERSET (8), após o  $\beta$ -caroteno ter sido submetido ao processo de extrusão. O  $\beta$ -apo-14'-carotenal foi também detectado por OUYANG *et al.* (13), durante a simulação da desodorização de óleo de dendê a 210°C, por quatro horas e com vácuo.

Quanto à isomerização, na presença de luz e após 7 dias foram identificados dois *cis* isômeros, 9 e 13-*cis*- $\beta$ -caroteno, enquanto na ausência de luz, somente o 13-*cis*- $\beta$ -caroteno foi detectado.

PESEK & WARTHESEN (17) relataram que a formação do isômero 13-*cis*- $\beta$ -caroteno é favorecida na ausência de luz e que o isômero 9-*cis*- $\beta$ -caroteno é favorecido na presença de luz em um sistema líquido e à temperatura de 28°C.



Os compostos de degradação formados durante a oxidação do  $\beta$ -caroteno encapsulado estão apresentados nas Tabelas 4 e 5, respectivamente, para os pigmentos expostos ou não à luz.

**TABELA 4.** Compostos de degradação não-voláteis formados durante a oxidação do  $\beta$ -caroteno encapsulado à temperatura de 30°C, na presença de luz.

| Carotenóide                              | Tempo (dias) |    |    |    |    |
|------------------------------------------|--------------|----|----|----|----|
|                                          | 0            | 14 | 28 | 35 | 42 |
| $\beta$ - apo - 10' - carotenal          | -            | +  | -  | -  | +  |
| não identificado                         | -            | +  | +  | +  | +  |
| 5,6, 5',6' - diepóxi - $\beta$ -caroteno | -            | -  | -  | -  | +  |
| 13- <i>cis</i> - $\beta$ -caroteno       | +            | +  | +  | +  | +  |

- não detectado; + detectado

**TABELA 5.** Compostos de degradação não-voláteis formados durante a oxidação do  $\beta$ -caroteno encapsulado à temperatura de 30°C, na ausência de luz.

| Carotenóide                              | Tempo (dias) |     |
|------------------------------------------|--------------|-----|
|                                          | 55           | 126 |
| Não identificado                         | -            | +   |
| $\beta$ - apo - 10' - carotenal          | -            | +   |
| $\beta$ - apo - 8' - carotenal           | -            | +   |
| 5,6, 5',6' - diepoxi - $\beta$ -caroteno | -            | +   |
| 13- <i>cis</i> - $\beta$ -caroteno       | -            | +   |
| 9- <i>cis</i> - $\beta$ -caroteno        | +            | -   |

- não detectado; + detectado

Provavelmente por ter sido acompanhado durante um tempo maior, o  $\beta$ -caroteno encapsulado em ausência de luz apresentou maior número de compostos de degradação quando comparado ao exposto à luz. Foi observada a formação de epóxidos e apocarotenais. Não ficou evidente, para o  $\beta$ -caroteno encapsulado, a formação de compostos hidroxilados.

Na oxidação do  $\beta$ -caroteno encapsulado exposto à luz foram identificados somente  $\beta$ -apo-10'-carotenal, 5,6, 5',6'- diepóxi- $\beta$ -caroteno e *cis*- $\beta$ -caroteno, o que é coerente, pois até na época analisada a oxidação ainda estava no período de indução. Para este experimento, foi observado em todas as épocas um pigmento com absorção máxima a 411nm, o qual não foi possível identificar.

Na presença de luz, somente o 13-*cis*- $\beta$ -caroteno foi observado, enquanto na ausência de luz, ambos, 9-*cis*- e 13-*cis*- $\beta$ -caroteno foram detectados. Estes resultados contrariam os obtidos com  $\beta$ -caroteno cristal e os dados apresentados por PESEK e WARTHESEN (17). Sendo produtos iniciais do processo de degradação, a oscilação destes isômeros é compreensível, a exemplo dos epoxicarotenóides e apocarotenóides.

#### 4. CONCLUSÃO

À temperatura de 30°C, a degradação do  $\beta$ -caroteno em sistema-modelo de baixa umidade, com atividade de água próxima a 0,45 e em presença de 21% de oxigênio, na ausência de luz, apresentou uma curva sigmoidal, com períodos de indução e propagação, característicos de reações de radicais livres e semelhante ao que ocorre com lipídeos. A cinética de degradação foi compatível com reação de primeira ordem.

Na presença de luz, não foi observado o período de indução e a reação obedeceu uma cinética de ordem zero.

Os produtos de degradação não voláteis formados na presença e na ausência de luz e à temperatura de 30°C foram epóxidos, apocarotenais e um composto hidroxilado. Foram detectados também *cis*-isômeros de  $\beta$ -caroteno. Sendo intermediários do processo de oxidação, não houve acúmulo destes durante todo o processo de oxidação, e nem todos foram detectados nas diferentes épocas de análise.

Para o pigmento encapsulado ficou bastante evidente o período de indução, atingindo 120 dias para a oxidação na ausência de luz. Quando exposto à luz, até 51 dias a degradação do pigmento estava ainda no período de indução.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1) ARYA, S.S., NATESAN, V., PARIHAR, D.B., VIJAYARAGHAVAN, P.K. Stability of carotenoids in dehydrated carrots. **Journal of Food Technology**, London, v.14, p.579-586, 1979.

- 2) CHOU, H., BREENE, W.M. Oxidative decoloration of  $\beta$ -carotene in low-moisture model systems. **Journal of Food Science**, Chicago, v.37, p.66-68, 1972.
- 3) DAVIES, B.H. Carotenoids. In: GOODWIN, T.W. [Ed.] **Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments**. London: Academic Press, 1976. p.38-165.
- 4) GOLDMAN, M., HOREV, B., SAGUY, I. Decolorization of beta-carotene in model systems simulating dehydrated foods. Mechanism and kinetic principles. **Journal of Food Science**, Chicago, v.48, p.751-754, 1983.
- 5) KANASAWUD, P., CROUZET, J.C. Mechanism of formation of volatile compounds by thermal degradation of carotenoids in aqueous medium. 1.  $\beta$ -carotene degradation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.38, n.1, p.237-243, 1990.
- 6) MARTINEZ, F., LABUZA, T.P. Rate of deterioration of freeze-dried salmon as a function of relative humidity. **Journal of Food Science**, Chicago, v.33, p.241-247, 1968.
- 7) MARTY, C., BERSET, C. Degradation of *trans*- $\beta$ -carotene during heating in sealed glass tubes and extrusion cooking. **Journal of Food Science**, Chicago, v.51, n.3, p.698-702, 1986.
- 8) MARTY, C., BERSET, C. Degradation products of *trans*- $\beta$ -carotene produced during extrusion cooking. **Journal of Food Science**, Chicago, v.53, n.6, p.1880-1886, 1988.
- 9) MARTY, C., BERSET, C. Factors affecting the thermal degradation of *all-trans*- $\beta$ -carotene. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.38, n.4, p.1063-1067, 1990.
- 10) MINGUEZ-MOSQUERA, M.I., JAREN-GALAN, M. Kinetics of the decolouring of carotenoid pigments. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v.67, p.153-161, 1995.
- 11) ONYEWU, P.N., DAUN, H., HO, C.T. Formation of two thermal degradation products of  $\beta$ -carotene. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.30, n.6, Washington, p.1147-1151, 1982.

- 12) ONYEWU, P.N., HO, C.T., DAUN, H. Characterization of  $\beta$ -carotene thermal degradation products in a model food system. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Champaign, v.63, n.11, p.1437-1441, 1986.
- 13) OUYANG, J.M., DAUN, H., CHANG, S.S., HO, C.T. Formation of carbonyl compounds from  $\beta$ -carotene during palm oil deodorization. **Journal of Food Science**, Chicago, v.45, p.1214-1217, 1222, 1980.
- 14) PADULA, M., RODRIGUEZ-AMAYA, D. Degradation of  $\beta$ -carotene in a low-moisture model system at ambient temperature. Formation of non-volatile and volatile products. (submetido à publicação), 1998.
- 15) PESEK, C.A., WARTHESEN, J.J. Photodegradation of carotenoids in a vegetable juice system. **Journal of Food Science**, Chicago, v.52, n.3, p.744-746. 1987.
- 16) PESEK, C.A., WARTHESEN, J.J. Characterization of the photodegradation of  $\beta$ -carotene in aqueous model systems. **Journal of Food Science**, Chicago, v.53, n.5, p.1517-1520, 1988.
- 17) PESEK, C.A., WARTHESEN, J.J. Kinetic Model for photoisomerization and concomitant photodegradation of  $\beta$ -carotenes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.38, n.6, p.1313-1315, 1990.
- 18) PESEK, C.A., WARTHESEN, J.J., TAOUKIS, P.S. A kinetic model for equilibration of isomeric  $\beta$ -carotenes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.38, p.41-45, 1990.
- 19) RAMAKRISHNAN, T.V., FRANCIS, F.J. Stability of carotenoids in model aqueous systems. **Journal of Food Quality**, Westport, v.2, p.177-189, 1979.
- 20) SAGUY, I. GOLDMAN, M., KAREL, M. Prediction of  $\beta$ -carotene decolorization in model system under static and dynamic conditions of reduced oxygen environment. **Journal of Food Science**, Chicago, v.50, p.526-530, 1985.
- 21) STEFANOVICH, A. F., KAREL, M. Kinetics of beta-carotene degradation at temperatures typical of air drying of foods. **Journal of Food Processing and Preservation**, Cambridge, v.6, p.227-242, 1982.

- 22) TEIXEIRA NETO, R.O., KAREL, M., SAGUY, I., MIZRAHI, S. Oxygen uptake and  $\beta$ -carotene decoloration in a dehydrated food model. **Journal of Food Science**, Chicago, v.46, p.665-676, 1981.
- 23) TSIMIDOU, M., BILIADERIS, C.G. Kinetic studies of saffron (*Crocus sativus* L) quality deterioration. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.45, n.8, p.2890-2898, 1997.

## CAPÍTULO 3

# **DEGRADATION OF $\beta$ -CAROTENE IN A LOW-MOISTURE MODEL SYSTEM AT AMBIENT TEMPERATURE. FORMATION OF NON-VOLATILE AND VOLATILE PRODUCTS.**

*Trabalho a ser enviado à revista Journal of the Agricultural and Food Chemistry.*

## CAPÍTULO 3

# DEGRADATION OF $\beta$ -CAROTENE IN A LOW-MOISTURE MODEL SYSTEM AT AMBIENT TEMPERATURE. FORMATION OF NON-VOLATILE AND VOLATILE PRODUCTS.

Marisa Padula<sup>†</sup> e Délia Rodriguez-Amaya<sup>‡</sup>

Departamento de Ciência de Alimentos. Faculdade de Engenharia de Alimentos. Cx.P. 6121, Unicamp, Campinas, São Paulo, Brasil.

To simulate conditions during storage of dehydrated foods and to detect initial degradation products, the oxidation of  $\beta$ -carotene in a low-moisture model system was studied at ambient temperature (30°C) in the presence of light. The non-volatile compounds were identified by high performance liquid chromatography with photodiode array and mass detectors (HPLC-PDAD-MS) and chemical reactions. The volatile compounds were identified by gas chromatography with a mass detector (GC/MS). Apocarotenoids, epoxycarotenoids, a hydroxycarotenoid and *cis*-isomers were identified, confirming that the first steps in carotenoid degradation are epoxidation, apocarotenal formation and hydroxylation, the last reaction being observed only recently. Subsequent fragmentations led to the formation of volatile compounds. Aldehydes, ketones and alcohols, of two to ten carbons, were identified. Except for  $\beta$ -cyclocitral, the other volatile compounds were short acyclic compounds, which apparently came from the polyene chain. This differs from results of studies on high-temperature oxidation, which reportedly yield cyclic compounds derived from the end-groups of carotenoids or cyclic compounds possibly formed from acyclic compounds coming from the polyene chain. Mechanisms are suggested for hydroxylation, apocarotenal formation, and fragmentations.

**Key words:**  $\beta$ -carotene, degradation, non-volatile products, volatile products.

<sup>†</sup> Instituto de Tecnologia de Alimentos.

<sup>‡</sup> Depto de Ciência de Alimentos



## INTRODUCTION

Carotenoids are among the biologically active food constituents, which have drawn intense interest in recent years because of their possible health-promoting effects. Being highly unsaturated, however, carotenoids are prone to degradation during preparation, processing, and storage of foods.

During storage of dehydrated carotenogenic foods, fading of color and development of off-flavor may occur, both changes being related to carotenoid decomposition. Several investigators studied the degradation of carotenoids, principally  $\beta$ -carotene, in model systems simulating dehydrated foods (Chou and Breene, 1972; Baloch et al., 1977; Kanner et al., 1978; Arya et al., 1979; Ramakrishnan and Francis, 1979; Teixeira Neto et al., 1981; Goldman et al., 1983), generally finding first order kinetics. Goldman et al., obtained sigmoidal  $\beta$ -carotene retention curves, consisting of an induction period, a fast main period and a retardation period, characteristics of a catalytic radical reaction. A sigmoidal curve was also observed at high temperatures, typical of air drying of foods. None of the above studies involved identification of the products of degradation.

Some volatile compounds found in tea (Bricout et al., 1967; Sanderson et al., 1971; Renold et al., 1974), prune (Moutounet, 1978), grapes (Schreier et al., 1976; Strauss et al., 1986, 1987), apricot (Crouzet et al., 1983), mango (Sakho et al., 1985), passion fruit (Parliment, 1972; Engel and Tressl, 1983), guava (Idstein and Schreier, 1985), tomato (Buttery et al., 1969; Stevens, 1970) and quince fruit (Lutz and Winterhalter, 1992) have been linked with the degradation of carotenoid. These volatiles are believed to be important contributors to the typical flavor of these foods.

The formation of volatile compounds from  $\beta$ -carotene was studied in model systems at high temperature, 80°C or above (LaRoe and Shipley, 1970; Kawakani, 1982; Glória et al., 1991, Glória and Gray, 1993). Other authors identified non-volatile degradation products (Ouyang et al., 1980; Onyewu et al., 1982, 1986; Marty and Berset, 1986, 1988, 1990; Pesek and Warthesen, 1990). Only Kanasawud and Crouzet (1990) investigated both volatile and non-volatile compounds.

Glória et al (1991) and Glória and Gray (1993) also studied autoxidation at 20°C. However, the volatiles formed were collected at 60°C for 60 min by a Tenax GC trap system.

The purpose of this study was to investigate the formation of volatile and non-volatile compounds during the oxidation of  $\beta$ -carotene at ambient temperature. The reason for choosing ambient conditions was two-fold: (1) to simulate conditions during storage of dehydrated foods, and (2) to detect initial degradation products.

## MATERIALS AND METHODS

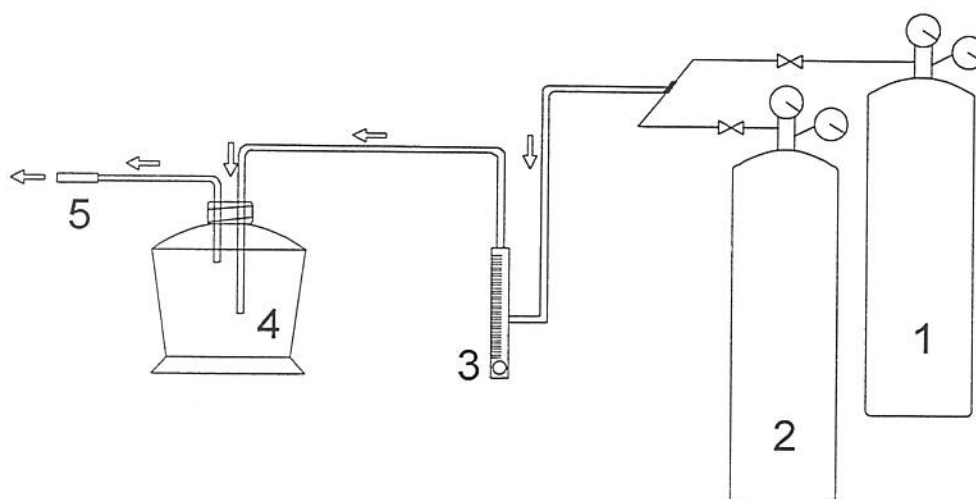
**Materials.** Crystalline  $\beta$ -carotene (lot N° 404089) was furnished by Hoffman-La Roche, Basel, Switzerland. Microcrystalline cellulose (MCC) was purchased from Sigma Chemical Company.

**Preparation of Model System.** The model system was prepared according to the procedure utilized by Chou and Breene (1972), Ramakrishnan and Francis (1979), and Goldman et al. (1983). MCC was previously dried at 75°C for 24 hours in a vacuum oven.  $\beta$ -Carotene dissolved in methylene chloride was combined with MCC, and the mixture was ground in a mortar and pestle to obtain a homogeneous powder. Methylene chloride and adsorbed air were removed under vacuum for two hours. These operations and all analytical procedures were carried out under subdued light.

The model system had a final concentration of 4.9 mg/g dry powder for the experiment carried out in the dark and 2.5 mg/g dry powder for the experiment under light exposure.

**Oxidation of  $\beta$ -Carotene.** Portions of 0.8 to 1.0 g of the prepared model system were carefully weighed and spread out uniformly in Petri dishes (50 mm diameter), which were then placed in a dessicator. The dessicator, which could accommodate six petri dishes, was connected to the oxidation apparatus shown in Figure 1. The apparatus was so designed that the following features were met: (1) the water activity ( $a_w$ ) would be practically maintained during the experiment; (2) the oxygen partial pressure would remain constant; (3) contamination of the model system with pro-oxidants and other agents that could alter the headspace composition of the dessicator could be avoided; (4) collection of

the volatiles formed by the degradation of  $\beta$ -carotene could be done without interference of the oxidation process; (5) periodic removal of portions of the model system could be done for the analysis of total  $\beta$ -carotene and the non-volatile degradation products. It consisted of a 2 L dessicator through which dry, synthetic air passed at a flow rate of 5 mL/min., without altering the partial pressure of oxygen. All tubings were of stainless steel with teflon frits. The entrance and exit of the dessicator were of glass. The set-up also permitted the use of  $N_2$  during the collection of the volatile compounds so as not to alter the volatiles adsorb on the polymer trap during the long period of capture. The gas flow rate was controlled through a double-stage valve with stainless steel membrane at the outlet of the cylinder and a flow meter was connected to the gas line.



- |                            |                |
|----------------------------|----------------|
| 1 - Nitrogen cylinder      | 4 - Dessicator |
| 2 - Synthetic air cylinder | 5 - Tenax trap |
| 3 - Flow meter             |                |

**FIGURE 1.** Apparatus for oxidation of  $\beta$ -carotene.

The oxidation experiment was carried out several times at  $30 \pm 2^\circ\text{C}$ , without and with exposure to light kept on throughout the experiment, provided by two incandescent lamps of 100W at the walk-in chamber, where the oxidation apparatus was set up.

**Determination of Total  $\beta$ -Carotene.**  $\beta$ -Carotene was exhaustively extracted with cold acetone, transferred to hexane in a separatory funnel with the help of water, and dried over anhydrous sodium sulfate. The carotenoid solution was made up to volume in a

suitable volumetric flask and the absorption read at 450nm, using a Perkin Elmer recording UV-Visible spectrophotometer, model Lambda 3B. The concentration was calculated according to Davies (1975), using  $A_{1\text{cm}}^{1\%}$  of 2592.

**Identification of Non-Volatile Oxidation Products.** Formation of the non-volatile degradation products was monitored by high-performance liquid chromatography (HPLC). A Varian liquid chromatograph equipped with a Waters photodiode array detector Model 994 was used. The separation was carried out with a C<sub>18</sub> column, 250 x 4.6 i.d. mm, Vydac 218TP54 (5µm particle size), protected by a 20mm C<sub>18</sub> guard column (5µm particle size). The mobile phase was 5% tetrahydrofuran in methanol, used isocratically at a flow rate of 1 mL/min.

β-Carotene and its degradation products were extracted as described for the determination of total β-carotene. The extract was concentrated, filtered, and injected into the liquid chromatograph.

Tentative identification was carried out with the combined use of retention time, visible absorption spectrum obtained with the photodiode array detector, and chemical reaction monitored by HPLC. Confirmation of the identity of some of the products was done by HPLC (Waters Alliance Separation Model 2690), photodiode array detector 996 and a Thermabeam Mass Detector (Integrity system).

**Identification of Volatile Oxidation Products.** The volatile compounds were captured through a Tenax (gas chromatography grade, 60-80 mesh) trap (40mm x 3 mm i.d.) located at the exit of the dessicator. Passage of synthetic air was stopped two hours before capture. Nitrogen flow was then initiated, flushing the volatiles from the dessicator headspace to the trap. Collection time was set at 15 hours, after preliminary tests at different periods.

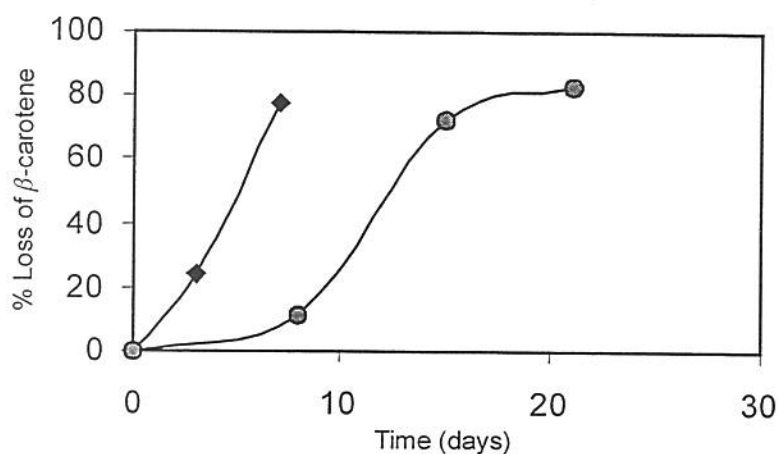
The polymer trap was conditioned before use, using ultra-pure helium at a temperature of 175°C for a minimum of eight hours. For the elution of the volatiles, HPLC grade hexane and methanol and spectrometry grade diethyl ether were tried. Diethyl ether was chosen

because it eluted a greater number of compounds, although some impurities were observed. A solvent volume of 250  $\mu\text{L}$  was found adequate.

The volatiles were identified by GC-MS. Two systems were used. One system was a GC/MS Shimadzu QP-5000 (Model 17A), fitted with a fused silica capillary column (50m x 0,25 mm i.d.) coated with polymethylsiloxane (CBP1-M-50-0,25), operated at 50°C for 10 min, then programmed at 5°C/min to 200°C, and held at this temperature for 10 min. The mass spectra were obtained with an interface temperature of 230°C and an ionization energy of 70 eV. The injection mode was splitless at a splitless period of 0.75 min. The other system was a GC/MS, Fisons Instruments - VG AutoSpec and GC8000 series, fitted with a fused silica capillary column (50 m x 0,20 mm i.d.) coated with methyl silicone (HP1) (0,33  $\mu\text{m}$  film thickness), operated at 50°C for 10 min, programmed at 5°C/min to 260°C and then held at 260°C for 10 min. The injection mode was splitless with a splitless period of 1.0 min. The mass spectra were obtained with an ionization energy of 70 eV.

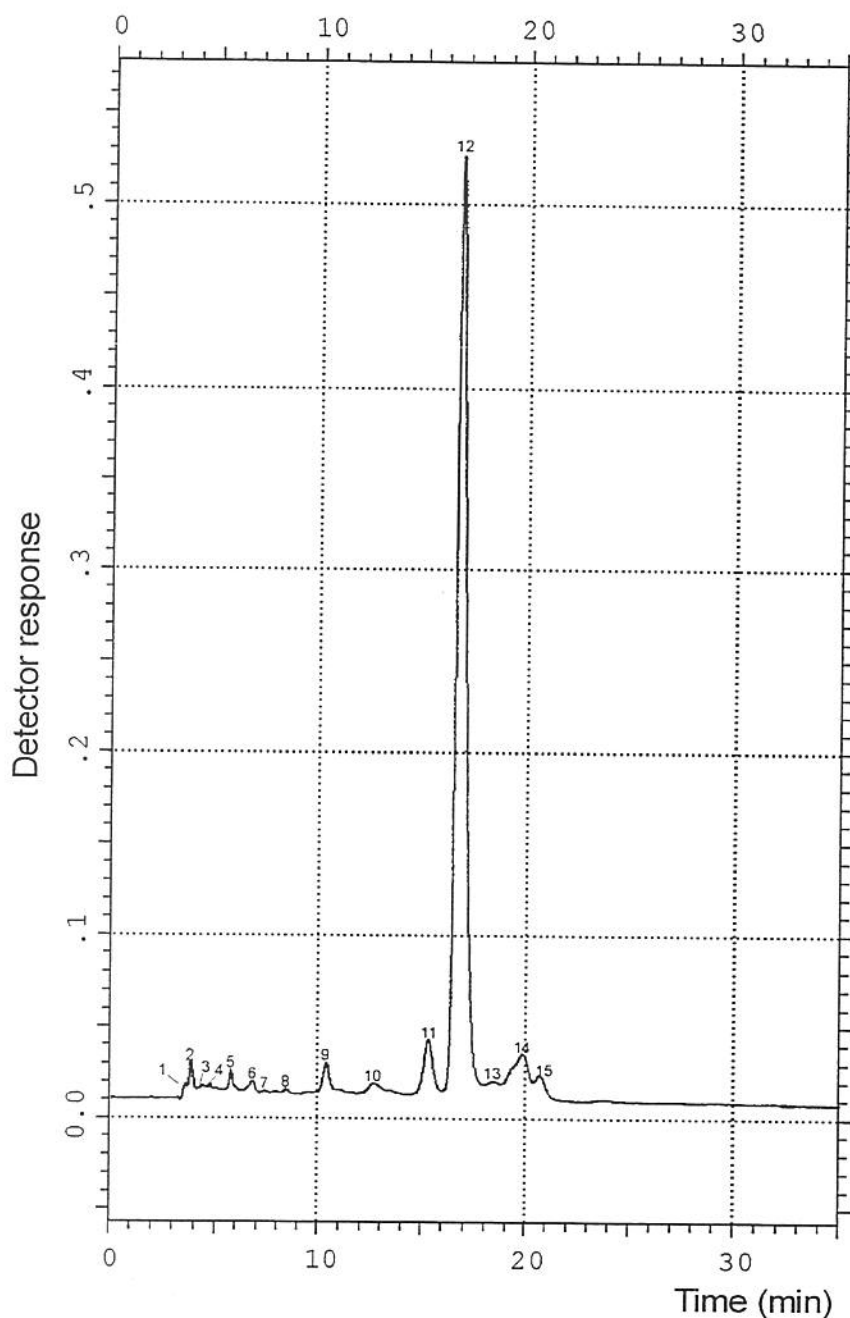
## RESULTS AND DISCUSSION

**Degradation of  $\beta$ -Carotene.** Loss of  $\beta$ -carotene in the presence or absence of light at room temperature (30°C) in the low-moisture model system is shown in Figure 2. The curve obtained in the absence of light is characteristic of a free radical reaction, consisting of a lag phase followed by propagation and termination phases. Degradation in the presence of light was so fast that the lag phase could hardly be seen.



**FIGURE 2.** Degradation of  $\beta$ -carotene at ambient temperature in the presence ( $\blacklozenge$ ) and absence of light ( $\bullet$ ).

**Formation of Non-Volatile Compounds.** Figure 3 shows the HPLC chromatogram of  $\beta$ -carotene and the non-volatile compounds formed during oxidation in the presence of light. The chromatogram obtained before oxidation had only the  $\beta$ -carotene peak and that of  $\beta$ -carotene oxidized in the absence of light had the same pattern as that of Figure 3. The very small amounts of the products formed precluded quantification, so only identification was carried out. The characteristics of these compounds are presented in Table 1.



**FIGURE 3.** Typical HPLC chromatogram of  $\beta$ -carotene and non-volatile degradation products, obtained with diode array detector, C<sub>18</sub> column (Vydac 218 TP54), mobile phase of 5% tetrahydrofuran in metanol (v/v), isocratic and flow rate of 1mL/min.



**TABLE 1.** Principal properties of  $\beta$ -carotene non-volatile degradation products

| Peak n <sup>a</sup> | Carotenoids                                      | $\lambda_{\text{max}}$ . <sup>b</sup> | Molecular ion | Characteristic fragments             |
|---------------------|--------------------------------------------------|---------------------------------------|---------------|--------------------------------------|
| 2                   | not identified                                   | 433                                   | --            | --                                   |
| 3                   | $\beta$ -apo-14'-carotenal                       | 390                                   | --            | --                                   |
| 4                   | $\beta$ -apo-12'-carotenal                       | 413                                   | --            | --                                   |
| 5                   | $\beta$ -apo-10'-carotenal                       | 427                                   | --            | --                                   |
| 6                   | 5,8-epoxy- $\beta$ -carotene                     | 400, 425, 450                         | --            | --                                   |
| 7                   | $\beta$ -apo-8'-carotenal                        | 450                                   | --            | --                                   |
| 9                   | 4-hydroxy- $\beta$ -carotene (iso-cryptoxanthin) | (420), 448, 473                       | 552           | (M-18), (M-69), (M-92), (M-110)      |
| 10                  | not identified                                   | 413, 440, 450, 480                    | --            | --                                   |
| 11                  | 5,6, 5', 6'-diepoxy- $\beta$ -carotene           | (413), 440, 463                       | 568           | (M-69), (M-80-80), (M-106), 165, 205 |
| 12                  | $\beta$ -carotene                                | (423), 450, 477                       | 536           | (M-92), (M-106), (M-140), (M-431)    |
| 13                  | not identified                                   | 420, 447, 475                         | --            | --                                   |
| 14                  | 13-cis- $\beta$ -carotene                        | 340, (420), 443, 470                  | --            | --                                   |
| 15                  | 15-cis- $\beta$ -carotene                        | 340, (422), 448, 477                  | --            | --                                   |

<sup>a</sup> Numbered according to the chromatogram shown in Figure 1.

<sup>b</sup> Obtained with diode array detector in a mobile phase of 5% tetrahydrofuran in methanol

Four apocarotenals were identified:  $\beta$ -apo-14'-carotenal,  $\beta$ -apo-12'-carotenal,  $\beta$ -apo-10'-carotenal and  $\beta$ -apo-8'-carotenal. These compounds exhibited visible absorption spectra consisting of a broad single maximum, reflecting the presence of a conjugated carbonyl group. Reduction by NaBH<sub>4</sub> transformed the spectra into the typical three-peak spectra of carotenoids, manifesting the transformation of apocarotenals into apocarotenols. The  $\lambda_{\text{max}}$ s at 390, 413, 427 and 450 nm in the mobile phase (THF/methanol) is consistent with the number of conjugated double bonds left after cleavage of  $\beta$ -carotene at the 13'-14', 12'-11', 10'-9' and 8'-7' double bonds and introduction of the conjugated carbonyl group.

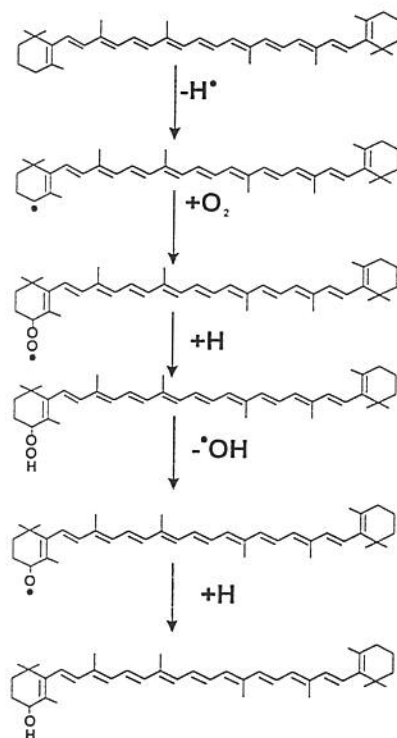
Only two epoxycarotenoids were detected: 5,8-epoxy- $\beta$ -carotene and 5,6,5',6'-diepoxy- $\beta$ -carotene. The  $\lambda_{\text{max}}$  25 nm lower than  $\beta$ -carotene of the first compound revealed the presence a 5,8-epoxide group. The identity of 5,6,5',6'-diepoxy- $\beta$ -carotene was confirmed by the mass spectrum showing a molecular ion of 568 u.m.; a peak at m/z 408 (M-80-80), demonstrating the presence of two epoxy groups; and the peaks at m/z 165 and 205, indicating that the epoxy substituents were located in unhydroxylated  $\beta$ -ring.



A hydroxycarotenoid was identified as 4-hydroxy- $\beta$ -carotene. The visible absorption spectrum resembled that of  $\beta$ -carotene. The mass spectrum presented a molecular ion at 552 u.m.; a peak at  $m/z$  534 (M-18) due to the elimination of a molecule of  $H_2O$ ; and a (M)/(M-18) ratio less than 1.0, indicating the allylic position of the hydroxyl group.

Two hydroxycarotenoids were detected by Marty and Berset (1988) as degradation products of  $\beta$ -carotene on extrusion cooking. One of these carotenoids was identified as zeaxanthin, which has two hydroxyl substituents in non-allylic positions, although its positive response to dehydration with HCl indicated that the hydroxyl groups were allylic. The other carotenoid was also claimed to have allylic hydroxyl groups, although the presence of 5,8-epoxides would have precluded the introduction of hydroxyl group at such position.

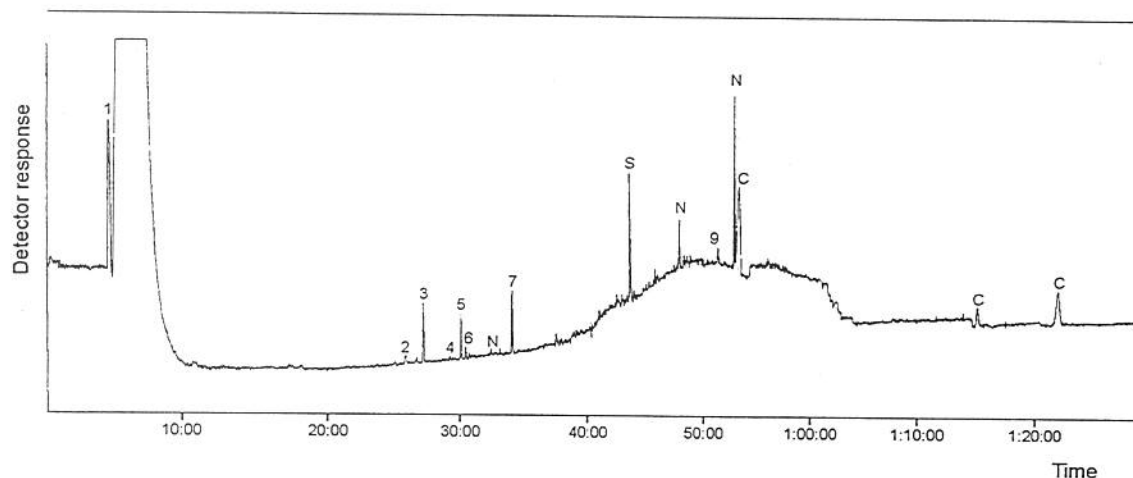
The allylic position of the hydroxyl group and the free radical degradation pattern suggest that hydroxylation of  $\beta$ -carotene occur as in the oxidation of cholesterol (Smith, 1981) as shown in Figure 4.



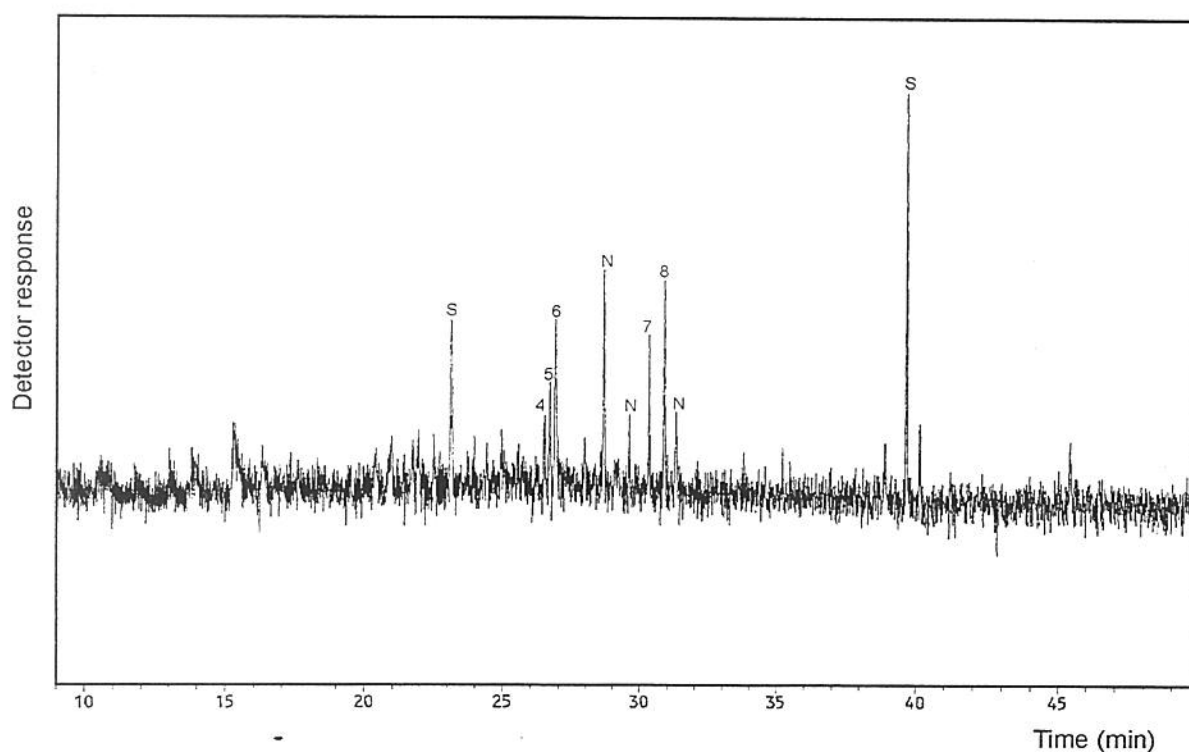
**FIGURE 4.** Possible mechanism for the formation of isocryptoxanthin from  $\beta$ -carotene.

Two *cis*-isomers of  $\beta$ -carotene were also detected, indicating that oxidation was accompanied by isomerization. The  $\lambda_{max}$ s observed agree with those obtained by Vecchi et al. (1981).

**Formation of Volatile Compounds.** The volatile compounds identified by MS (molecular ions and fragmentation patterns) are shown in Table 2. The CG chromatograms of these volatiles are shown in Figures 5 and 6.

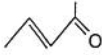
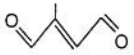


**FIGURE 5.** Chromatogram of volatile compounds obtained with GC/MS – Fisons Instruments. VG Auto Spec. Fused silica capillary column coated with methyl silicone (50m x 0,20mm i.d.) operated at 50°C for 10 min, programmed at 5°C/min to 260°C and then held at 260°C for 10 min. (S - Solvent contamination; C - Column bleeding contamination; N - not identified).



**FIGURE 6.** Chromatogram of volatile compounds obtained with GC/MS – Shimadzu QP-5000. Fused silica capillary column coated with polymethylsiloxane (50m x 0,25 i.d.) operated at 50°C for 10 min, programmed at 5°C/min to 200°C and then held at 200°C for 10 min. (S - Solvent contamination; N - not identified).

**TABLE 2.** Principal properties of  $\beta$ -carotene volatile degradation products.

| Peak<br>n <sup>o</sup> <sup>a</sup> | Retention<br>time (min) | Molecular<br>mass | Characteristic fragments                                         |                                                                                       | Identification                                          |
|-------------------------------------|-------------------------|-------------------|------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------|
| 1 <sup>c</sup>                      | 4,59                    | 44                | (M-1), (M-2), (M-3), (M-4)                                       |    | Acetaldehyde<br>(ethanal)                               |
| 2 <sup>c</sup>                      | 26,21                   | 84                | (M-15), 43, (M-43), 57,<br>(M-57)                                |    | 3-penten-2-<br>one                                      |
| 3                                   | 27,42                   | 98                | (M-15), (M-29), 43, (M-43),<br>57, (M-57)                        |    | 4-oxo-2-pente<br>nal                                    |
| 4 <sup>c</sup>                      | 29,37                   | 86                | (M-15), (M-17), (M-31), 43,<br>(M-43)                            |    | 3-methyl-2-<br>butenol                                  |
| 5                                   | 30,29                   | 98                | (M-15), (M-29), 41, (M-41)                                       |    | 2-methyl-2-<br>buten-1,4-dial                           |
| 6                                   | 30,51                   | 112               | (M-15), (M-17), (M-31),<br>41, (M-41), 55, (M-55)                |     | 2-methyl-hex-<br>2,4-dien-1-ol                          |
| 7                                   | 34,10                   | 112               | (M-15), (M-17), (M-31),<br>41, (M-41), 43, (M-43), 55,<br>(M-55) |    | 5-methyl-hex-<br>2,4-dien-1-ol                          |
| 8 <sup>b</sup>                      | --                      | 152               | (M-15), (M-29), (M-43),<br>(M-55), (M-57),<br>(M-43-15-29)       |  | $\beta$ -cyclocitral                                    |
| 9 <sup>c</sup>                      | 51,47                   | 166               | (M-17), (M-29), (M-31),<br>43, 57, 70, 71, 83                    |   | 8-hydroxy-<br>3,7-dimethyl-<br>2,4,6 trien-1<br>octanal |

<sup>a</sup> Numbered according to the chromatogram shown in Figure 5<sup>b</sup> Detected only with the analyses in the Shimadzu equipment<sup>c</sup> Detected only with the analyses in the Fisons equipment

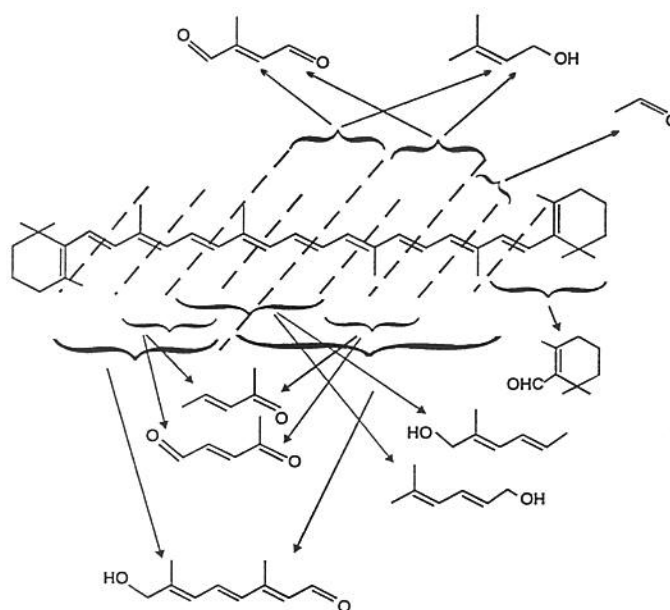
Except for  $\beta$ -cyclocitral, the other volatile compounds are short acyclic compounds, which apparently came from the polyene chain. This differs with results of studies on high-temperature oxidation, in which compounds derived from the cyclic end-groups of carotenoids or cyclic compounds possibly formed from acyclic fragments coming from the polyene chain were identified.

The mass spectra of the compounds identified as acetaldehyde, 3-penten-2-one, 3-methyl-2-butenol and  $\beta$ -cyclocitral resemble those of the National Institute Standards and Technology (NIST) Mass Spectra Database.

No spectra were found in the literature for 4-oxo-2-pentenal, 2-methyl-2-buten-1,4-dial, 2-methyl-hex-2,4-dien-1-ol, 5-methyl-hex-2,4-dien-1-ol and 8-hydroxy-3,7-dimethyl-2,4,6-trien-1-octanal, which were identified by the molecular ions and fragmentation pattern. Moreover, their possible origin from the  $\beta$ -carotene molecule could be easily located.

*Trans*-2-buten-1,4-dial was detected during the autoxidation of 2,4-decadienal, an autoxidation product of fatty acids (Matthews et al, 1971). This compound is similar to 2-methyl-2-buten-1,4-dial, identified in this study, the presence of a methyl group being understandable from the  $\beta$ -carotene polyene chain structure.

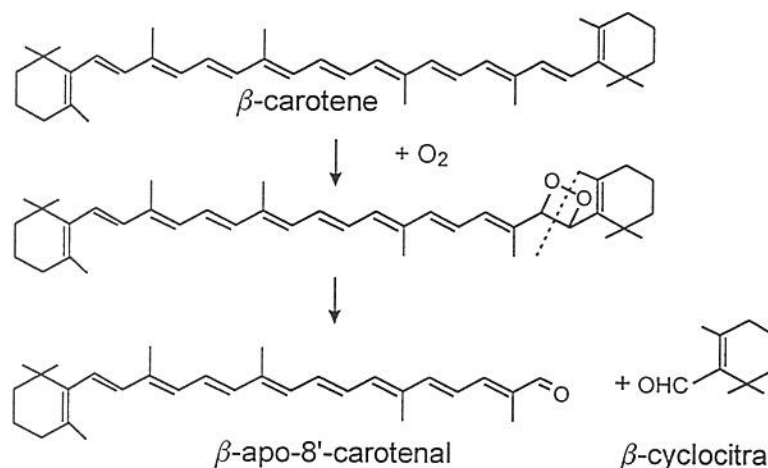
The detection of 4-oxo-2-pentenal, 2-methyl-2-buten-1,4-dial and 5-methyl-hex-2,4-dien-1-ol during degradation of canthaxanthin in a similar model system at ambient temperature (Padula and Rodriguez-Amaya, 1998) lends further support to the formation of volatiles from the polyene chain. Figure 7 presents the possible origin of the volatile compounds identified during the  $\beta$ -carotene degradation.



**FIGURE 7.** Possible formation of volatile compounds through the fragmentation of  $\beta$ -carotene.

These compounds are rich in oxygen, which can explain the high consumption of oxygen during the degradation of  $\beta$ -carotene, as observed by Teixeira Neto et al. (1981) and Goldman et al. (1983). The last authors suggested sequential reactions in which intermediate products also react with oxygen to give the final degradation products.

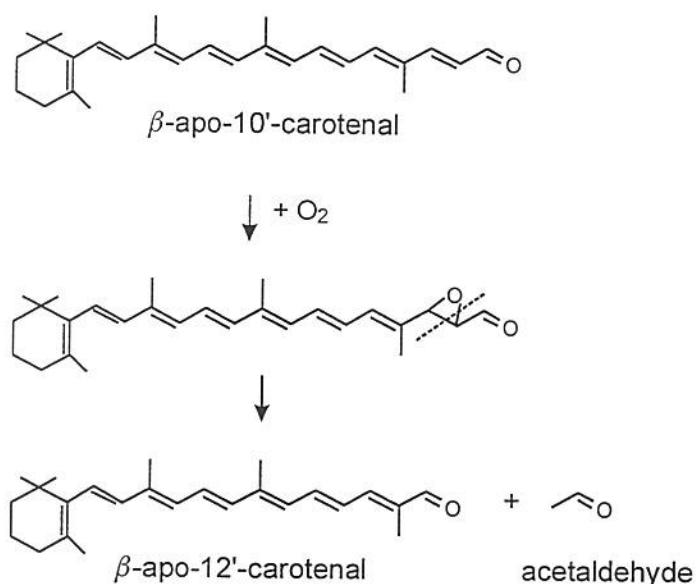
The non-volatile and volatile compounds identified in the present work suggest a possible mechanism for the formation of apocarotenals from  $\beta$ -carotene at ambient temperature. A sequential cleavage is proposed, from one end of the molecule to the center. In Figure 8 the possible formation of  $\beta$ -apo-8'-carotenal and  $\beta$ -cyclocitral from  $\beta$ -carotene is shown, both compounds being detected in this study. The introduction of oxygen and cleavage at the double bond C7=C8 is the dioxetane mechanism, proposed by Ohloff, and already suggested for apocarotenal formation by Ouyang et al. (1980) based solely on the identification of  $\beta$ -apo-14'-carotenal.



**FIGURE 8.** Possible mechanism for the formation of  $\beta$ -apo-8'-carotenal and  $\beta$ -cyclocitral from  $\beta$ -carotene.

$\beta$ -Cyclocitral was also identified by Kanasawud and Crouzet (1990) during thermal degradation (97°C) of  $\beta$ -carotene in an aqueous medium. A complicated mechanism was proposed, with  $\beta$ -cyclocitral originating from 5,6-epoxy- $\beta$ -carotene, passing through 5,6- $\beta$ -ionone and 2-hydroxy-2,6,6-trimethyl cyclohexane-1-carboxaldehyde.

The identification of acetaldehyde among the volatile compounds is another indication of the sequential cleavage of  $\beta$ -carotene. Figure 9 shows possible breakdown of  $\beta$ -apo-10'-carotenal to  $\beta$ -apo-12'-carotenal and acetaldehyde. The mechanism proposed is the same as that suggested for the formation and decomposition of the 2,3-epoxide in lipid oxidation (Nawar, 1996).



**FIGURE 9.** Possible mechanism for the formation of  $\beta$ -apo-12'-carotenal and acetaldehyde from  $\beta$ -apo-10'-carotenal.

Propanal ( $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CHO}$ ), which should have been derived from  $\beta$ -apo-8'-carotenal with the formation of  $\beta$ -apo-10'-carotenal was not observed in this study, probably because it eluted with the solvent, diethyl ether. Propanal would also be produced in the formation of  $\beta$ -apo-14'-carotenal from  $\beta$ -apo-12'-carotenal

## REFERENCES

- Arya, S.S.; Natesan, V.; Parihar, D.B.; Vijayaraghavan, P.K. Stability of carotenoids in dehydrated carrots. *J. Food Technol.* **1979**, 14, 579-586.
- Baloch, A.K.; Bickle, K.A.; Edwards, R.A. Stability of  $\beta$ -carotene in model systems containing sulphite. *J. Food Technol.* **1977**, 12, 309-316.
- Bricout, J.; Viani, R.; Müggler-Chavan, F.; Marion, J.P.; Reymond, D.; Egli, R.H. Sur la composition de l'arôme de thé noir. *Helv. Chim. Acta.* **1967**, 50, 1517-1522.
- Buttery, R.G.; Seifert, R.M.; Ling, L.C. Volatile tomato components: characterization of 6,10,14-trimethylpentadec-5,9,13-trien-2-one. *Chem. Ind.* **1969**, 238.

- Chou, H.; Breene, W.H. Oxidative decoloration of  $\beta$ -carotene in low-moisture model systems. *J. Food. Sci.* **1972**, 37, 66-68.
- Crouzet, J.; Chairoute, G.; Rodriguez, F.; Seck, S. Volatile components modifications during heat treatment of fruit juices. In: *Instrumental analysis of foods*; Charalambous, G.; Inglett, G., Eds.; Academic: New York, **1983**, Vol.2, pp.119-135.
- Davies, B.H. Carotenoids. In: *Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments*. Goodwin, T.W., Ed.; Academic Press: London, **1976**, 2nd ed., Vol. 2; pp. 38-65.
- Engel, K.H.; Tressl, R. Formation of aroma components from non-volatiles precursors in passion fruit. *J. Agric. Food Chem.* **1983**, 31, 998-1002.
- Glória, M.B.A.; Gray, J.I.; Grulke, E.A. Compostos voláteis formados durante a oxidação do  $\beta$ -caroteno. *Ciênc. e Tecnol. Aliment.* **1991**, 11, 36-44.
- Glória, M.B.A.; Gray, J.I. Effect of type of oxidation on  $\beta$ -carotene loss and volatile products formation in model system. *Food Chem.* **1993**, 46, 401-406.
- Goldman, M.; Horev, B.; Saguy, J. Decolorization of  $\beta$ -carotene in model systems simulating dehydrated foods. Mechanism and kinetics principles. *J. Food Sci.* **1983**, 48, 751-754.
- Idstein, H.; Schreier, P. Volatile constituents from guava (*Psidium guajava*, L.) fruit. *J. Agric. Food Chem.* **1985**, 33, 138-143.
- Kanasawud, P.; Crouzet, J.C. Mechanism of formation of volatile compounds by thermal degradation of carotenoids in aqueous medium 1  $\beta$ -carotene degradation. *J. Agric. Food Chem.* **1990**, 38, 237-243.
- Kanner, J.; Mendel, H.; Budowski, P. Carotene oxidizing factors in red pepper fruits (*Capsicum annuum* L.): oleoresin-cellulose solid model. *J. Food Sci.* **1978**, 43, 709-712.



- Kawakami, M. Ionone species compounds from  $\beta$ -carotene by thermal degradation in aqueous medium. *Nippon Nôgeikagaku Kaishi*. **1982**, 56, 917-921. (In Japanese)
- LaRoe, E.G.; Shipley, P.A. Whiskey composition: formation of alfa-and  $\beta$ -ionone by thermal decomposition of  $\beta$ -carotene. *J. Agric. Food Chem.* **1970**, 18, 174-175.
- Lutz, A.; Winterhalter, P. Isolation of additional carotenoid metabolites from quince fruit (*Cydonia oblonga*, Mill). *J. Agric. Food Chem.* **1992**, 40, 1116-1120.
- Marty, C.; Berset, C. Degradation of *trans*- $\beta$ -carotene during heating in sealed glass tubes and extrusion cooking. *J. Food Sci.* **1986**, 51, 698-702.
- Marty, C.; Berset, C. Degradation products of *trans*- $\beta$ -carotene produced during extrusion cooking. *J. Food Sci.* **1988**, 53, 1880-1886.
- Marty, C.; Berset, C. Factors affecting the thermal degradation of *all-trans*  $\beta$ -carotene. *J. Agric. Food Chem.* **1990**, 38, 1063-1067.
- Matthews, R.F.; Scanlan, R.A. Libbey, L.M. Autoxidation products of 2,4-decadienal. *J. Am. Oil. Chem. Soc.* **1971**, 481, 745-747.
- Moutonet, M. Formation des substances volatiles au cours de l'élaboration du pruneau. In: *Symposium flavours of fruits and fruit juices*. International Federations of Fruits Juices Producers: Bern, **1978**, pp.363-372.
- Nawar, W.W. Lipids. In: *Food Chemistry*. Fennema, O. R., Ed.; Marcel Dekker: New York, **1996**, 3<sup>rd</sup> ed., pp. 225-319.
- Ouyang, J.M.; Daun, H.; Chang, S.S.; Ho, C.T. Formation of carbonyl compounds from  $\beta$ -carotene during palm oil deodorization. *J. Food Sci.* **1980**, 45, 1214-1217
- Onyewu, P.N.; Daun, H.; Ho, C.T. Formation of two thermal degradation products of  $\beta$ -carotene. *J. Agric. Food Chem.* **1982**, 30, 1147-1151.

- Onyewu, P.N.; Ho, C.T.; Daun, H. Characterization of  $\beta$ -carotene thermal degradation products in a model food system. *J. Am. Oil. Chem. Soc.* **1986**, 63, 1437-1441.
- Padula, M.; Rodriguez-Amaya, D. Degradation of canthaxanthin in a low-moisture model system at ambient temperature. Formation of non-volatiles and volatile products (submitted for a publication), 1998.
- Parliment, T.H. Some volatile constituents of passion fruit. *J. Agric. Food Chem.* **1972**, 20, 1043-1045.
- Pesek, C.A.; Warthesen, J.J. Kinetic model for photoisomerization and concomitant photodegradation of  $\beta$ -carotenes. *J. Agric. Food Chem.* **1990**, 38, 1313-1315.
- Ramakrishnan, T.V.; Francis, F.J. Stability of carotenoids in model aqueous systems. *J. Food Qual.* **1979**, 2, 177-189.
- Renold, W.; Näf-Müller, R.; Keller, V. An investigation of the tea aroma. Part I. New volatile black tea constituents. *Helv. Chim. Acta.* **1974**, 57, 1301-1308.
- Sanderson, G.W.; Co. H.; Gonzales, J.G. Biochemistry of tea fermentation: the role of carotenes in black tea aroma formation. *J. Food Sci.* **1971**, 36, 231-236.
- Sakho, M.; Crouzet, J. Seck, S. Evolution des composés volatils de la mangue au cours du chauffage. *Lebensm Wiss. Technol.* **1985**, 89-93.
- Schreier, P.; Drawert, F.; Junker, A. Identification of volatile constituents from grapes. *J. Agric. Food Chem.* **1976**, 24, 331-336.
- Smith, L.L. Cholesterol Autoxidation. Plenum Press, New York, **1981**. Cited by Nawar, W.W. Lipids. In: *Food Chemistry*. Fennema, O. R., Ed.; Marcel Dekker: New York, **1996**, 3<sup>rd</sup> ed., p.225-319.
- Stevens, M.A. Relationship between polyene-carotene content and volatile compound composition of tomatoes. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* **1970**, 95, 461-464.

- Strauss, C.R.; Dimitriadis, E.; Wilson, B.; Williams, P.J. Studies on the hydrolysis of two megastigma-3, 6, 9-triols rationalizing the origins of some volatile C13 norisoprenoids of *vitis vinifera* grapes. *J. Agric. Food Chem.* **1986**, 34, 145-149.
- Strauss, C.R.; Wilson, B.; Williams, P.J. 3-oxo- $\alpha$ -ionol, vomifoliol and roseoside in *Vitis vinifera* fruit. *Phytochemistry*. **1987**, 26, 1995-1997.
- Teixeira Neto, R.O.; Karel, M.; Saguy, I.; Mizrahi, S. Oxygen uptake and  $\beta$ -carotene decoloration in dehydrated food model. *J. Food. Sci.* **1981**, 46, 665-676.
- Vecchi, M.; Englert, G.; Maurer, R.; Meduna, V. Trennung und charakterisierung von  $\beta$ -carotin-isomeren. *Helv. Chim. Acta.* **1981**, 64, 2746-2758.

## CAPÍTULO 4

# **DEGRADAÇÃO DE CANTAXANTINA EM SISTEMA- MODELO DE BAIXA UMIDADE A TEMPERATURA AMBIENTE. FORMAÇÃO DE COMPOSTOS VOLÁTEIS E NÃO VOLÁTEIS.**

*Este trabalho será traduzido para o inglês para publicação na revista Journal of the Agricultural and Food Chemistry.*

## DEGRADAÇÃO DE CANTAXANTINA EM SISTEMA-MODELO DE BAIXA UMIDADE À TEMPERATURA AMBIENTE. FORMAÇÃO DE COMPOSTOS VOLÁTEIS E NÃO-VOLÁTEIS.

Marisa Padula<sup>†</sup> e Délia Rodriguez-Amaya<sup>‡</sup>

Departamento de Ciências de Alimentos. Faculdade de Engenharia de Alimentos. Cx.P. 6121, UNICAMP, Campinas, São Paulo, Brasil.

A degradação da cantaxantina foi estudada em sistema-modelo de baixa umidade à temperatura ambiente (30°C), na presença e ausência de luz. Os compostos não-voláteis foram identificados por cromatografia líquida de alta eficiência e detector de conjunto de diodos (CLAE-DAD) e por reações químicas. Os compostos voláteis foram identificados por cromatografia gasosa com detector de massas (GC/EM). A cantaxantina mostrou-se nitidamente mais estável que o  $\beta$ -caroteno. Após 75 dias de oxidação nas condições citadas, na ausência de luz, a degradação deste carotenóide estava apenas se iniciando. Na presença de luz, a degradação começou após 22 dias. Os mesmos produtos de degradação foram detectados nos dois casos. Foram identificados como produtos de degradação não-voláteis três apocarotenóides e um *cis*-isômero, não tendo sido detectado nenhum epoxicarotenóide. A fragmentação levou a formação de alguns compostos voláteis, dos quais três foram identificados: dois aldeídos e um álcool. Estes compostos, por serem encontrados também na degradação do  $\beta$ -caroteno, confirmaram sua origem da cadeia poliênica e não dos anéis terminais.

**Palavras – chave:** *cantaxantina, degradação, produtos voláteis, produtos não-voláteis, CLAE, GC/MS.*

<sup>†</sup> Instituto de Tecnologia de Alimentos.

<sup>‡</sup> Depto de Ciências de Alimentos

## INTRODUÇÃO

Os carotenóides são pigmentos altamente insaturados e a sua estabilidade durante o processamento e a estocagem é uma preocupação. Porém, os conhecimentos sobre a degradação de carotenóides são ainda limitados.

Alguns pesquisadores trabalharam na determinação da cinética de degradação de carotenóides, principalmente  $\beta$ -caroteno, em sistemas-modelos de baixa umidade ou aquosos. Encontraram em geral cinética de primeira ordem (Chou e Breene, 1972; Ramakrishnan e Francis, 1979; Teixeira Neto *et al.*, 1981; Stefanovich e Karel, 1982; Goldman *et al.*, 1983; Minguez-Mosquera e Jaren-Galan, 1995), embora em alguns casos, cinética de ordem zero também tenha sido encontrada (El-Tinay e Chichester, 1970; Kanasawud e Crouzet, 1990; Minguez-Mosquera e Jaren-Galan, 1995).

A cinética de degradação da cantaxantina em sistemas-modelos com celulose microcristalina (CMC) e amido, equilibradas em diversas umidades relativas, foi determinada por Ramakrishnan e Francis (1979). Em comparação com  $\beta$ -caroteno e  $\beta$ -apo-8'-carotenal, a cantaxantina foi a mais estável em todas as condições testadas. Não foi observado período de indução.

Ramakrishnan e Francis (1980) estudaram ainda a susceptibilidade à oxidação de sete carotenóides diferentes no tipo, número e posição dos grupos funcionais. A cantaxantina foi mais estável que o  $\beta$ -caroteno,  $\beta$ -apo-8'-carotenol, e criptoxantina. A zeaxantina se mostrou mais estável que a cantaxantina, capsantina, e capsorubina.

Pouco se conhece também sobre os produtos de degradação formados a partir dos carotenóides. El-Tinay e Chichester (1970), Ouyang *et al.* (1980), Byers (1983), Onyewu *et al.* (1982, 1986), Marty e Berset (1986, 1988), Pesek *et al.* (1990), e Kanasawud e Crouzet (1990) estudaram a formação de produtos de degradação não-voláteis, a temperaturas acima de 45°C, a partir de  $\beta$ -caroteno. Encontraram principalmente epoxicarotenóides, apocarotenóides, e *cis*-isômeros.

A formação de produtos de degradação voláteis decorrentes do  $\beta$ -caroteno foi estudada por vários autores em sistemas-modelos. Em geral, foram utilizados sistemas líquidos a

altas temperaturas (Isoe *et al.*, 1969, 1972; LaRoe e Shipley, 1970; Kawakami, 1982; Kanasawud e Crouzet, 1990). Glória *et al.* (1991) e Glória e Gray (1993) estudaram a formação de compostos voláteis na degradação de  $\beta$ -caroteno em sistema-modelo seco em diversas condições.

A formação de compostos voláteis a partir da cantaxantina foi estudada por Roshdy e Daun (1990). O sistema-modelo consistia em cantaxantina dissolvida em glicerol e aquecida a 210°C por 30 minutos, 1, 2, e 4 horas. Os compostos voláteis foram condensados após passagem por uma série de armadilhas imersas em gelo seco e acetona, extraídos com éter etílico, concentrados, e analisados por cromatografia gasosa (CG) e cromatografia gasosa/espectrometria de massas (CG/EM). Seis compostos, provenientes do anel, foram tentativamente identificados. Para três deles, os autores sugeriram o mecanismo de formação.

Não foram encontrados estudos sobre a formação de compostos voláteis e não-voláteis a partir de carotenóides à temperatura ambiente. Apesar de Glória *et al.* (1991) e Glória e Gray (1993), terem realizado também a oxidação do  $\beta$ -caroteno à temperatura de 20°C, a coleta dos voláteis foi feita a 60°C por 90 minutos.

O presente trabalho teve então por objetivo estudar a degradação da cantaxantina à temperatura ambiente (30°C) para conhecer os primeiros passos da degradação deste cetocarotenóide. Estes resultados foram confrontados com os obtidos na degradação do  $\beta$ -caroteno nas mesmas condições, como forma de ajudar a elucidar os mecanismos de degradação de carotenóides, em temperaturas normalmente encontradas na estocagem de alimentos.

## MATERIAIS E MÉTODOS

**Materiais.** O sistema-modelo foi preparado utilizando-se cantaxantina cristal R 001-9915 (Lote 308148) fornecida pela Hoffman-La Roche, Basel, Suíça. Como adsorvente foi utilizada celulose microcristalina (CMC) Sigmacell 50 da Sigma Chemical Company.

**Métodos.** A preparação do sistema-modelo, a construção e a operação do aparelho para oxidação da cantaxantina, a determinação da atividade de água e da cantaxantina total, e



a identificação dos produtos de degradação voláteis e não-voláteis foram realizadas de acordo com os procedimentos descritos para o  $\beta$ -caroteno por Padula *et al.*, 1998 e Padula e Rodriguez-Amaya, 1998. Um coeficiente de absorção de 2200 foi utilizado para o cálculo da concentração de cantaxantina (Davies, 1976), com a absorvância a 463nm em éter de petróleo.

O aparelho de oxidação consistia em um dessecador, no qual o sistema-modelo foi colocado, conectado a um rotâmetro e cilindros pressurizados de ar sintético super seco e nitrogênio ultrapuro.

O sistema-modelo continha ao final de 1,4 a 2,4mg de cantaxantina por g de sistema-modelo.

A degradação da cantaxantina foi acompanhada a  $30 \pm 2^\circ\text{C}$ , semelhante à temperatura utilizada para o  $\beta$ -caroteno (Padula e Rodriguez-Amaya, 1998). A atividade de água do sistema-modelo determinada logo após a preparação e ao final do período de oxidação foi de 0,48 e 0,44, respectivamente.

**Identificação de compostos de degradação não-voláteis.** A formação de compostos de degradação não-voláteis durante a oxidação da cantaxantina, foi acompanhada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). A identificação foi conduzida utilizando-se um cromatógrafo a líquido Varian, equipado com detector de conjunto de diodos na região do UV-Visível, marca Waters, modelo 994. Foi utilizada uma coluna de fase reversa  $\text{C}_{18}$ , marca Vydac 218TP54, de 250 x 4,6mm de diâmetro interno, com coluna de guarda de 20mm,  $\text{C}_{18}$ , e tamanho de partícula de 5 $\mu\text{m}$  para ambas colunas. Como fase móvel foi utilizada a mistura de 2% de tetrahidrofurano (THF) e metanol, eluição isocrática, a uma vazão de 1,0 mL/min.

A identificação foi feita combinando-se o tempo de retenção, o espectro de absorção na região visível, obtido com o detector de conjunto de diodos, e testes químicos monitorados por CLAE.

**Identificação de compostos de degradação voláteis.** A identificação dos compostos de degradação voláteis, formados durante a oxidação da cantaxantina, foi realizada com o uso de CG/EM. Os voláteis foram capturados em uma armadilha de polímero poroso,

Tenax, grau cromatográfico (60-80 mesh). O tempo de coleta foi o mesmo determinado para o  $\beta$ -caroteno, 15 horas (Padula e Rodriguez-Amaya, 1998). Para eluição dos compostos da armadilha foram utilizados 250 $\mu$ L de éter etílico. Este solvente foi o que eluiu maior número de compostos, sendo o escolhido, apesar da presença de algumas impurezas.

O isolado em éter etílico, 2 $\mu$ L, foi injetado em um CG-EM SHIMADZU QP-5000 (Modelo 17A), empregando um injetor a 200°C com insensor *splitless* e abertura da válvula em 0,75 minutos com vazão de 1:25. Foi utilizada uma coluna capilar de sílica fundida (50 metros x 0,25mm de diâmetro interno) com fase estacionária de polidimetilsiloxano (CBP1-M50-0,25), inicialmente a 50°C por 10 minutos e programada até 200°C a uma taxa de 5°C por minuto. A coluna permaneceu a 200°C por 10 minutos. Como gás de arraste, foi utilizado hélio ultrapuro a uma velocidade linear de 35cm/s. Os espectros de massas foram obtidos, utilizando filtro quadrupolar, interface direta a 230°C, fonte de ionização por feixe de elétrons a 70 eV e varredura entre 35 a 350 m/z, a uma velocidade de varredura de 500amu/s.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Conforme mostrado no trabalho de Padula *et al.* (1998), onde é apresentada a isoterma de absorção de umidade da celulose microcristalina (CMC), o conteúdo de umidade na monocamada calculado através da equação de BET (Brunauer-Emmett-Teller), foi de aproximadamente 5g de água/g de produto seco que corresponde à atividade de água inferior a 0,11. O estudo foi, portanto, conduzido a uma atividade de água maior que a da monocamada e próxima à considerada como a mais estável para carotenóides (Arya *et al.*, 1979).

**Carotenóide total.** A cantaxantina mostrou-se bastante estável nas condições de oxidação utilizadas, temperatura de 30°C, atividade de água 0,44 - 0,48, e pressão parcial de oxigênio de 21%.

A degradação da cantaxantina em presença de luz foi acompanhada por 22 dias. Este pigmento apresentou um período de indução de aproximadamente 20 dias, e a partir do qual a velocidade de degradação aumentou. Por ter sido acompanhada pelo período de

22 dias, foi detectado somente o início da degradação, não sendo possível a determinação da ordem da reação ou mesmo a determinação de sua constante de velocidade.

A Tabela 1 apresenta os dados obtidos e a análise estatística mostra que até 15 dias não houve diferença significativa no teor de cantaxantina, nas diversas épocas analisadas. A 22 dias, houve diferença significativa ao nível de erro de 5%.

A degradação da cantaxantina na ausência de luz foi acompanhada durante 75 dias. Mesmo após este período, foi detectado apenas o início de degradação do pigmento, mostrando-se ainda mais estável nestas condições.

**TABELA 1.** Teor de cantaxantina em função do tempo de estocagem, na presença de luz.

| Tempo | Média (mg/g) <sup>a</sup> | Estimativa do Desvio-padrão |
|-------|---------------------------|-----------------------------|
| 0     | 1,4 a                     | 0,2                         |
| 4     | 1,5 a                     | 0,2                         |
| 11    | 1,7 a                     | 0,1                         |
| 15    | 1,6 a                     | 0,0                         |
| 22    | 1,0 b                     | 0,2                         |

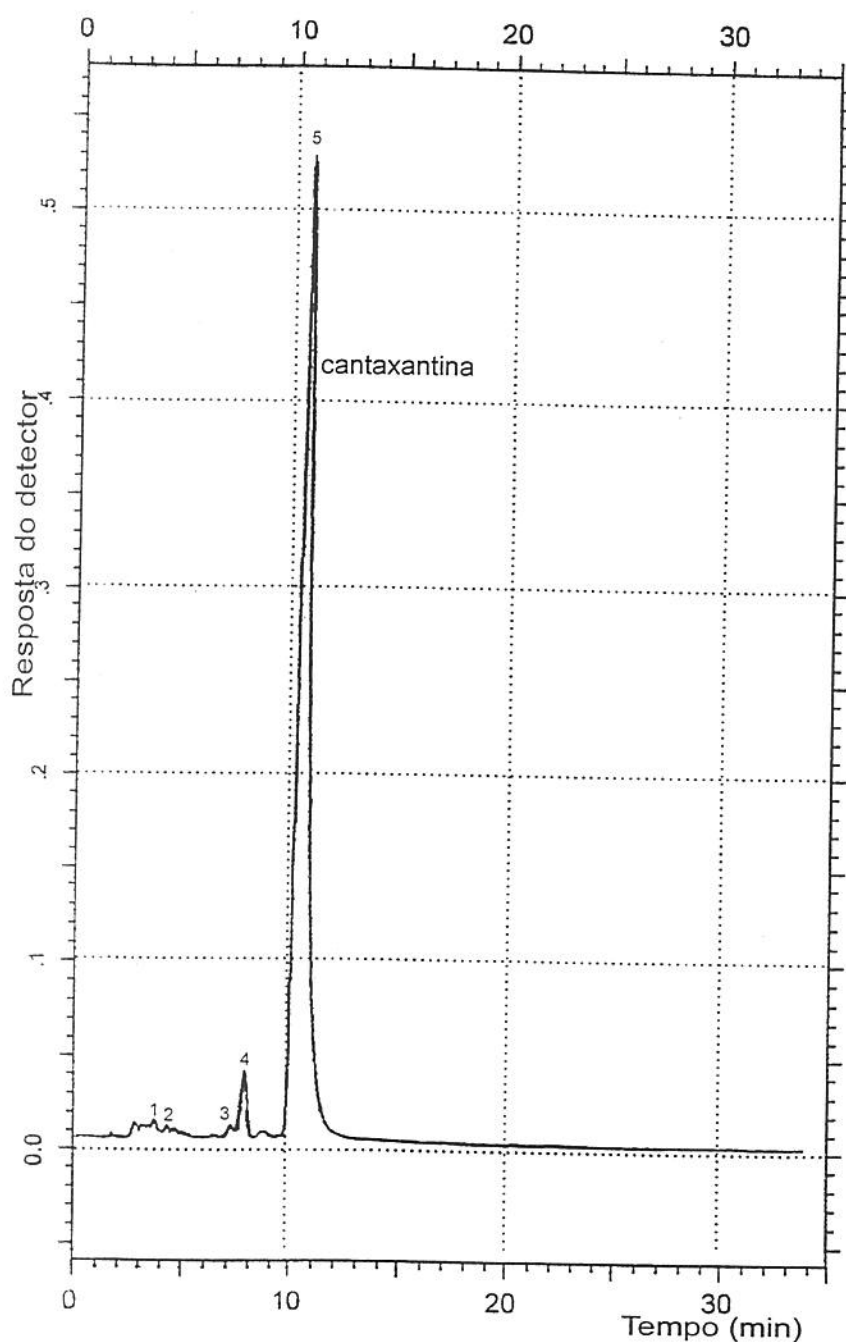
*a-Médias referentes a duas determinações*

*Médias seguidas pela mesma letra não apresentam diferença significativa ao nível de erro de 5%*

As estimativas de desvios-padrão mostraram a dificuldade em distribuir homogeneamente a cantaxantina no sistema-modelo pelo procedimento adotado, embora não tenha sido detectada visualmente a não uniformidade.

Os resultados obtidos no presente trabalho diferem dos observados por Ramakrishnan e Francis (1979). Estes autores determinaram a velocidade de degradação da cantaxantina em um sistema-modelo semelhante, a 25°C, na ausência de luz e em várias atividades de água. Embora a cantaxantina tenha se mostrado também mais estável que o  $\beta$ -caroteno, não foi detectado período de indução e a meia-vida foi de 36,4 dias.

**Compostos de degradação não-voláteis.** Quatro compostos não-voláteis foram identificados. A Figura 1 apresenta o cromatograma obtido por CLAE e suas características estão apresentadas na Tabela 2.



**FIGURA 1.** Cromatograma dos compostos de degradação não-voláteis da cantaxantina obtido por CLAE e detector de conjunto de diodos, com coluna C<sub>18</sub>, Vydac 218TP54, fase móvel de 2% de tetrahydrofurano em metanol (v/v), com vazão de 1mL/min e eluição isocrática.

**TABELA 2.** Características dos compostos de degradação não-voláteis da cantaxantina obtidos por CLAE.

| Pico nº | Tempo de retenção (min.) | $\lambda$ máx. <sup>a</sup> | Reações químicas     |                               | Identificação         |
|---------|--------------------------|-----------------------------|----------------------|-------------------------------|-----------------------|
|         |                          |                             | Presença de epóxidos | Redução com NaBH <sub>4</sub> |                       |
| 1       | 4,4                      | 435                         | -                    | +                             | Apo-12'-cantaxantinal |
| 2       | 5,0                      | 447                         | -                    | +                             | Apo-10'-cantaxantinal |
| 3       | 7,9                      | 457                         | -                    | +                             | Apo-8'-cantaxantinal  |
| 4       | 8,6                      | 367,467                     | -                    | +                             | cis-cantaxantina      |
| 5       | 10,8                     | 473                         | -                    | +                             | cantaxantina          |

a- Valores máximos obtidos por cromatografia líquida de alta eficiência em coluna C<sub>18</sub>, Vydac 218TP54, e fase móvel de 2% de tetrahidrofurano em metanol.

Os primeiros três compostos reagiram positivamente à redução por borohidreto de sódio, transformando os espectros de absorção consistindo de um pico largo em 3-picos característicos dos hidroxicarotenóides correspondentes. Portanto, foram identificados como apocarotenais.

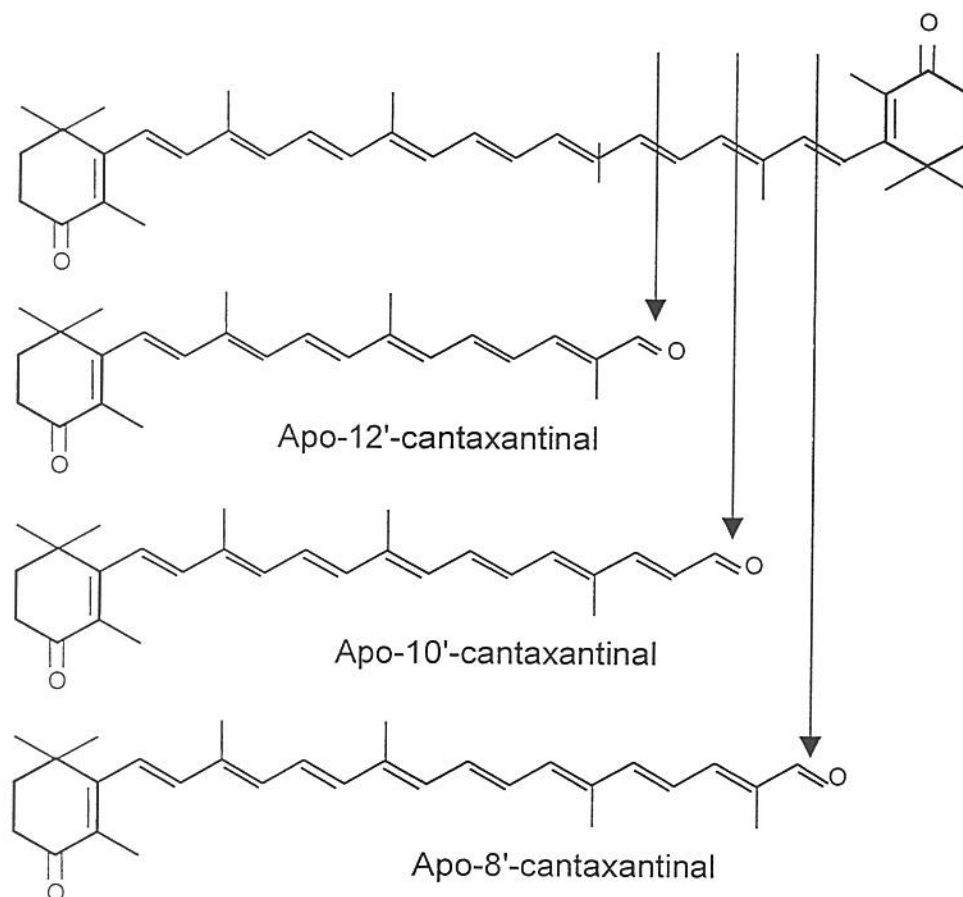
O primeiro composto (pico nº1) apresentou absorção máxima em 435nm, condizente com a perda de quatro ligações duplas em relação à cantaxantina e à quebra na posição 12'. A absorção máxima observada é compatível com a sua identificação como apo-12'-cantaxantinal.

O segundo componente (pico 2) exibiu absorção máxima em 447nm, aproximadamente 26nm abaixo da absorção da cantaxantina, e coerente com a perda de três ligações duplas e quebra na posição 10'. Esta absorção máxima o caracteriza como apo-10'-cantaxantinal.

A absorção máxima em 457nm do pico 3, aproximadamente 16nm abaixo da absorção da cantaxantina, indicou a perda de duas ligações duplas e quebra na posição 8'. Isso é condizente com a identificação deste componente como sendo apo-8'-cantaxantinal.

O pico 4 foi identificado como cis-cantaxantina. Este componente apresentava o pico na região ultravioleta, característico dos pigmentos na forma cis, e a absorção máxima foi 6nm abaixo da absorção da cantaxantina.

A Figura 2 mostra a possível formação dos apocarotenais a partir da cantaxantina.



**FIGURA 2.** Possível formação de apocarotenais a partir da cantaxantina.

Tanto na ausência como na presença de luz, foram detectados os mesmos compostos.

Ao contrário de outros trabalhos que focalizam a formação de epoxicarotenóides, nenhum dos produtos de degradação detectados respondeu positivamente ao teste para a presença de grupos epóxidos. Na degradação do β-caroteno em um sistema semelhante à temperatura ambiente (Padula e Rodriguez-Amaya, 1998), foram detectados quatro apocarotenais e somente dois epoxicarotenóides, o que de alguma forma levanta a

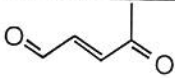
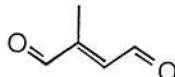
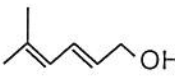
possibilidade que, à temperatura ambiente, há facilidade para formação dos apocarotenais.

Uma vez que a posição 4 da cantaxantina já está com substituinte, não foi constatada a formação de hidroxicarotenóide, observada na degradação do  $\beta$ -caroteno (Padula e Rodriguez-Amaya, 1998).

Na literatura não foram encontrados trabalhos sobre a formação de produtos de degradação não-voláteis da cantaxantina.

**Compostos de degradação voláteis.** Na Figura 3 estão apresentados os cromatogramas que mostram a evolução da formação dos compostos voláteis da cantaxantina, à temperatura de 30°C, durante 35 dias, na ausência de luz. Três compostos foram identificados, cujas características estão apresentadas na Tabela 3.

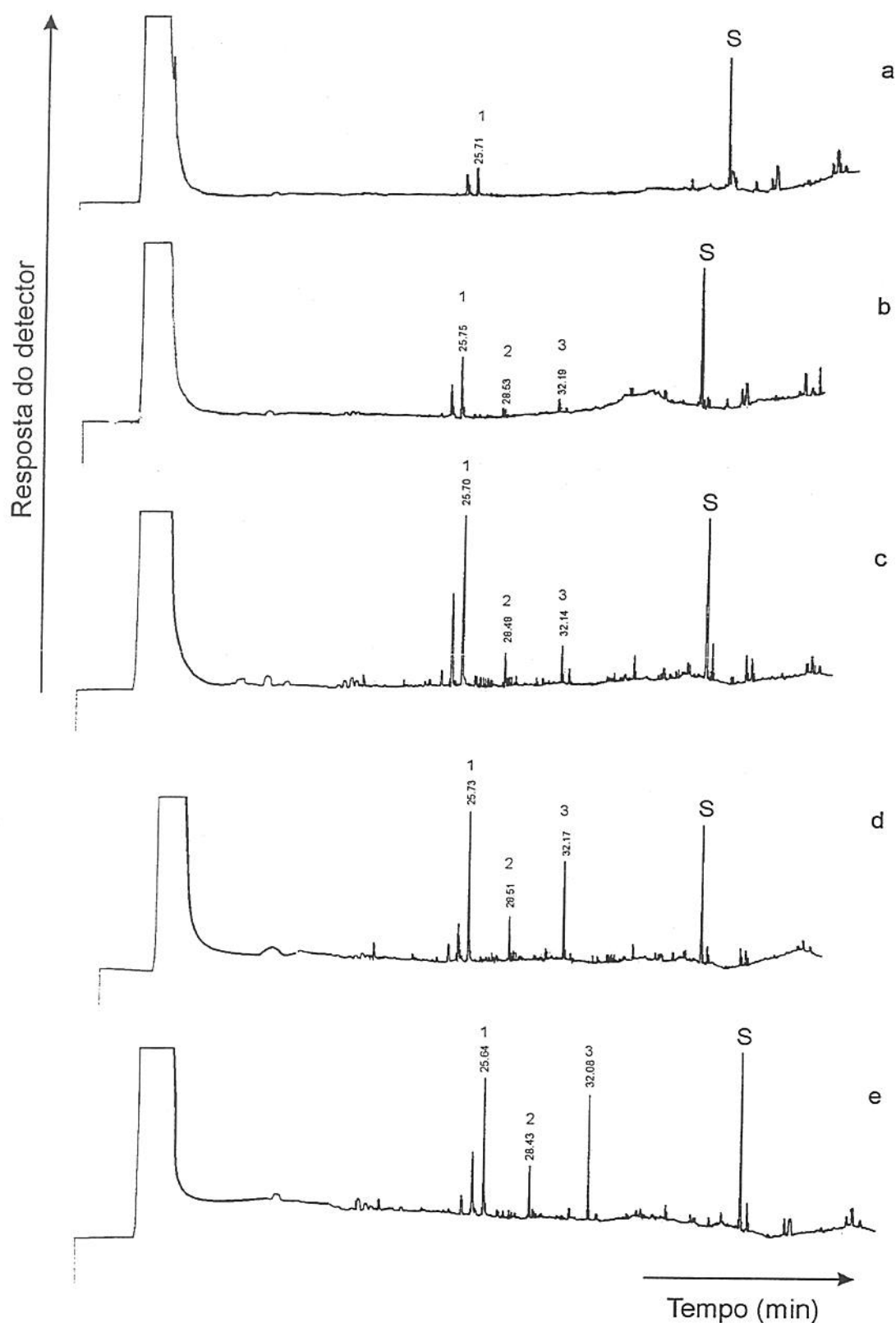
**TABELA 3.** Características dos compostos de degradação voláteis da cantaxantina, obtidos por CG/FID e CG/EM.

| Pico nº | Tempo de retenção (min.) <sup>a</sup> | Massa molecular | Fragmentos característicos <sup>b</sup>            | Identificação                                                                                                  |
|---------|---------------------------------------|-----------------|----------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1       | 25,7                                  | 98              | (M-15), (M-29), 43, (M-43), 57, (M-57)             |  4-oxo-2-pentenal          |
| 2       | 28,4                                  | 98              | (M-15), (M-29), 41, (M-41)                         |  4-metil-2-buten-1,4-dial  |
| 3       | 32,1                                  | 112             | (M-15), (M-17), (M-31), (M-41), (M-43), 55, (M-55) |  5-metil-hex-2,4-dien-1-ol |

<sup>a</sup> Obtidos com o cromatógrafo a gás HP 5890 e detector de ionização de chama (CG/FID) (50 °C/ 10min., 5 °C/min. até 200 °C e 200 °C por 10min.)

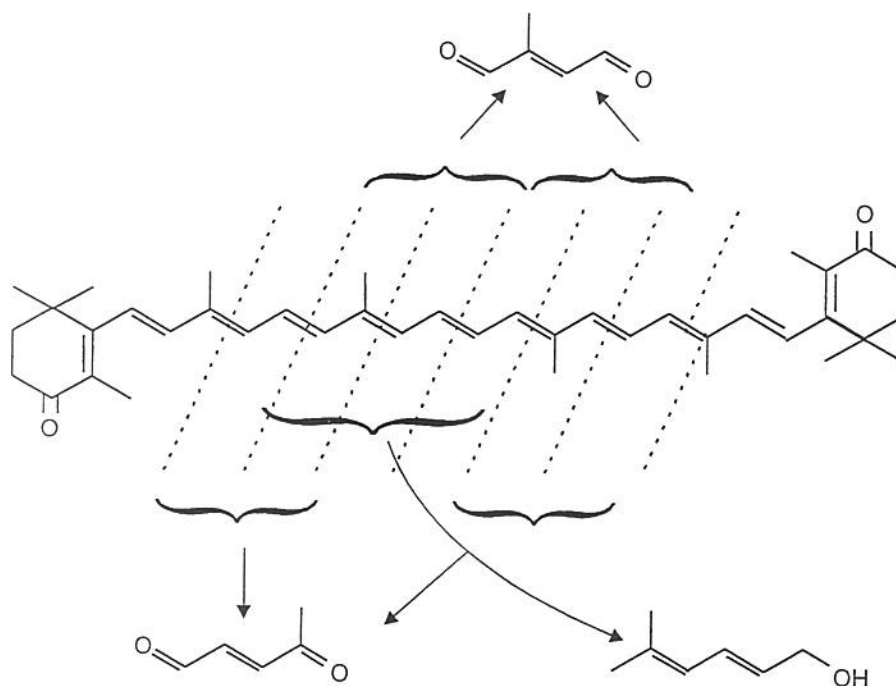
<sup>b</sup> Obtidos no equipamento Shimadzu CG/EM 5000 (Modelo 17 A).





**FIGURA 3.** Evolução da formação dos compostos de degradação voláteis da cantaxantina (a) 8 dias; (b) 12 dias; (c) 16 dias; (d) 28 dias; (e) 35 dias. Cromatógrafo a gás HP 5890 e detector de ionização de chama (CG/FID), coluna capilar de sílica fundida com fase estacionária de metil silicone (50m x 0,20 mm d.i.), 50°C/10min, 5°C/min até 200°C e 200°C por 10 min). (S – contaminante proveniente do solvente).

Estes mesmos compostos foram identificados na oxidação do  $\beta$ -caroteno à temperatura ambiente, o que levou a supor que estes compostos tiveram sua origem na cadeia poliênica (Padula e Rodriguez-Amaya, 1998). A Figura 4 mostra a possível origem dos compostos voláteis identificados na degradação da cantaxantina.



**FIGURA 4.** Possível formação de voláteis através da fragmentação da cantaxantina , à temperatura ambiente.

Não foram detectados voláteis provenientes do anel da cantaxantina.

Roshdy e Daun (1990), reportaram a formação de seis compostos voláteis, cinco deles cíclicos, formados a partir da degradação térmica da cantaxantina, à temperatura de 210°C por 4 horas. São compostos provenientes do anel. Para três deles os autores sugeriram mecanismos para sua formação. Este trabalho está de acordo com os demais estudos publicados para a degradação de carotenóides, principalmente  $\beta$ -caroteno, submetidos à alta temperatura, onde os compostos voláteis formados são relatados como provenientes principalmente do anel. (LaRoe e Shipley, 1970; Kawakami, 1982; Kanasawud e Crouzet, 1990; Glória *et al.*, 1991 e Glória e Gray, 1993).

Na literatura não foram encontrados estudos sobre a degradação de carotenóides à temperatura ambiente e formação de compostos voláteis e não-voláteis. O presente

trabalho, juntamente com o desenvolvido para o  $\beta$ -caroteno (Padula e Rodriguez-Amaya, 1998), sugere que à temperatura ambiente, no caso 30°C, os primeiros passos da degradação destes pigmentos envolvem a quebra da cadeia poliênica com formação principalmente de apocarotenais e compostos voláteis acíclicos.

## REFERÊNCIAS

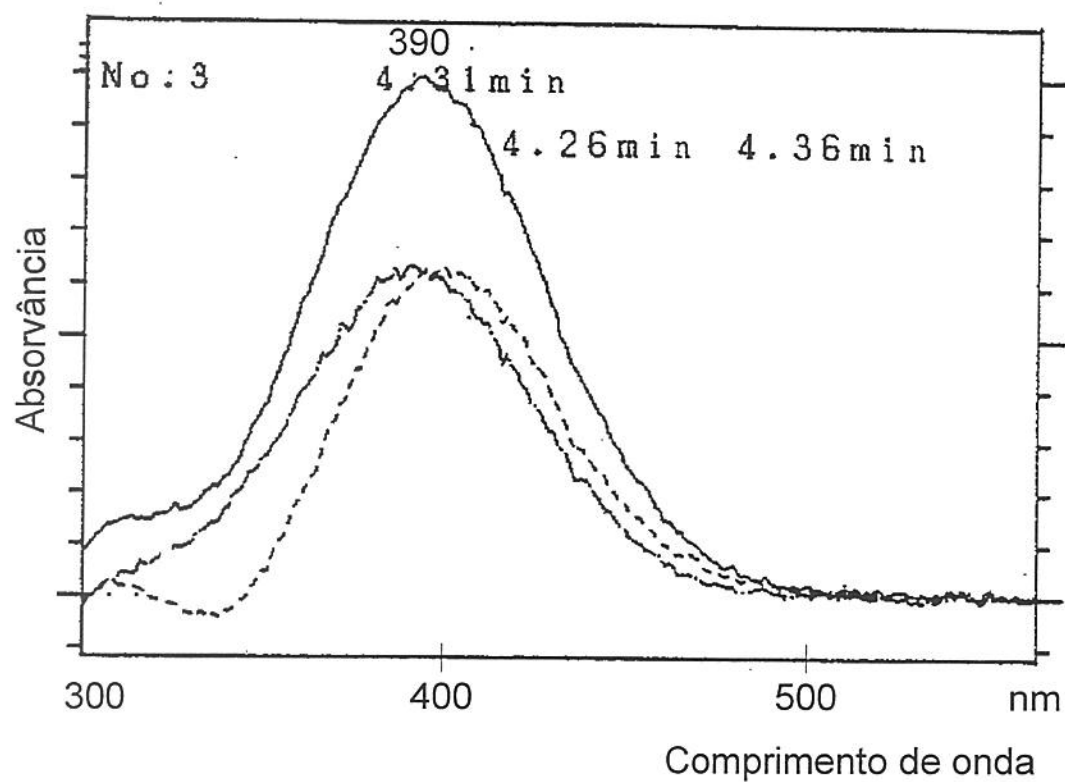
- Arya, G. L.; Natesan, V.; Parihar, D. B.; Vijayaraghavan, P. K. Stability of carotenoids in dehydrated carrots. *J. Food Technol.* **1979**, 14, 579-586.
- Byers, J. Isolation and identification of the polyenes formed during the thermal degradation of  $\beta$ -carotene. *J. Org. Chem.* **1983**, 48, 1515-1522.
- Chou, H.; Breene, W.H. Oxidative decoloration of  $\beta$ -carotene in low-moisture model systems. *J. Food. Sci.* **1972**, 37, 66-68.
- Davies, B.H. Carotenoids. In: *Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments*. Goodwin, T.W., Ed.; Academic Press: London, **1976**, 2nd ed., Vol. 2; pp. 38-65.
- El-Tinay, A. H.; Chichester, C. O. Oxidation of  $\beta$ -carotene. Site of initial attack. *J. Org. Chem.* **1970**, 35, 2290-2293.
- Glória, M.B.A.; Gray, J.I.; Grulke, E.A. Compostos voláteis formados durante a oxidação do  $\beta$ -caroteno. *Ciênc. e Tecnol. Aliment.* **1991**, 11, 36-44.
- Glória, M.B.A.; Gray, J.I. Effect of type of oxidation on  $\beta$ -carotene loss and volatile products formation in model system. *Food Chem.* **1993**, 46, 401-406.
- Goldman, M.; Horev, B.; Saguy, J. Decolorization of  $\beta$ -carotene in model systems simulating dehydrated foods. Mechanism and kinetics principles. *J. Food Sci.* **1983**, 48, 751-754.

- Isoe, S.; Be Hyeon, S.; Sakan, T. Photo-oxygenation of carotenoids I. The formation of dehydroactinidiolide and  $\beta$ -ionone from  $\beta$ -carotene. *Tetrahedron Lett.* **1969**, 4, 279-281.
- Isoe, S.; Be Hyeon, S.; Katsumura, S.; Sakan, T. Photo-oxygenation of carotenoids II. The absolute configuration of loliolide and dihydroactinidiolide. *Tetrahedron Lett.* **1972**, 25, 2517-2520.
- Kanasawud, P.; Crouzet, J.C. Mechanism of formation of volatile compounds by thermal degradation of carotenoids in aqueous medium 1.  $\beta$ -carotene degradation. *J. Agric. Food Chem.* **1990**, 38, 237-243.
- Kawakami, M. Ionone species compounds from  $\beta$ -carotene by thermal degradation in aqueous medium. *Nippon Nôgeikagaku Kaishi.* **1982**, 56, 917-921. (In Japanese)
- LaRoe, E.G.; Shipley, P.A. Whiskey composition: formation of alfa-and  $\beta$ -ionone by thermal decomposition of  $\beta$ -carotene. *J. Agric. Food Chem.* **1970**, 18, 174-175.
- Marty, C.; Berset, C. Degradation of *trans*- $\beta$ -carotene during heating in sealed glass tubes and extrusion cooking. *J. Food Sci.* **1986**, 51, 698-702.
- Marty, C.; Berset, C. Degradation products of *trans*- $\beta$ -carotene produced during extrusion cooking. *J. Food Sci.* **1988**, 53, 1880-1886.
- Minguez-Mosquera, M. I.; Jaren-Galan, M. Kinetics of the decolouring of carotenoid pigments. *J. Sci. Food. Agric.* **1995**, 67, 153-161.
- Ouyang, J.M.; Daun, H.; Chang, S.S.; Ho, C.T. Formation of carbonyl compounds from  $\beta$ -carotene during palm oil deodorization. *J. Food Sci.* **1980**, 45, 1214-1217
- Onyewu, P.N.; Daun, H.; Ho, C.T. Formation of two thermal degradation products of  $\beta$ -carotene. *J. Agric. Food Chem.* **1982**, 30, 1147-1151.

- Onyewu, P.N.; Ho, C.T.; Daun, H. Characterization of  $\beta$ -carotene thermal degradation products in a model food system. *J. Am. Oil. Chem. Soc.* **1986**, 63, 1437-1441.
- Padula, M.; Rodriguez-Amaya, D. B.; Carvalho, P. R. N. Cinética de degradação de  $\beta$ -caroteno em sistema-modelo de baixa umidade à temperatura ambiente. (submetido à publicação), 1998.
- Padula, M.; Rodriguez-Amaya, D. B. Degradation of  $\beta$ -carotene in a low-moisture model system at ambient temperature. Formation of non-volatile and volatile products. (submetido a publicação), 1998.
- Pesek, C. A.; Warthesen, J. J.; Taoukis, P. S. A kinetic model for equilibration of isomeric  $\beta$ -carotenes. *J. Agric. Food Chem.* **1990**, 38, 41-45.
- Ramakrishnan, T.V.; Francis, F.J. Stability of carotenoids in model aqueous systems. *J. Food Qual.* **1979**, 2, 177-189.
- Ramakrishnan, T.V.; Francis, F.J. Autoxidation of carotenoids and their relative polarity. *J. Food Qual.* **1980**, 3, 25-34.
- Roshdy, T. H.; Daun, H. Use of GC-MS technique for identification of oxygenated volatile thermal degradation products of canthaxanthin. *J. Agric. Food Chem.* **1990**, 38, 1391-1396.
- Stefanovich, A. F.; Karel, M. Kinetics of beta-carotene degradation at temperatures typical of air drying of foods. *J. Food. Proc. Preserv.* **1982**, 6, 227-242.
- Teixeira Neto, R.O.; Karel, M.; Saguy, I.; Mizrahi, S. Oxygen uptake and  $\beta$ -carotene decoloration in dehydrated food model. *J. Food. Sci.* **1981**, 46, 665-676.

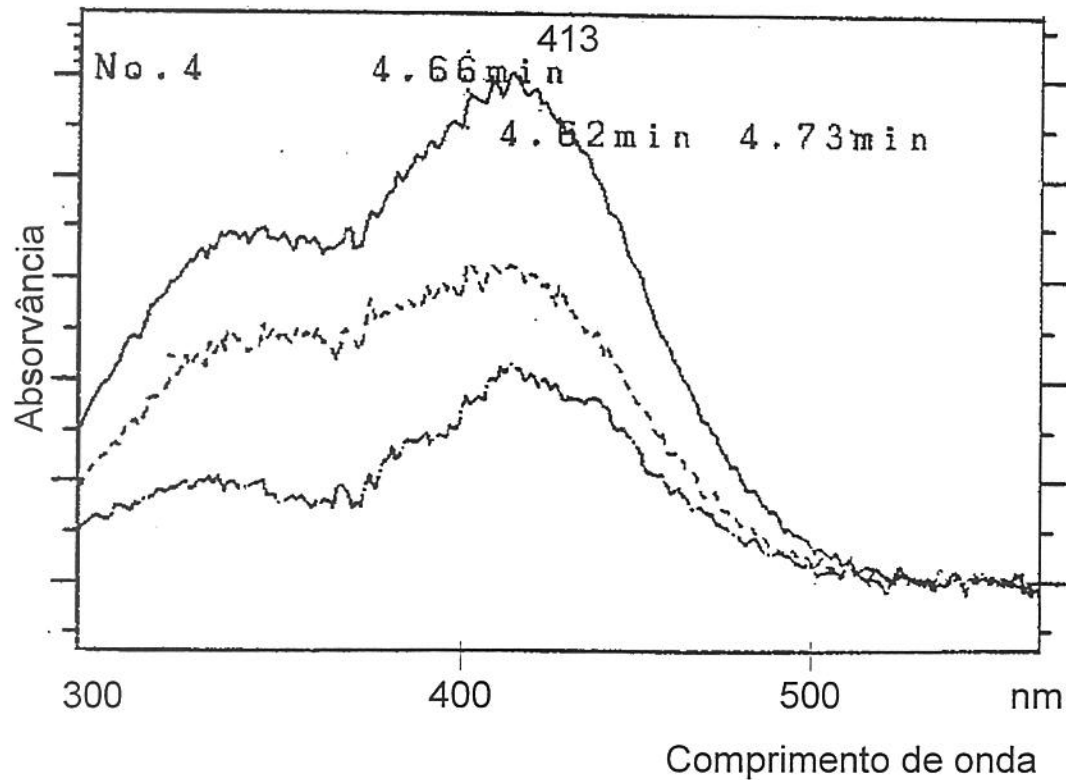
## ANEXO I

### **ESPECTROS DE ABSORÇÃO OBTIDOS PARA OS COMPOSTOS DE DEGRADAÇÃO NÃO-VOLÁTEIS PROVENIENTES DO $\beta$ -CAROTENO**

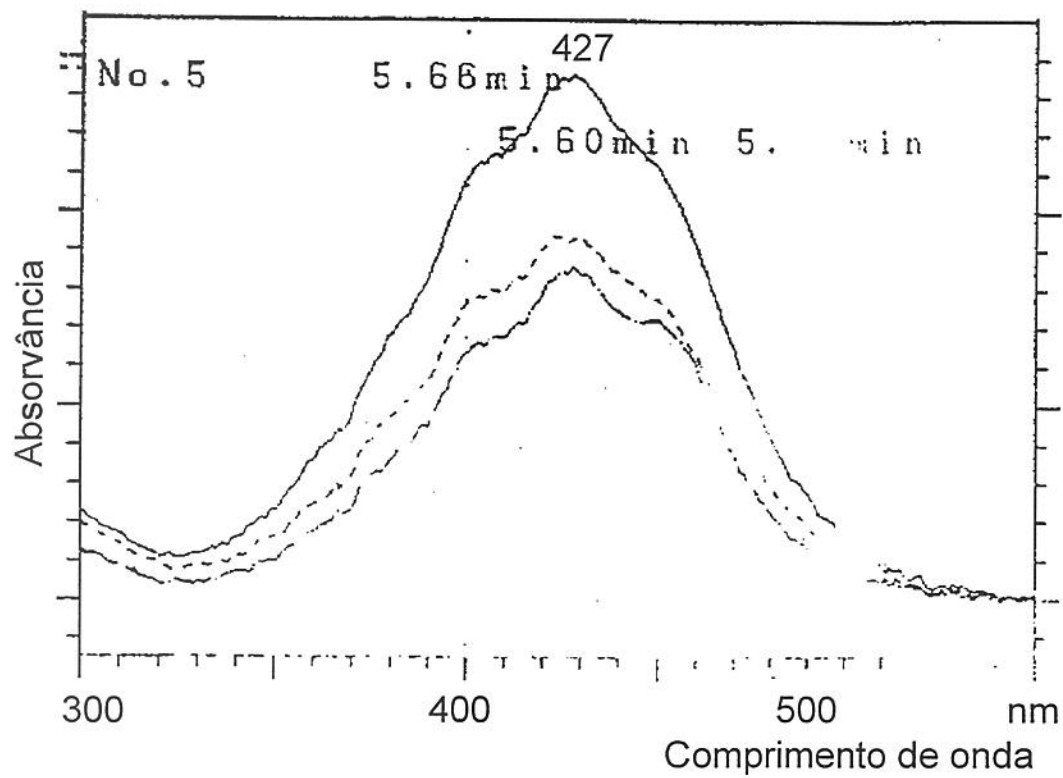


Espectro de absorção, obtido pelo detector de conjunto de diodos, em THF/metanol (5:95 v/v), do  $\beta$ -apo-14'-carotenal (pico 3 - FIGURA 3, Capítulo 3).

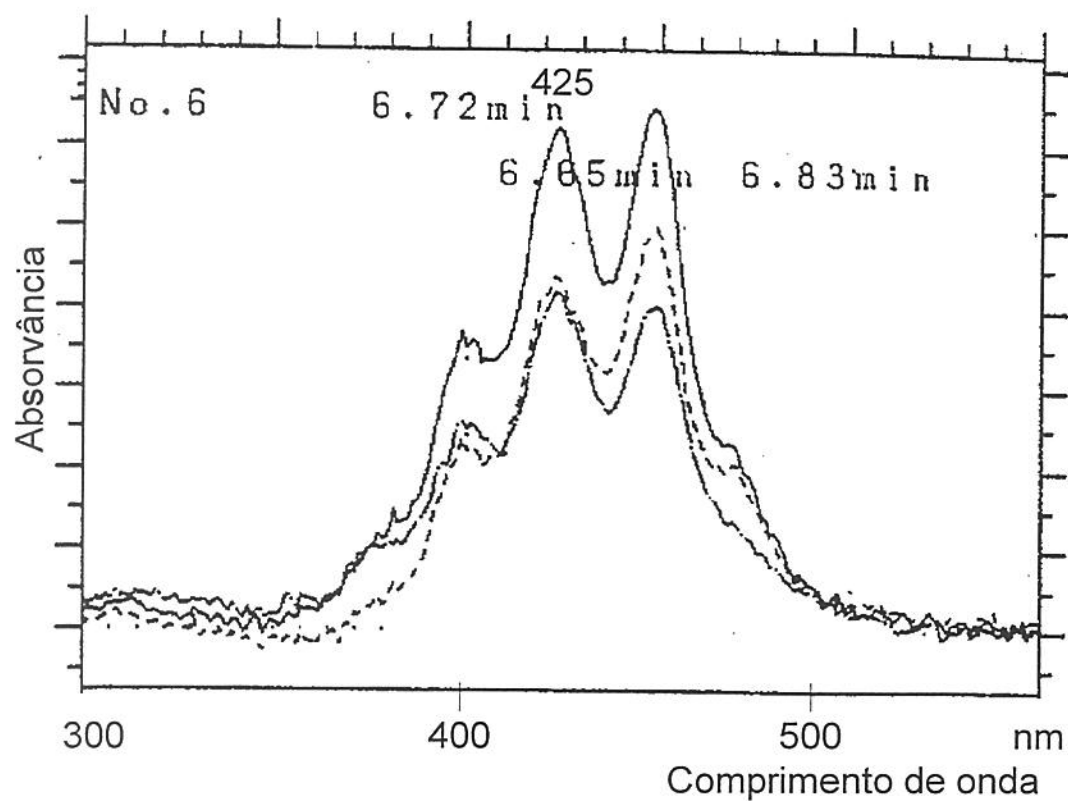




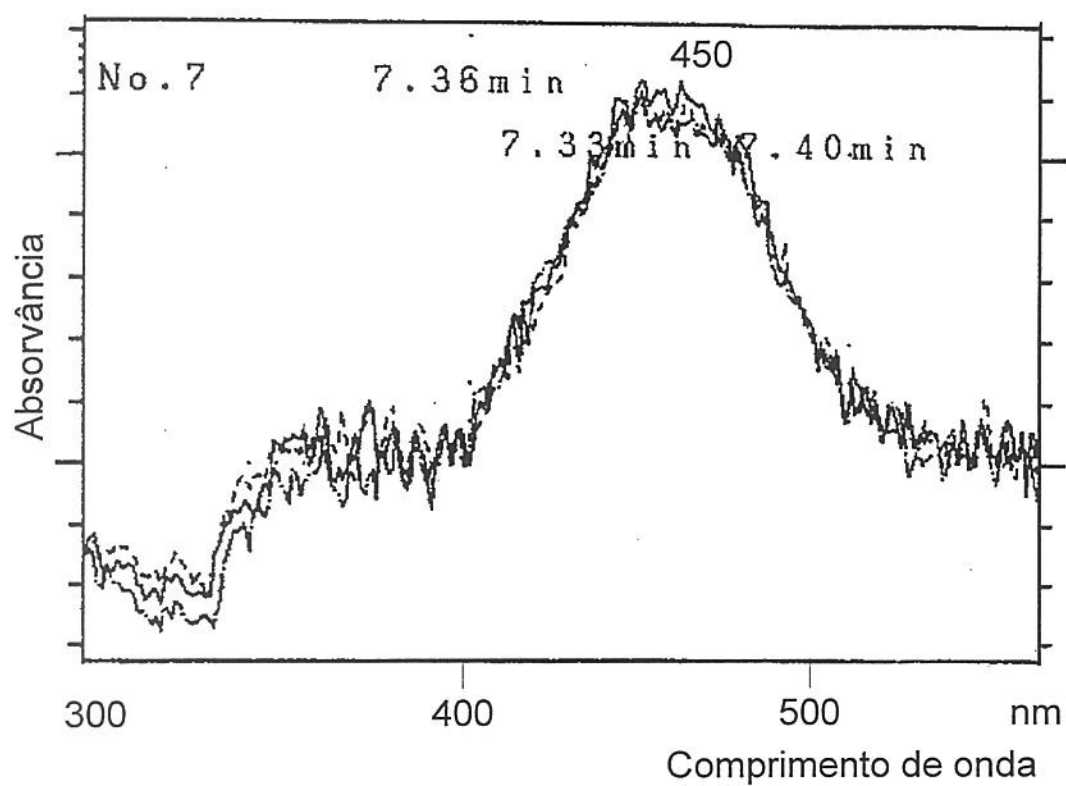
Espectro de absorção, obtido pelo detector de conjunto de diodos, em THF/metanol (5:95 v/v), do  $\beta$ -apo-12'-carotenal (pico 4 - FIGURA 3, Capítulo 3).



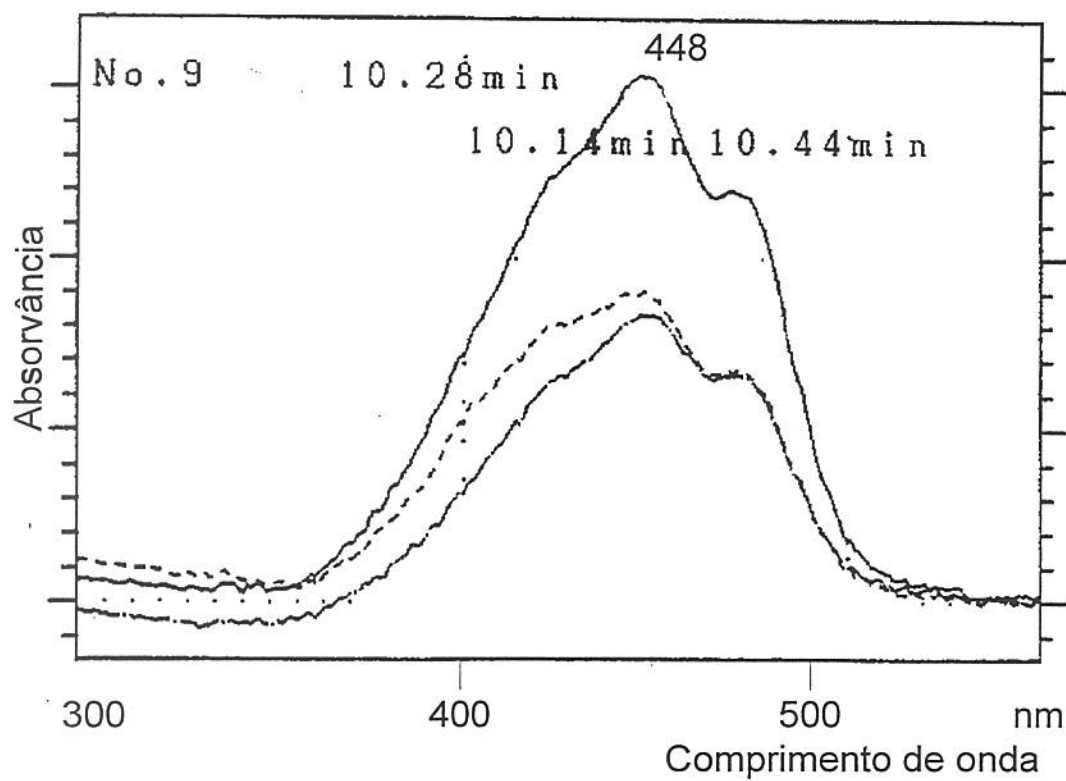
Espectro de absorção, obtido pelo detector de conjunto de diodos, em THF/metanol (5:95 v/v), do  $\beta$ -apo-10'-carotenal (pico 5 - FIGURA 3, Capítulo 3).



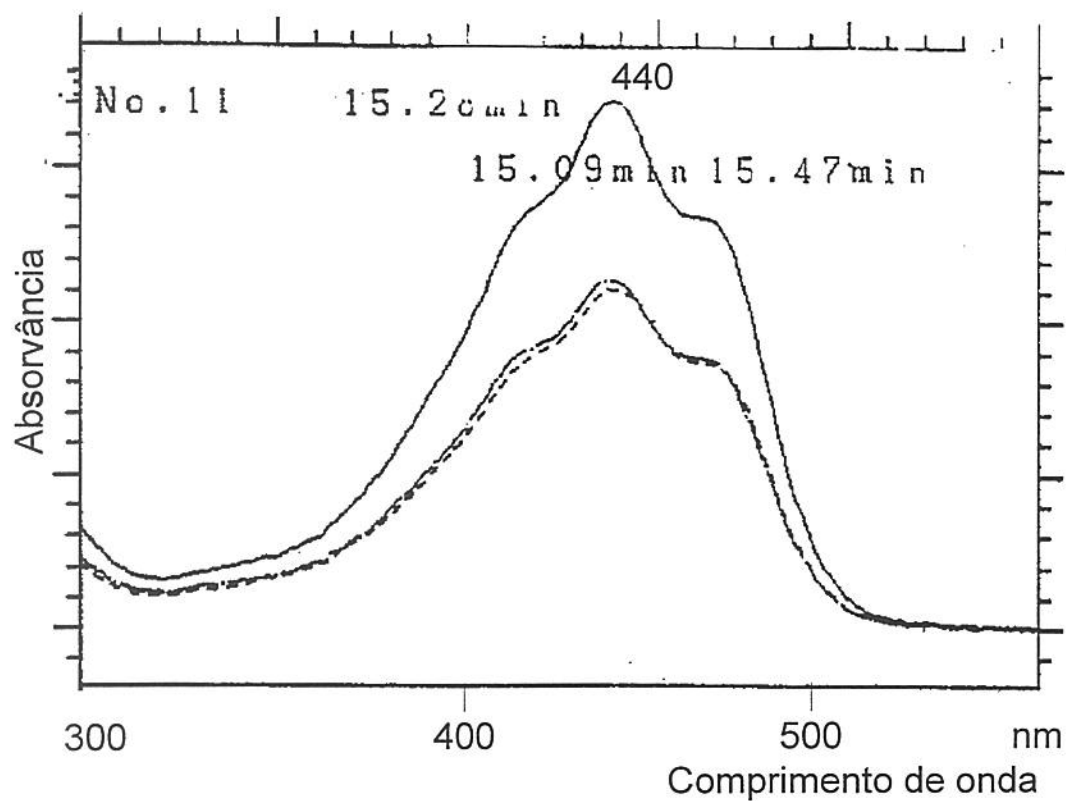
Espectro de absorção, obtido pelo detector de conjunto de diodos, em THF/metanol (5:95 v/v), do 5,8-epoxi- $\beta$ -caroteno (pico 6 - FIGURA 3, Capítulo 3).



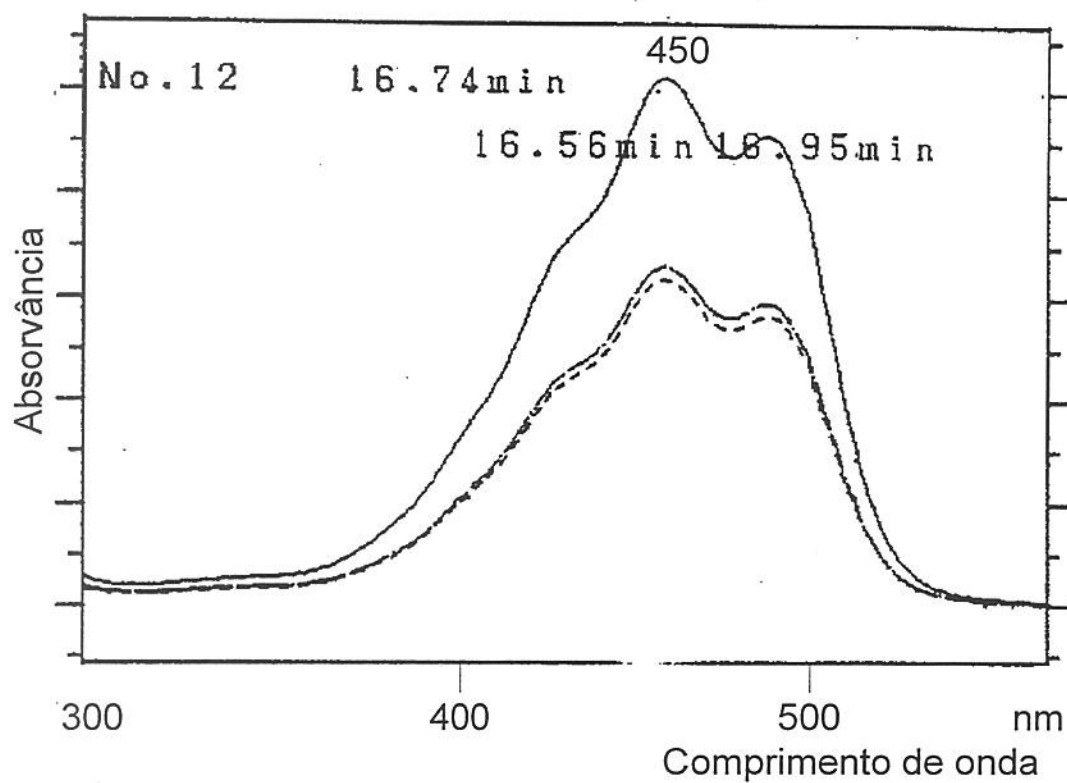
Espectro de absorção, obtido pelo detector de conjunto de diodos, em THF/metanol (5:95 v/v), do  $\beta$ -apo-8'-carotenal (pico 7 - FIGURA 3, Capítulo 3).



Espectro de absorção, obtido pelo detector de conjunto de diodos, em THF/metanol (5:95 v/v), do 4-hidroxi- $\beta$ -caroteno (isocriptoxantina) (pico 9 - FIGURA 3, Capítulo 3).

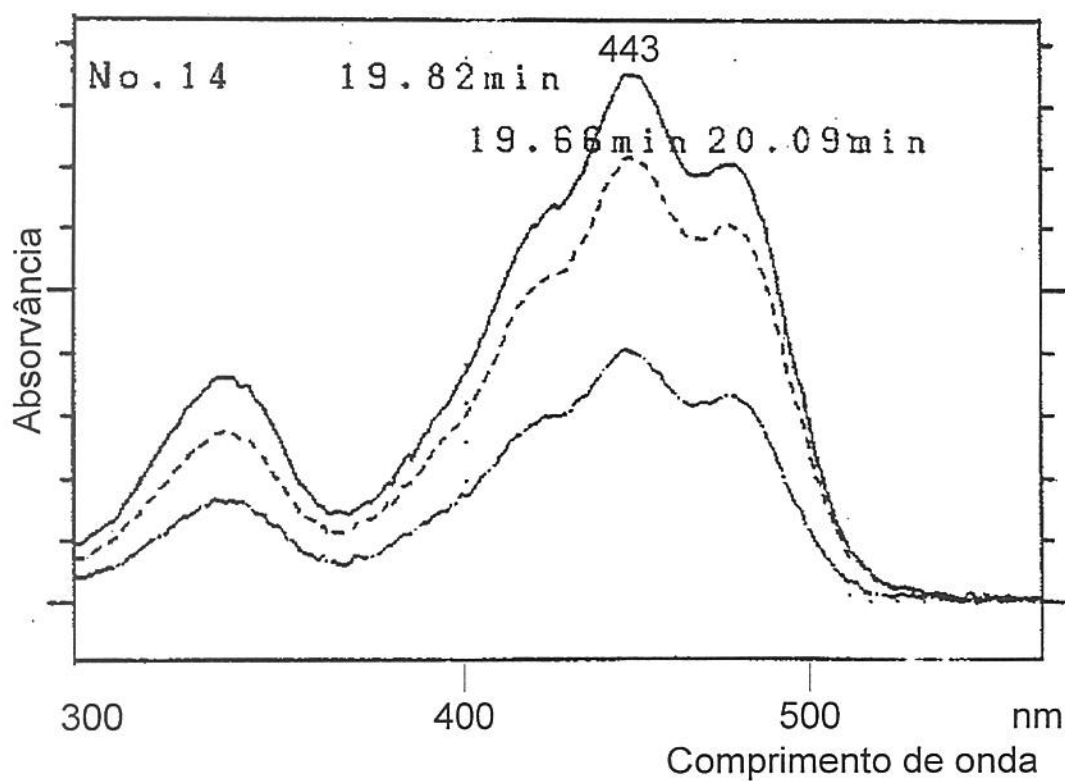


Espectro de absorção, obtido pelo detector de conjunto de diodos, em THF/metanol (5:95 v/v), do 5,6,5',6'-diepoxi- $\beta$ -caroteno (pico 11 - FIGURA 3, Capítulo 3).

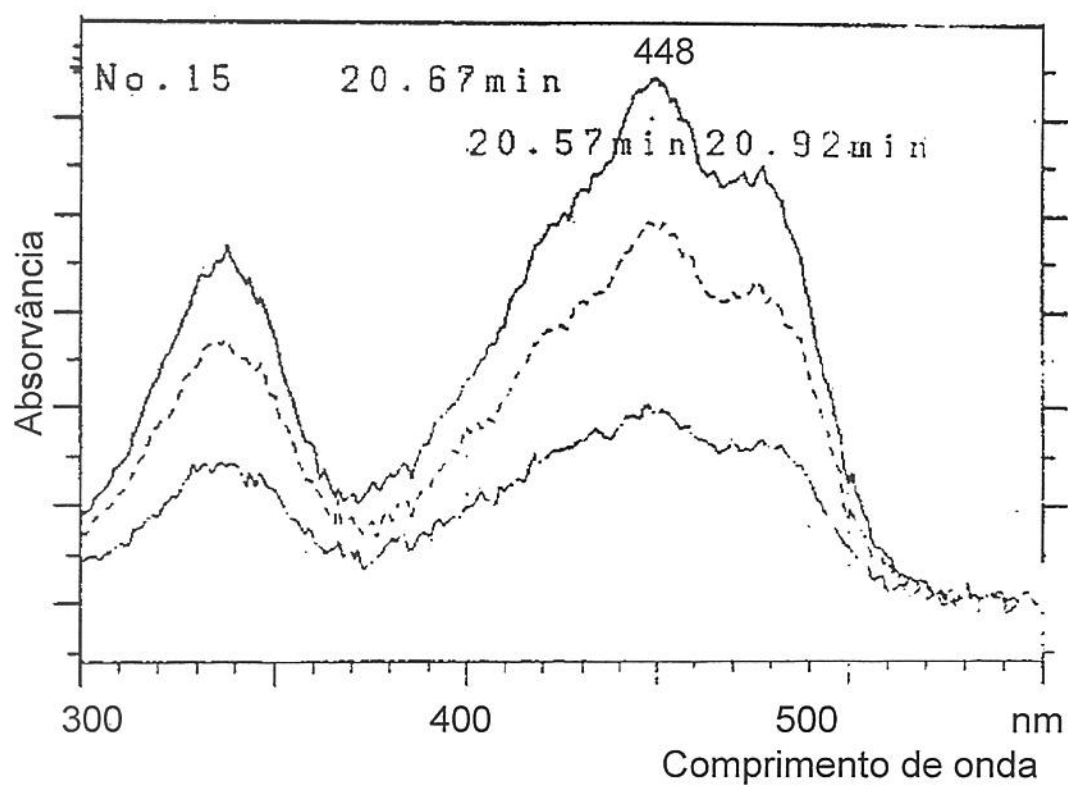


Espectro de absorção, obtido pelo detector de conjunto de diodos, em THF/metanol (5:95 v/v), do  $\beta$ -caroteno (pico 12 - FIGURA 3, Capítulo 3).





Espectro de absorção, obtido pelo detector de conjunto de diodos, em THF/metanol (5:95 v/v), do 13-*cis*-β-caroteno (pico 14 - FIGURA 3, Capítulo 3).



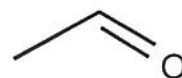
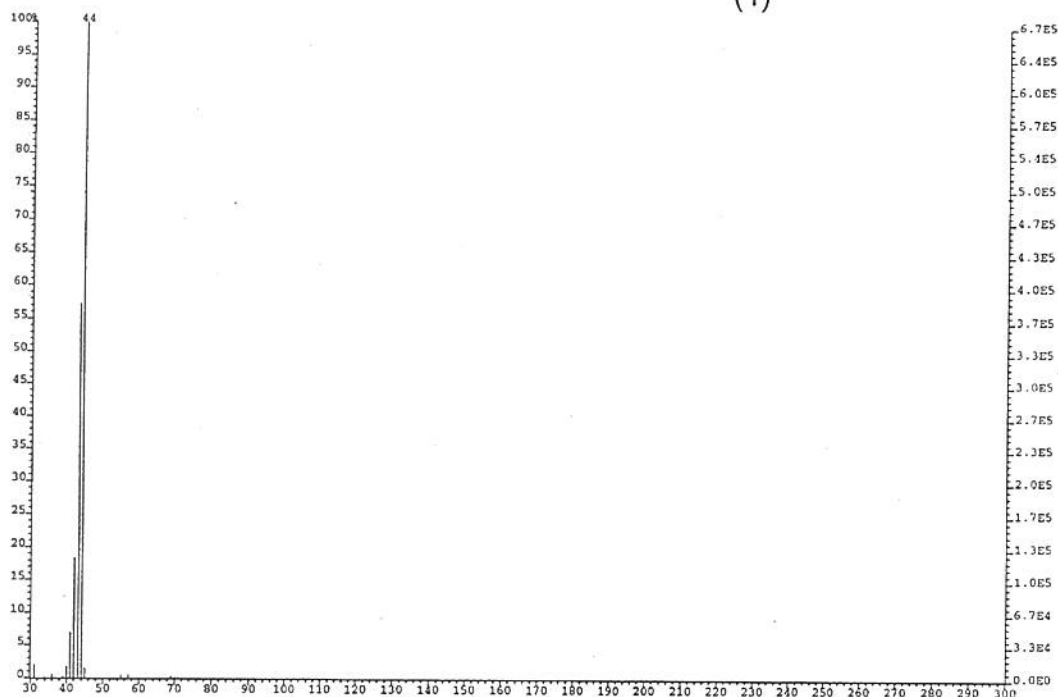
Espectro de absorção, obtido pelo detector de conjunto de diodos, em THF/metanol (5:95 v/v), do 15-*cis*-β-caroteno (pico 15 - FIGURA 3, capítulo 3).

## ANEXO II

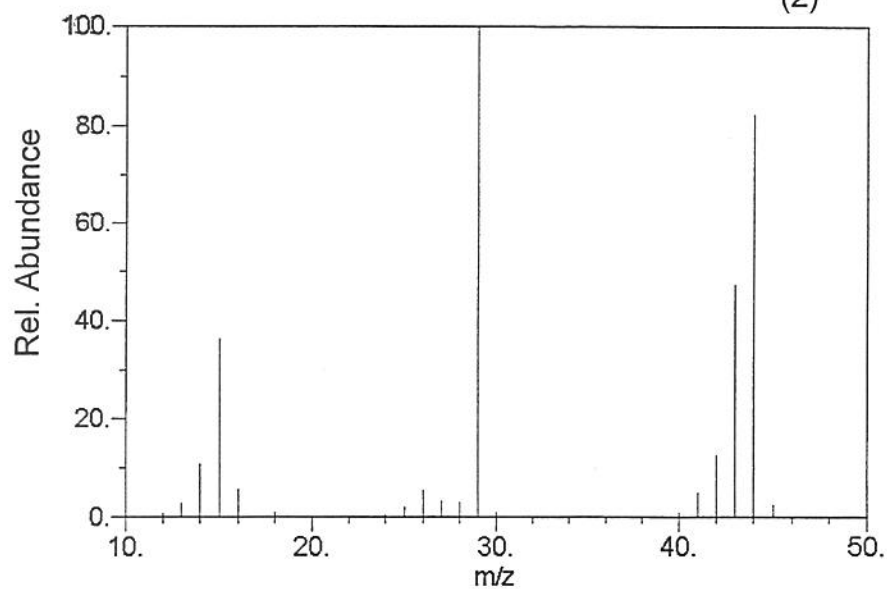
### **ESPECTROS DE MASSAS OBTIDOS PARA OS COMPOSTOS DE DEGRADAÇÃO VOLÁTEIS PROVENIENTES DO $\beta$ -CAROTENO**

# Acetaldeído

(1)



(2)



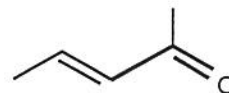
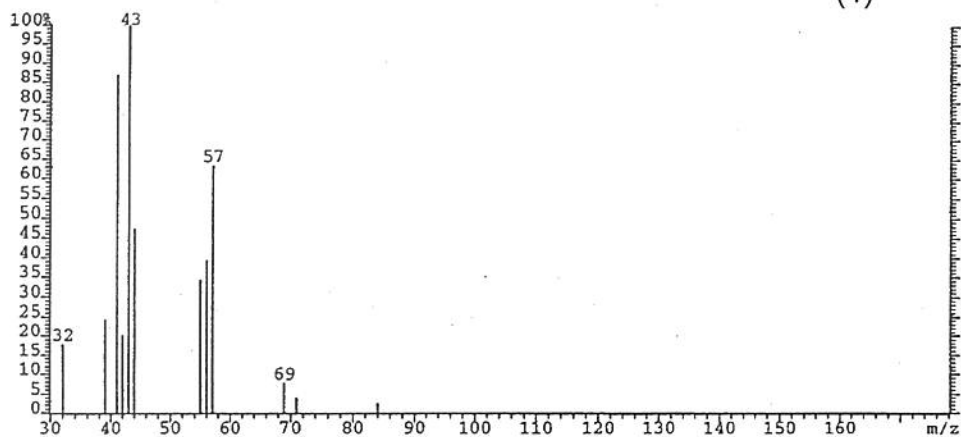
Espectro de massa obtido para o pico nº 1 (FIGURA 5, Capítulo 3) - acetaldeído

(1) espectro (NIST)

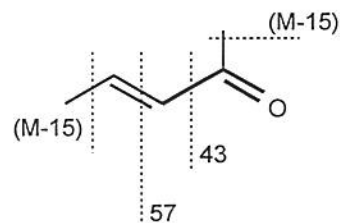
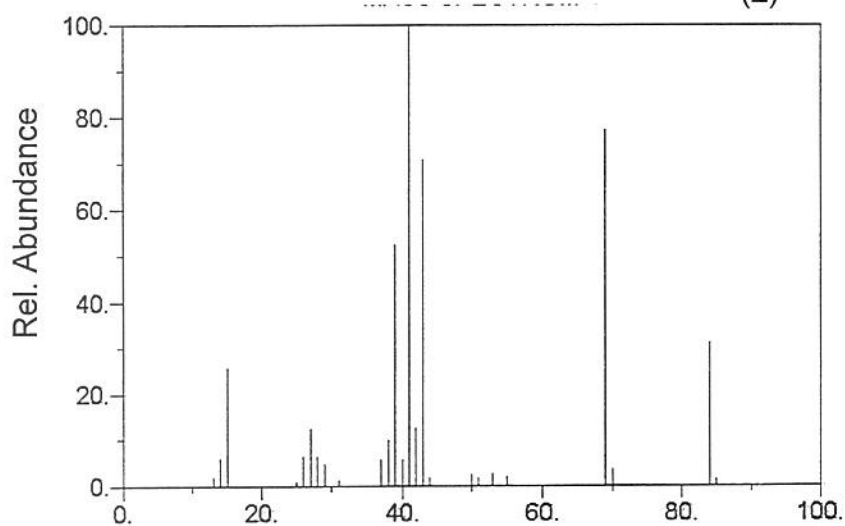
(2) espectro literatura

# 3-penten-2-ona

(1)



(2)



Espectro de massa obtido para o pico nº 2 (FIGURA 5, Capítulo 3)

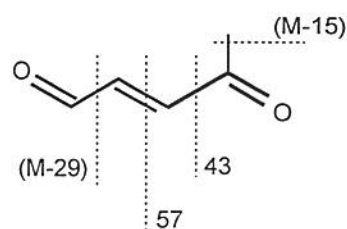
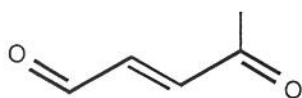
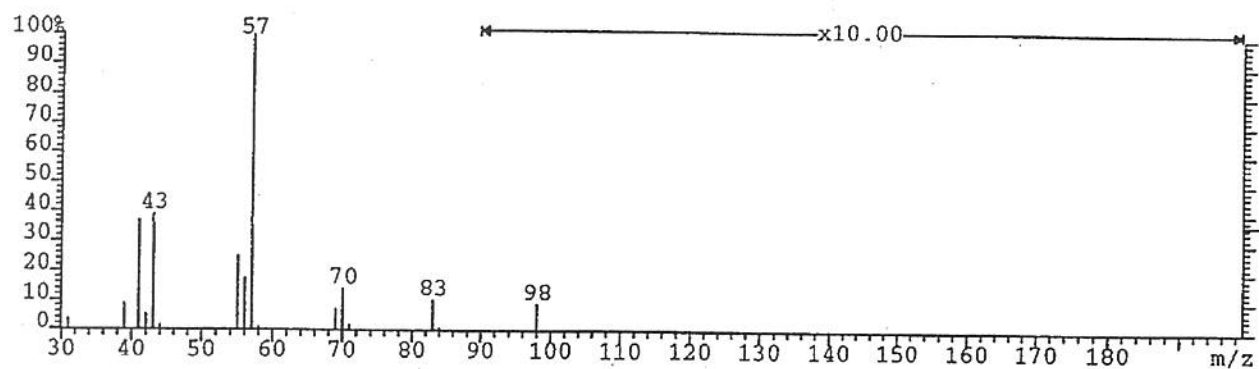
3-penten-2-ona

(1) espectro

(2) espectro literatura (NIST)

# 4-oxo-2-pentenal

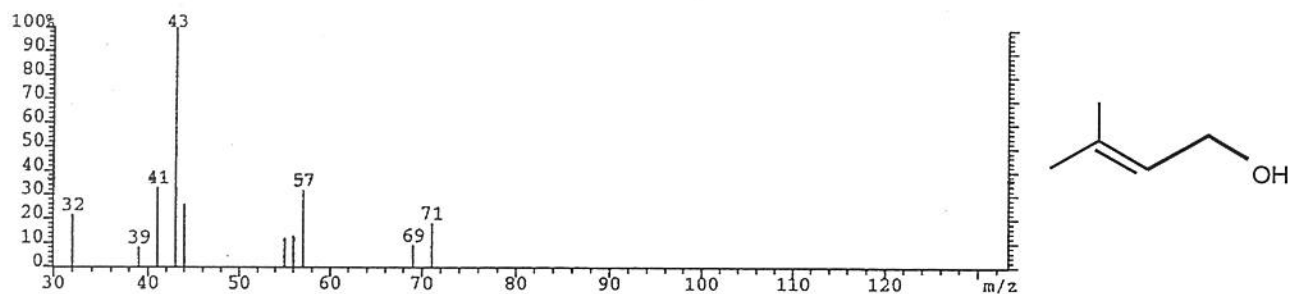
(1)



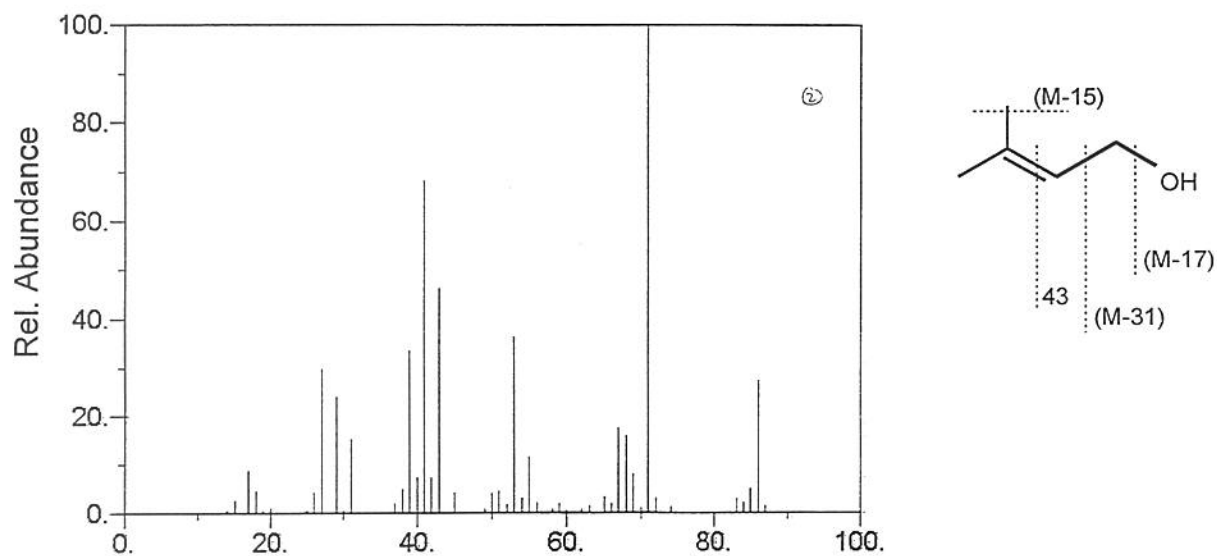
Espectro de massa obtido para o pico nº 3 (FIGURA 5, Capítulo 3) - 4-oxo-2-pentenal

# 3-metil-2-buten-1-ol

(1)



(2)



Espectro de massa obtido para o pico nº 4 (FIGURA 5, Capítulo 3)

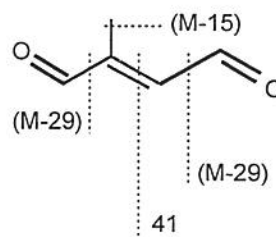
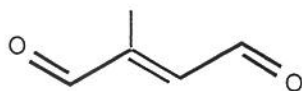
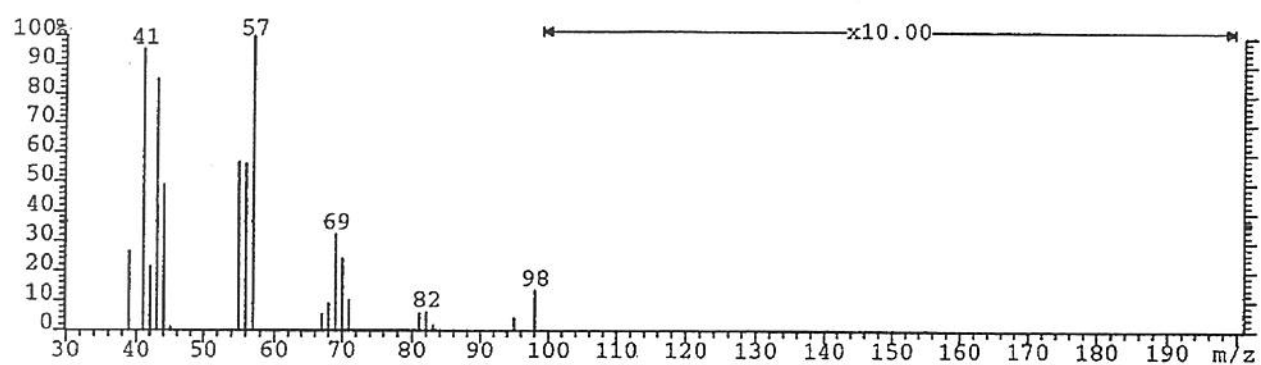
3-metil-2-buten-1-ol

(1) espectro

(2) espectro literatura (NIST)

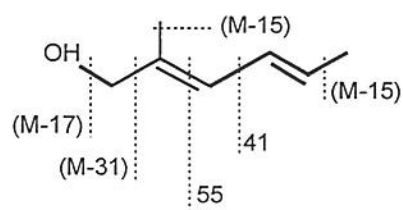
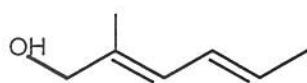
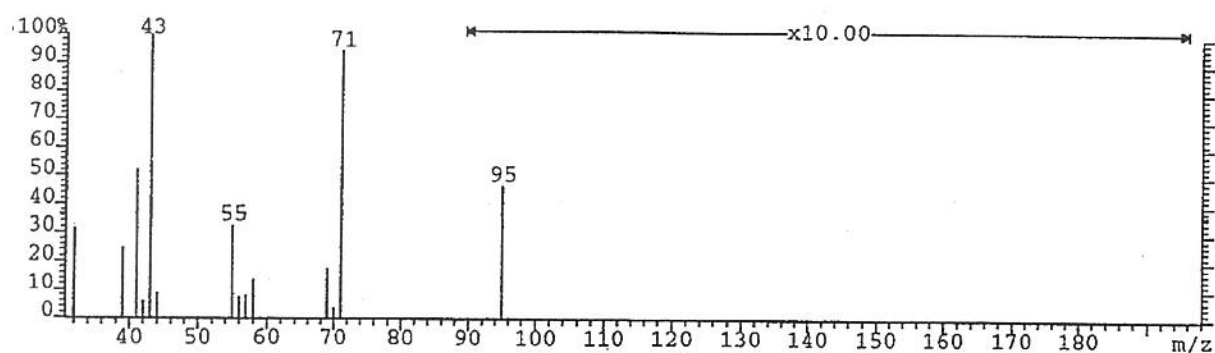


## 2-metil-2-buten-1,4-dial



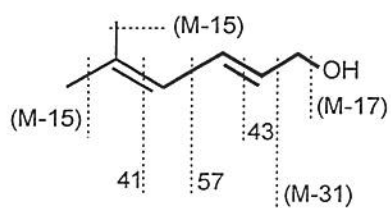
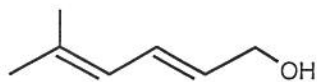
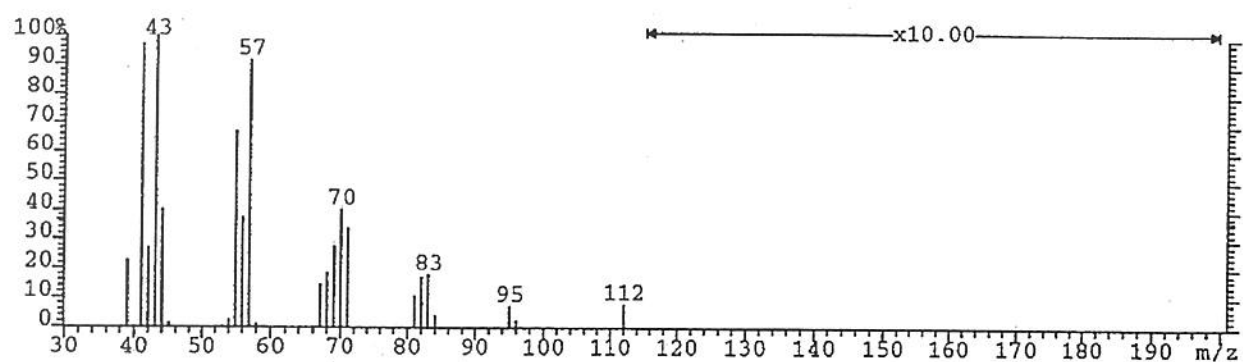
Espectro de massa obtido para o pico nº 5 (FIGURA 5, Capítulo 3) - 2-metil-2-buten-1,4-dial

## 2-metil-2,4-hexadien-1-ol



Espectro de massa obtido para o pico nº 6 (FIGURA 5, Capítulo 3)  
2-metil-2,4-hexadien-1-ol

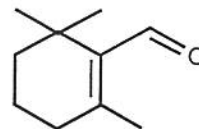
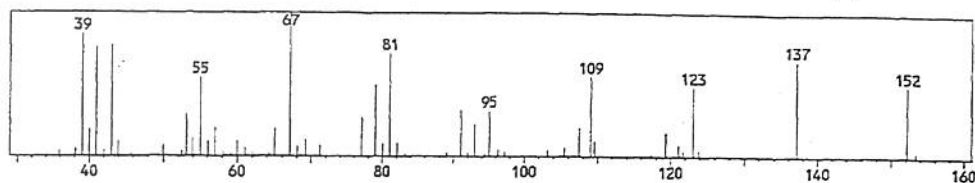
## 5-metil-2,4-hexadien-1-ol



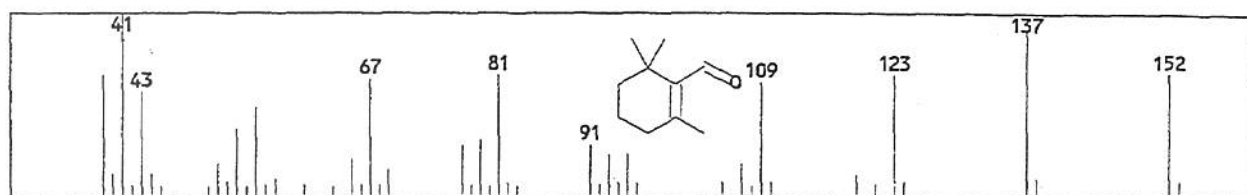
Espectro de massa obtido para o pico nº 7 (FIGURA 5, Capítulo 3)  
5-metil-2,4-hexadien-1-ol

# $\beta$ -ciclocitral

(1)

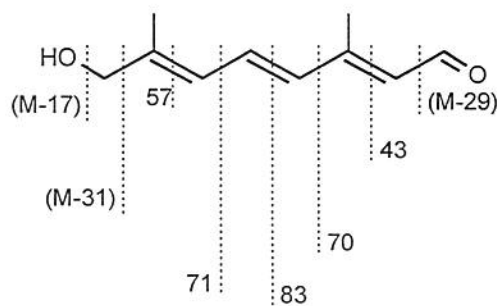
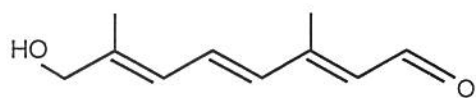
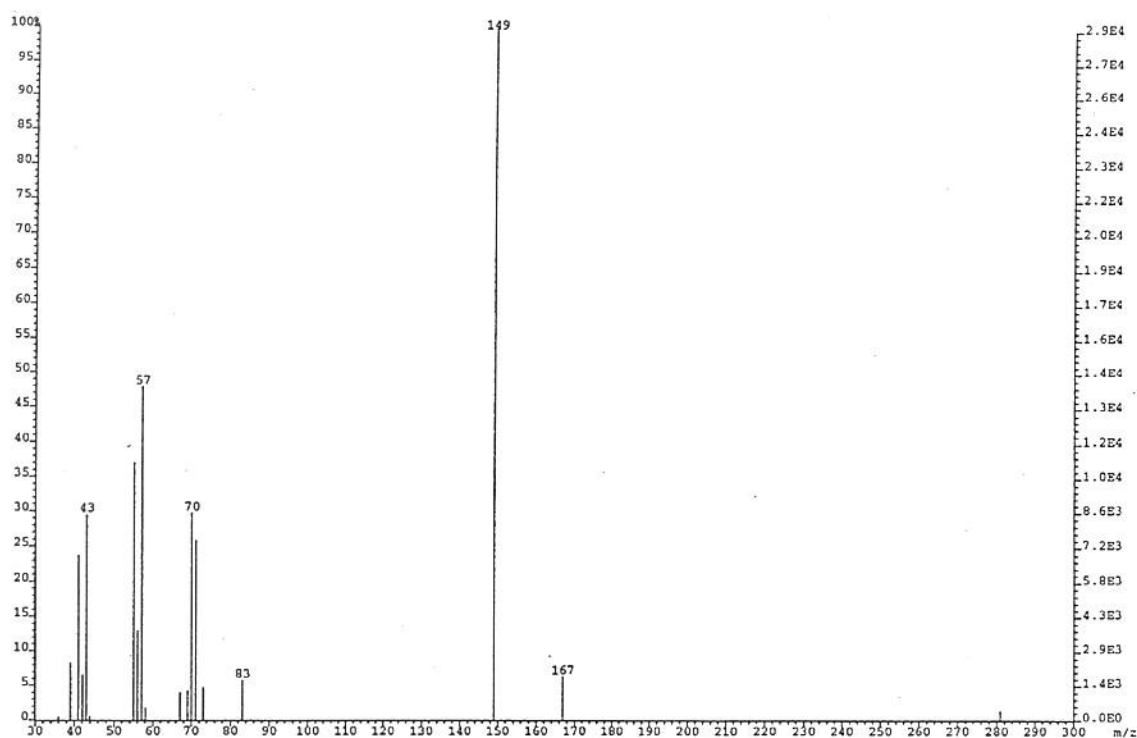


(2)



Espectro de massa obtido para o pico nº 8 (FIGURA 6, Capítulo 3) -  $\beta$ -ciclocitral  
(1) espectro  
(2) espectro literatura (NIST)

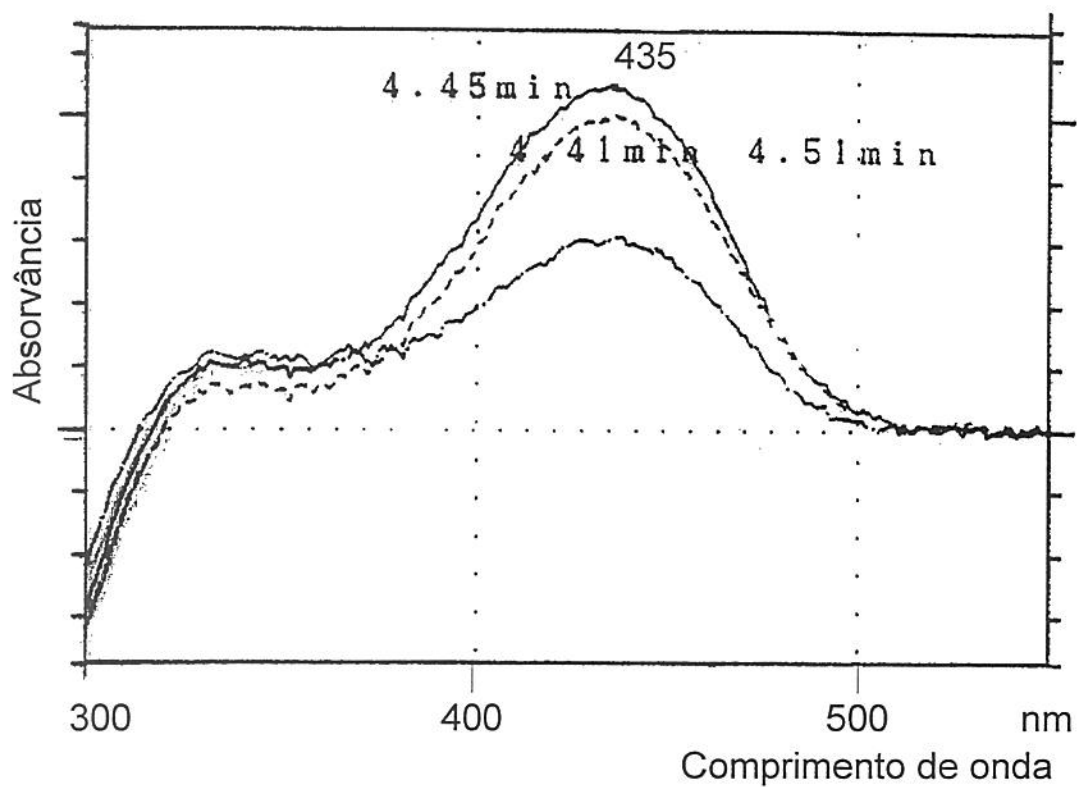
## 8-hidroxi-3,7-dimetil-2,4,6-trieno-1-octanal



Espectro de massa obtido para o pico nº 9 (FIGURA 5, Capítulo 3) - 8-hidroxi-3,7-dimetil-2,4,6-trieno-1-octanal

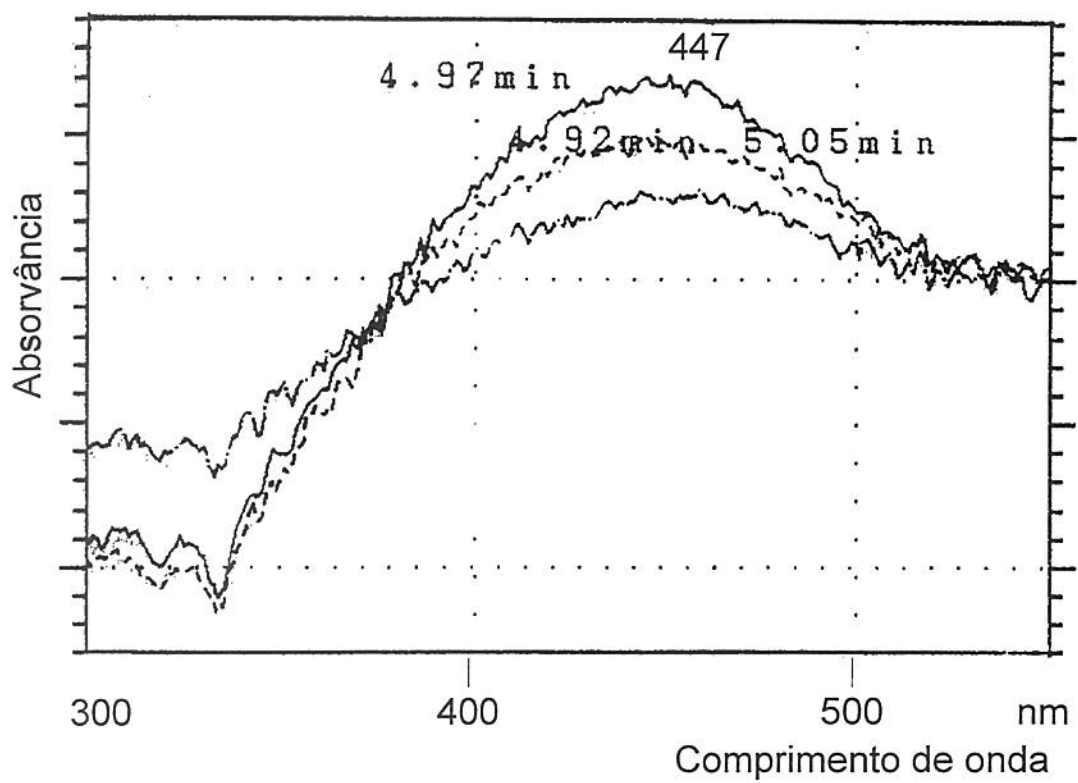
## ANEXO III

### **ESPECTROS DE ABSORÇÃO OBTIDOS PARA OS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO NÃO-VOLÁTEIS DA CANTAXANTINA**

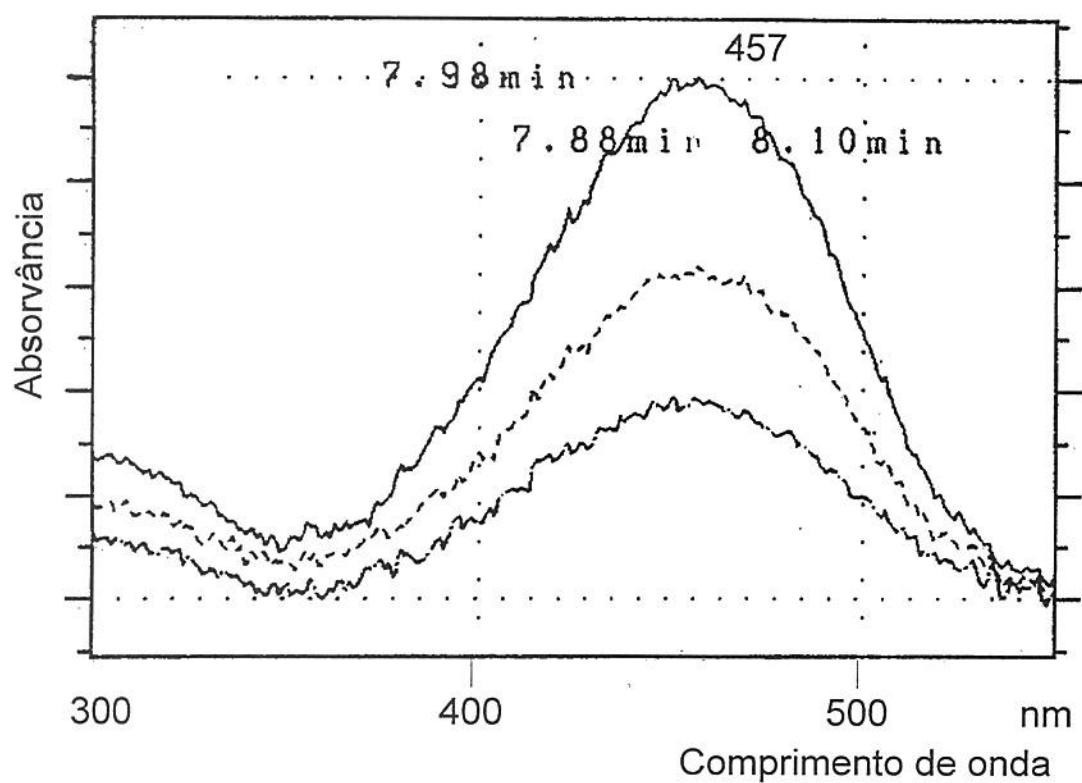


Espectro de absorção, obtido pelo detector de conjunto de diodos, em THF/metanol (2:98 v/v) do apo-12'-cantaxantinal (pico 1 - FIGURA 1, Capítulo 4).

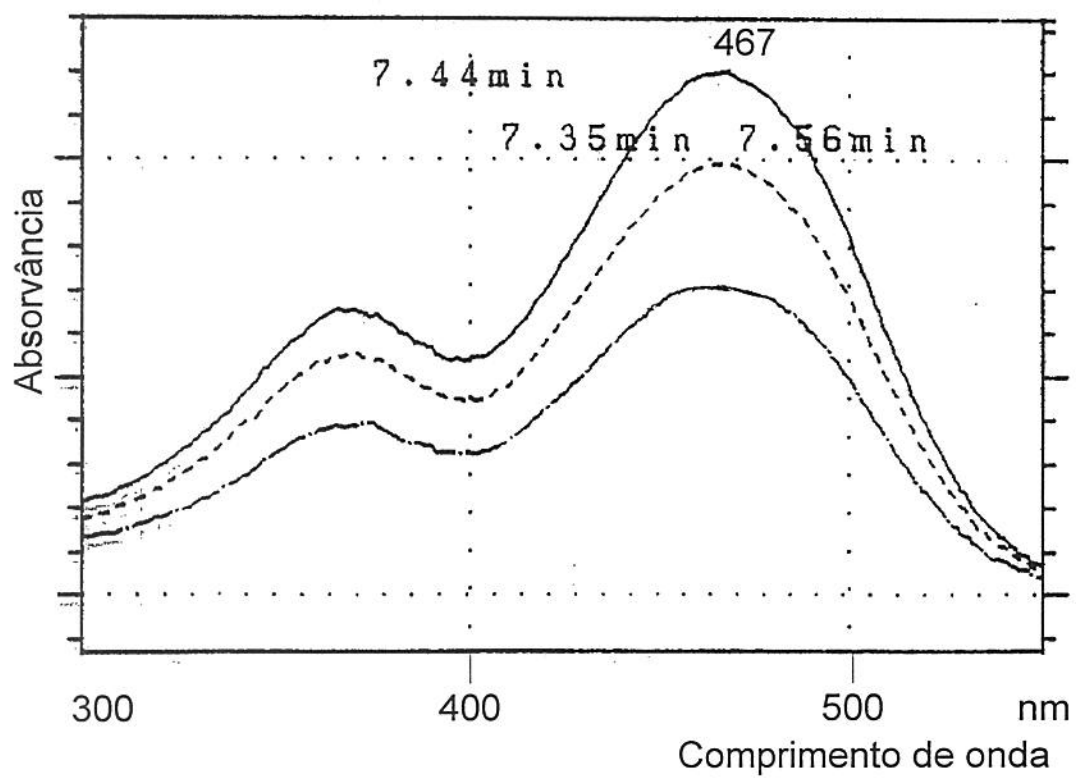




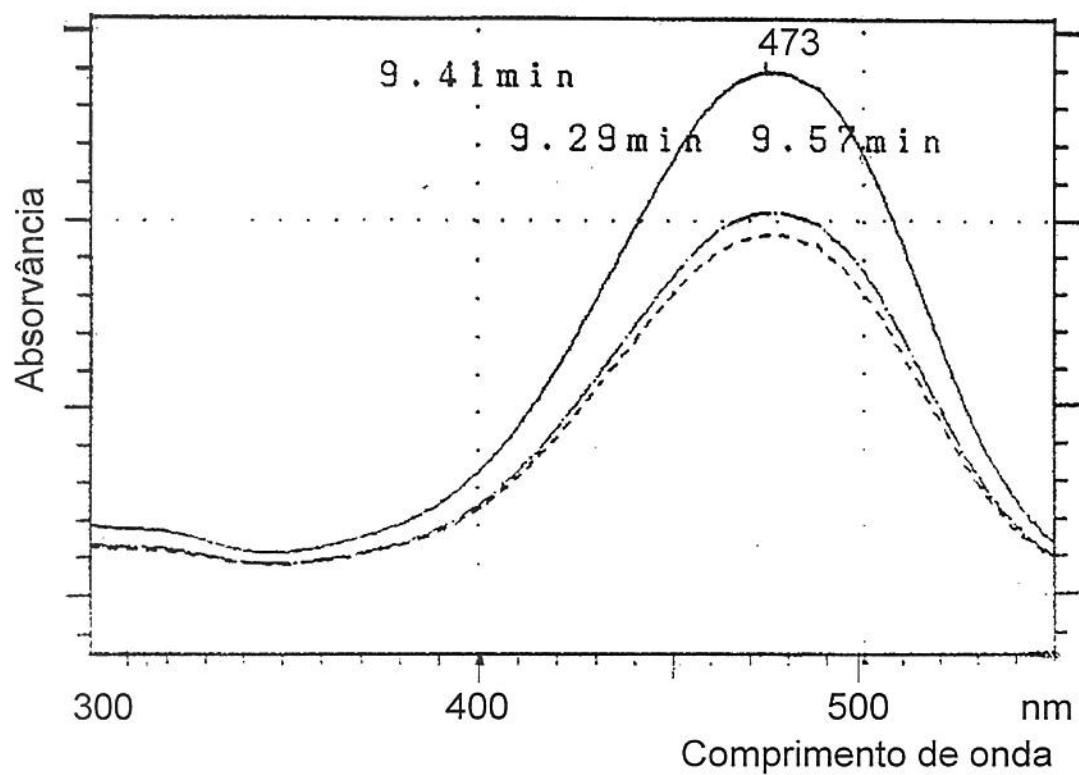
Espectro de absorção, obtido pelo detector de conjunto de diodos, em THF/metanol (2:98 v/v) do apo-10'-cantaxantinal (pico 2 - FIGURA 1, Capítulo 4).



Espectro de absorção, obtido pelo detector de conjunto de diodos, em THF/metanol (2:98 v/v) do apo-8'-cantaxantinal (pico 3 - FIGURA 1, Capítulo 4).



Espectro de absorção, obtido pelo detector de conjunto de diodos, em THF/metanol (2:98 v/v) - *cis*-cantaxantina (pico 4 - FIGURA 1, Capítulo 4).

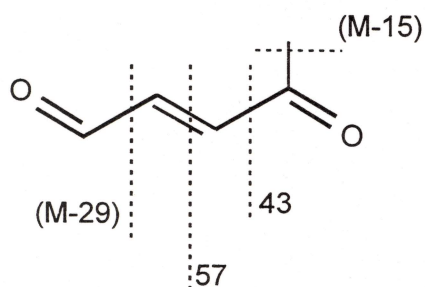
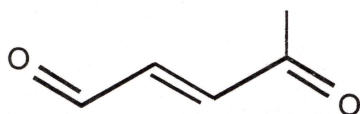
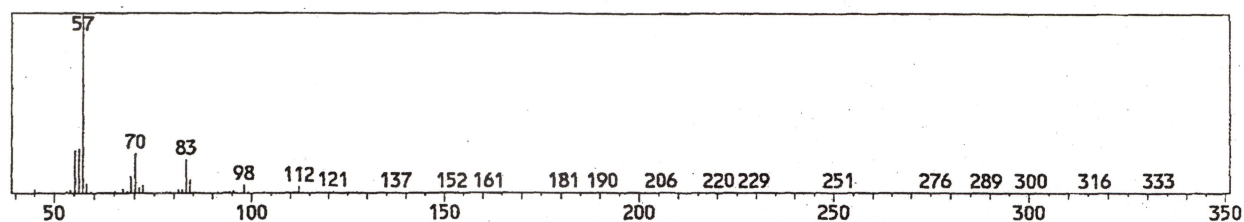


Espectro de absorção, obtido pelo detector de conjunto de diodos, em THF/metanol (2:98 v/v) cantaxantina (FIGURA 1, Capítulo 4).

## ANEXO IV

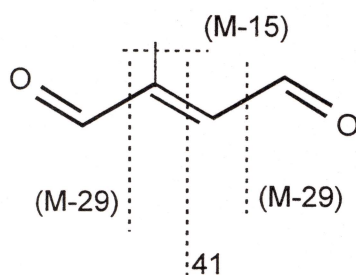
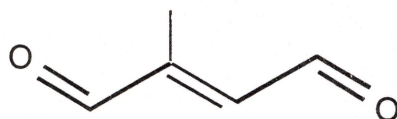
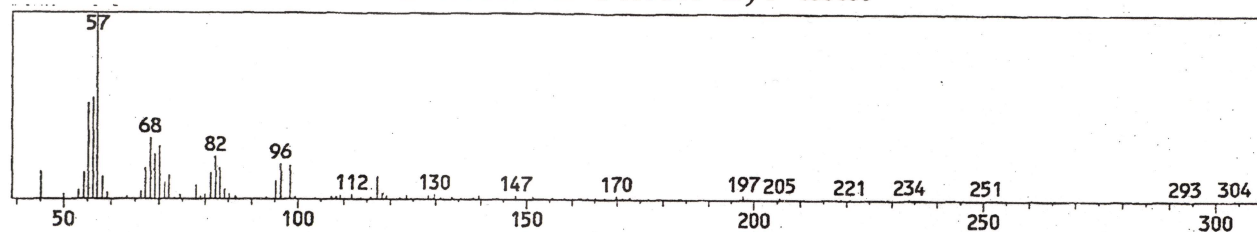
### **ESPECTROS DE MASSAS OBTIDOS PARA OS COMPOSTOS DE DEGRADAÇÃO VOLÁTEIS PROVENIENTES DA CANTAXANTINA**

### 4-oxo-2-pentenal



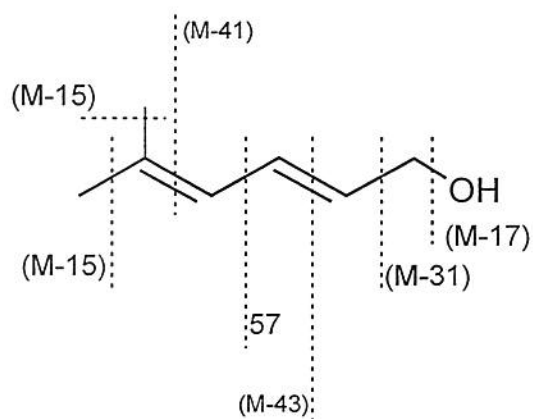
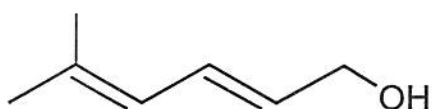
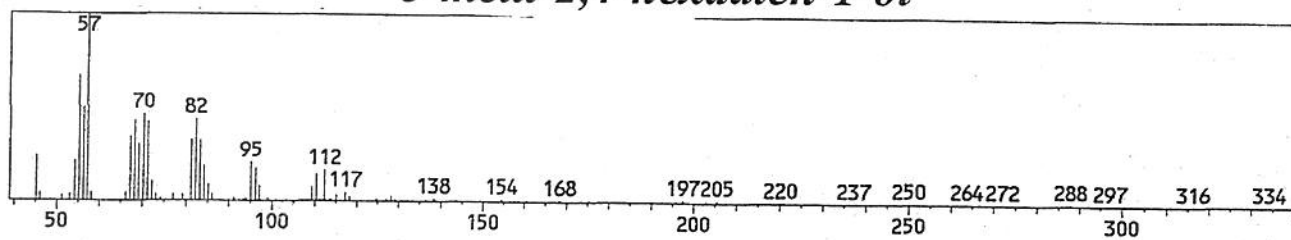
Espectro de massa obtido para o pico nº 1 (FIGURA 3, Capítulo 4).  
4-oxo-2-pentenal

*2-metil-2-buten-1,4-dial*



Espectro de massa obtido para o pico nº 2 (FIGURA 3, Capítulo 4).  
2-metil-2-buten-1,4-dial

# *5-metil-2,4-hexadien-1-ol*



Espectro de massa obtido para o pico nº 3 (FIGURA 3, Capítulo 4).  
5-metil-2,4-hexadien-1-ol