

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

**CAROTENÓIDES DE URUCUM: DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO
ANALÍTICO E AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE
EM SISTEMAS-MODELO**

PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por **Alessandro de Oliveira Rios**, aprovada pela Comissão Julgadora em 04 de fevereiro de 2004.

Campinas, 04 de fevereiro de 2004.

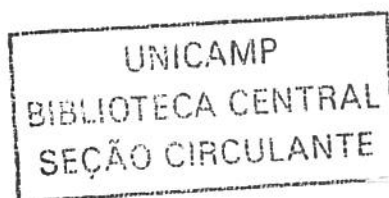
Alessandro de Oliveira Rios
Engenheiro Agrônomo
Mestre em Ciência de Alimentos

Adriana Z. Mercadante
Profa. Dra. Adriana Zerlotti Mercadante
Presidente da Banca

Profa. Dra. Adriana Zerlotti Mercadante
Orientadora

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

2004



UNIDADE	RC
Nº CHAMADA	T/UNICAMP
	R479c
V	EX
TOMBO BCI	57147
PROC.	16/117104
C	☐
D	☒
PREÇO	14,00
DATA	02/03/04
Nº CPD	

CM00195071-1

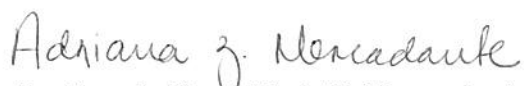
BIB ID 310980

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

R479c Rios, Alessandro de Oliveira
Carotenóides de urucum: desenvolvimento de método analítico e avaliação da estabilidade em sistemas-modelo / Alessandro de Oliveira Rios. – Campinas, SP: [s.n.], 2004.

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

1. Urucum. 2. Metodologia. 3. Carotenóides.
4. Cromatografia líquida de alta eficiência. I. Mercadante, Adriana Zerlotti. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Adriana Zerlotti Mercadante
(Orientadora)

Profa. Dra. Célia Maria de Sylos
(Membro)

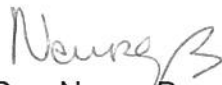
Profa. Dra. Flávia Maria Netto
(Membro)



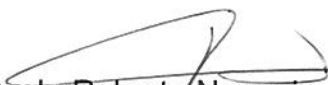
Profa. Dra. Lucia Maria Valente Soares
(Membro)



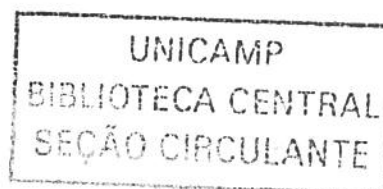
Profa. Dra. Mieko Kimura
(Membro)



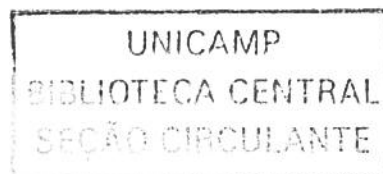
Profa. Dra. Neura Bragagnolo
(Membro)



Dr. Paulo Roberto Nogueira Carvalho
(Membro)



Aos meus pais, Anibal e Ana Maria, por tudo que sou hoje e a minha irmã Polliana pelo carinho e apoio em todos os momentos.



AGRADECIMENTOS

A Deus

À Profa. Dra. Adriana Z. Mercadante pela orientação e por acreditar em meu trabalho.

À CAPES pela bolsa de doutorado.

Aos colegas do Laboratório de Química de Alimentos pelos incentivos, dicas e apoio.

Ao Prof. Dr. Claudio Borsarelli e a Mariana Angelica Montenegro, de Santiago del Estero – Argentina, pela oportunidade de realização de um trabalho em conjunto.

A todos os membros da banca examinadora pelas sugestões.

À Roche Vitamins Ltda (Basel, Suíça) pelos cristais de bixina.

À FAPESP pelo apoio financeiro através de dois projetos de pesquisa.

À Fundação Antorchas pela bolsa para estágio na Argentina.

Aos funcionários do Departamento de Ciência de Alimentos pela ajuda e apoio.

Índice

ÍNDICE DE TABELAS.....	x
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xii
LISTA DE ANEXOS	xvi
RESUMO GERAL	01
SUMMARY	04
INTRODUÇÃO GERAL	06
OBJETIVOS	10

CAPÍTULO 1

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. Planta de urucum	12
2. Composição de carotenóides nas sementes de urucum	13
3. Corante de urucum	18
4. Determinação de corante de urucum em alimentos	25
4.1. Métodos	25
4.2. Teores	30
5. Estabilidade de carotenóides	34
5.1. Degradação térmica	34
5.2. Ação do oxigênio singlete	41
6. Referências	51

CAPÍTULO 2

DETERMINATION OF ADDED ANNATTO COLOUR IN EXTRUDED CORN SNACKS BY A NEW METHOD OF ANALYSIS

Summary	57
Introduction	57
Material and methods	58
Samples	58
Sample digestion	58

Carotenoid extraction	58
Extract saponification	58
Quantification	59
High-performance liquid chromatography (HPLC)	59
UV/visible spectrophotometry	59
Evaluation of the methodology	59
Statistical analysis	60
Results and discussion	60
Sample digestion	60
Optimisation of the carotenoid extraction conditions	60
Optimisation of the conditions for extraction saponification	61
Quantification	62
Method performance	63
Annatto dye contents, expressed as norbixin, in commercial extruded snacks	63
Conclusion	65
References	65

CAPÍTULO 3

APLICAÇÃO DE CLAE PARA ACOMPANHAR A CRISTALIZAÇÃO DE BIXINA E A OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE SUA EXTRAÇÃO E SAPONIFICAÇÃO EM “SNACKS” EXTRUSADOS

Resumo	67
Summary	68
Introdução	69
Material e Métodos	71
1. Materiais	71
2. Isolamento dos padrões	71
2.1. Bixina	71
2.1.1. Extração	71
2.1.2. Cristalização	71

2.2. Norbixina	72
3. Metodologia para análise de corante de urucum em "snacks" extrusados	73
4. Cromatografia líquida de alta eficiência	73
Resultados e Discussão	74
1. Cristalização de bixina	74
2. Padrão de norbixina	79
3. "Snacks" extrusados	81
3.1. Extração	81
3.2. Saponificação do extrato	86
Conclusão	91
Referências	91

CAPÍTULO 4

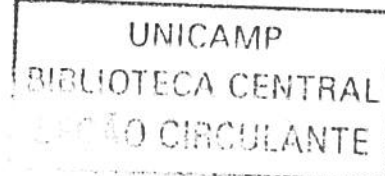
MODEL STUDIES ON THE PHOTSENSITIZED ISOMERIZATION OF BIXIN

Summary	95
Introduction	95
Experimental Procedures	95
Materials	95
Methods	95
Results and Discussion	95
Literature Cited	100

CAPÍTULO 5

DEGRADAÇÃO DE BIXINA POR FOTO-SENSITIZAÇÃO E AQUECIMENTO EM SISTEMAS-MODELO AQUOSO

Introdução	103
Material e Métodos	105
Material	105
Métodos	105
Resultados e Discussão	106



Degradação térmica	106
Alterações por foto-sensitização	113
Barreira energética	116
Referências	118
CONCLUSÃO GERAL	120
ANEXOS	122

Índice de Tabelas

CAPÍTULO 1

Tabela 1. Usos permitidos de urucum e níveis máximos de adição de acordo com resoluções do Ministério da Saúde	21
Tabela 2. Métodos para extração de pigmentos de urucum de formulações comerciais	29
Tabela 3. Teores de bixina e norbixina em várias amostras	30
Tabela 4. Conteúdo de bixina em formulações comerciais de urucum solúvel em óleo	34
Tabela 5. Conteúdo de norbixina em formulações comerciais de urucum solúvel em água	34
Tabela 6. Constantes de velocidade de degradação térmica de carotenóides em diferentes sistemas-modelo líquidos	37
Tabela 7. Constantes de desativação química (k_r), física (k_q) e total (k_t) para carotenóides	44

CAPÍTULO 2

Table 1. Norbixin contents in snacks as determined by HPLC and UV-visible spectrophotometry	63
Table 2. Norbixin contents (mg kg^{-1} sample) in extruded snacks	64

CAPÍTULO 3

Tabela 1. Características espectrais e quantidade (%), obtidas por CLAE, dos compostos presentes na bixina cristalizada e recristalizada	76
Tabela 2. Características espectrais, obtidas por CLAE, do padrão de norbixina .	80
Tabela 3. Condições experimentais e resultados do planejamento fatorial fracionário para etapa de extração	81
Tabela 4. Condições experimentais e resultados do planejamento fatorial completo para etapa de extração	84

Tabela 5. Condições experimentais e resultados do planejamento fatorial fracionário para etapa de saponificação a temperatura ambiente	85
Tabela 6. Condições experimentais e resultados do planejamento fatorial fracionário para etapa de saponificação com aquecimento	87
Tabela 7. Condições experimentais e resultados do planejamento fatorial completo para etapa de saponificação com aquecimento	89

CAPÍTULO 4

Table 1. Retention times t_R , absorption maximum wavelengths λ_{max} , and band ratios $\%III/II$ and $\%A_B/A_{II}$ obtained from HPLC – Photodiode array analysis (PDA) during the photosensitized isomerization of bixin in aerated and non-aerated ACN/MeOH (1:1) solutions	97
Table 2. Observed rate constant k_{obs} and activation parameters $\Delta H^\ddagger$ and $\Delta S^\ddagger$ for the photosensitized isomerization of bixin in ACN/MeOH (1:1) solutions .	97
Table 3. Rate constant values for the deactivation processes indicated in Scheme 2	98

CAPÍTULO 5

Tabela 1. Características, obtidas por CLAE, dos produtos de degradação térmica da bixina	108
Tabela 2. Constantes de reação de degradação (k_{obs}) para bixina durante aquecimento em sistema-modelo de água/etanol (8:2)	111
Tabela 3. Porcentagem de degradação, constante cinética e energia de ativação da bixina durante a foto-sensitização em sistema-modelo de água/etanol (8:2), em atmosfera saturada com ar ou N_2	115

Índice de Figuras

CAPÍTULO 1

Figura 1. Estrutura da bixina e da norbixina	13
Figura 2. Carotenóides encontrados em pequenas quantidades nas sementes de urucum por Mercadante <i>et al.</i> (1996) e Jondiko & Pattenden (1989)	14
Figura 3. Apocarotenóides isolados e identificados por Mercadante <i>et al.</i> (1997a)	16
Figura 4. Diapocarotenóides isolados e identificados por Mercadante <i>et al.</i> (1997b)	17
Figura 5. Diapocarotenóides isolados e identificados por Mercadante <i>et al.</i> (1999)	17
Figura 6. Esquema da degradação térmica de bixina de acordo com Mckeown (1963, 1965)	40
Figura 7. Estruturas dos isômeros de C17	40

CAPÍTULO 2

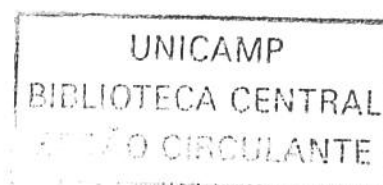
Figure 1. Response surface for the relative area of norbixin as a function of the solvent volume (ml) and extraction time (min)	60
Figure 2. Response surface for the relative area of norbixin as a function of the extraction number and extraction time (min)	61
Figure 3. Response surface for the relative area of norbixin as a function of solvent volume (ml) and extraction number	61
Figure 4. Response surface for the percent of norbixin area in relation to total area as a function of temperature and percent KOH	62
Figure 5. Schematic flow sheet of the method developed and optimised	63
Figure 6. Chromatogram obtained by HPLC of the extract of brand A, cheese-flavoured snack	64
Figure 7. Chromatogram obtained by HPLC of the extract of brand C, onion-flavoured snack	64

CAPÍTULO 3

Figura 1. Estrutura da bixina e da norbixina	69
Figura 2. Cromatogramas, obtidos por CLAE, de cristais de bixina	75
Figura 3. Espectros, obtidos através do DAD em acetonitrila/ácido acético 2% (65:35), dos carotenóides de cristais de bixina	77
Figura 4. Micrografias, obtidas por microscopia eletrônica com aumento de 1.600 vezes, de cristais de bixina	79
Figura 5. Cromatograma, obtido por CLAE, de padrão de norbixina	80
Figura 6. Cromatogramas, obtidos por CLAE, de extrato de carotenóides em “snacks” extrusados extraídos com: a – 50 mL de diclorometano, 6 extrações de 20 min cada, b – 50 mL de acetato de etila, 6 extrações de 10 min cada, c – 25 mL de acetato de etila, 6 extrações de 20 min cada	82
Figura 7. Cromatogramas, obtidos por CLAE, de extrato de carotenóides em “snacks” extrusados extraídos com: a – 25 mL de acetato de etila, 3 extrações de 10 min cada, b – 50 mL de acetato de etila, 3 extrações de 20 min cada	83
Figura 8. Cromatogramas, obtidos por CLAE, de extrato de carotenóides em “snacks” extrusados extraídos com: a – 30 mL de acetato de etila, 6 extrações de 10 min cada, b – 30 mL de acetato de etila, 8 extrações de 10 min cada	85
Figura 9. Cromatogramas, obtidos por CLAE, de extrato de carotenóides em “snacks” extrusados saponificados com: a – 10% de KOH metanólico, por 24 horas à temperatura ambiente, b – 10% de KOH metanólico, por 20 min a 50°C, c – 20% de KOH metanólico, por 24 horas à temperatura ambiente, d – 20% de KOH metanólico, por 20 min a 50°C	88
Figura 10. Cromatogramas, obtidos por CLAE, de extrato de carotenóides em “snacks” extrusados saponificados com: a – 30% de KOH metanólico, por 20 min a 50°C, b – 30% de KOH metanólico, por 20 min a 70°C, c – 55% de KOH metanólico, por 20 min a 50°C	90

CAPÍTULO 4

- Scheme 1. Chemical structure of the natural *cis*-carotenoid bixin 95
- Figure 1. HPLC chromatograms obtained with the C₁₈-Vydac 218TP54 column and monitored at 450 nm (left) and UV-vis spectra (right) of 8 μ M bixin in air-saturated ACN/MeOH (1:1) solutions at 20°C in the presence of 10 μ M Rose bengal after different times of illumination of the sensitizer: (a) 0 min; (b) 2 min; (c) 10 min; (d) 150 min 96
- Figure 2. Normalized UV-vis spectra obtained from HPLC-PDA analysis of the photosensitized degradation products of bixin in ACN/MeOH (1:1) solutions. The dotted spectra correspond to the bixin spectrum 97
- Figure 3. Kinetic curves obtained from the HPLC peak analysis of 8 μ M bixin in air-saturated ACN/MeOH (1:1) solutions in the presence of 10 μ M Rose bengal: (●) Bixin; (○) all-*trans*-bixin; and (■) isomer 3 97
- Figure 4. Transient absorption spectra of 10 μ M methylene blue (MB) in the presence of 9 μ M bixin in N₂ saturated ACN/MeOH (1:1) solutions observed at different times after the 532 nm laser pulse: (●) 1 μ s, (○) 4 μ s, (■) 8 μ s, and (□) 40 μ s; Insets: a) Decay traces at 420 nm and 520 nm, with the exponential and bi-exponential fittings (solid lines). b) Dependence of the observed decay constant k_d^x for ³MB* (●) and ³Bix* (○) the with the bixin concentration, eq. 9 98
- Figure 5. Effect of the bixin concentration on the phosphorescence decay of singlet molecular oxygen O₂(¹ Δ_g). Inset: Dependence of the observed decay constant k_d^A with the bixin concentration, eq. 10 99
- Scheme 2. Reaction mechanism proposed for the photosensitized isomerization of bixin in both non-aerated and aerated solutions99



CAPÍTULO 5

Figura 1. Estruturas da bixina e norbixina	103
Figura 2. Estruturas dos compostos de degradação	104
Figura 3. Cromatogramas do monitoramento da degradação térmica de bixina em sistema-modelo de água/etanol (8:2) em diferentes tempos de aquecimento: a) 70°C, b) 98°C e c) 125°C	107
Figura 4: Espectros no UV-visível normalizados, obtidos por CLAE-DAD, de bixina e dos produtos de degradação térmica em sistema-modelo de água/etanol (8:2)	108
Figura 5. Gráfico da cinética de primeira ordem de degradação térmica de bixina em sistema-modelo de água/etanol (8:2)	110
Figura 6. Gráfico de Arrhenius para degradação térmica e foto-sensitizada de bixina	112
Figura 7. Cromatogramas do monitoramento da foto-sensitização de bixina a 20°C em sistema-modelo de água/etanol (8:2) em diferentes tempos de reação	113
Figura 8. Gráfico da cinética de primeira ordem de degradação de bixina durante foto-sensitização em sistema-modelo de água/etanol (8:2)	114
Figura 9. Diagrama dos níveis de energia para isomerização e degradação de bixina	116

Lista de Anexos

Anexo 1. Efeito dos fatores no planejamento fatorial fracionário para etapa de extração	122
Anexo 2. Efeito dos fatores no planejamento fatorial completo para etapa de extração	122
Anexo 3. ANOVA do planejamento fatorial completo para etapa de extração	122
Anexo 4. Efeito dos fatores do planejamento fatorial fracionário para etapa de saponificação a temperatura ambiente	123
Anexo 5. Efeito dos fatores do planejamento fatorial fracionário para etapa de saponificação com aquecimento	123
Anexo 6. Efeito dos fatores do planejamento fatorial completo para etapa de saponificação com aquecimento	123
Anexo 7. ANOVA do planejamento fatorial completo para etapa de saponificação com aquecimento	124
Anexo 8. Gráfico da otimização da etapa de saponificação com aquecimento	124
Anexo 9. Curva padrão, obtida por espectrofotômetro, de norbixina	125
Anexo 10. Curva padrão, obtida por CLAE, de norbixina	125

RESUMO GERAL

A agradável e atrativa cor que os carotenóides conferem aos alimentos é um fator decisivo na preferência dos consumidores. Entretanto, como a maioria dos corantes naturais, os carotenóides são facilmente degradados com conseqüente diminuição ou perda do poder corante e/ou das funções biológicas. O uso de corantes contendo bixina e norbixina favorece a indústria nacional, uma vez que o Brasil é um dos maiores produtores mundiais de sementes de urucum.

Na primeira etapa deste trabalho, foi desenvolvida uma metodologia analítica para determinação de corante de urucum em “snacks” extrusados. Foi necessário um pré-tratamento da amostra através de digestão prévia de 5 g da amostra triturada em 200 µl de α -amilase por 2 horas à temperatura ambiente. O pigmento foi extraído com 30 mL de acetato de etila sob agitação a 150 rpm à temperatura ambiente, durante 10 minutos, sendo necessário 8 extrações para completa liberação do pigmento. Com o objetivo de eliminar lipídeos, o extrato foi saponificado com 35 mL de KOH 35% em metanol, em banho-maria a 50°C sob agitação suave por 20 minutos. Nestas condições, houve 100% de conversão de bixina em norbixina que foi quantificada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). O método desenvolvido apresentou recuperação média de 97% e valores de coeficiente de variação de 1% entre as duplicatas.

Utilizando este método, foram analisadas 13 amostras comerciais de “snacks” extrusados, sendo 4 sabores da marca A, 7 da marca B e 2 da marca C. Dentre todas as amostras, o sabor queijo parmesão da marca A apresentou o teor mais elevado de corante (15,5 mg/kg), enquanto que no sabor cebola das marcas B e C foi encontrado os menores níveis (0,7 e 0,4 mg/kg respectivamente). Não houve diferença significativa nos teores de norbixina entre os lotes de todos os sabores da marca A. Este fato indicou uma padronização por parte da indústria, oferecendo ao consumidor produtos com um aspecto visual uniforme. Das 7 amostras analisadas da marca B, somente os sabores queijo cheddar e provolone não apresentaram diferença significativa entre os lotes. Os resultados indicaram que a indústria responsável pela marca C não possuía padronização quanto à quantidade de corante adicionada, uma vez que houve

diferença significativa entre os lotes de todos os sabores analisados. As quantidades encontradas em todas as amostras analisadas estavam abaixo do limite máximo permitido pela legislação brasileira para alimentos à base de cereais (25 mg/kg).

Para a quantificação por CLAE ou para o estudo em sistemas-modelo, é necessário o uso de padrões que muitas vezes não estão disponíveis comercialmente ou possuem alto custo. Assim, foi acompanhado por CLAE em fase reversa com detector de arranjo de diodos, o isolamento de padrão de bixina e de norbixina com alto teor de pureza. Cristais de bixina com 98% de pureza foram obtidos através de cristalizações sucessivas e norbixina foi purificada por cromatografia em coluna de sílica-gel obtendo 93% de pureza.

A estabilidade foto-oxidativa da bixina foi avaliada em metanol/acetonitrila (1:1). A reação com rosa de bengala ou azul de metileno como sensibilizador foi estudada por espectrofotometria no UV-visível, CLAE, técnicas de fotólise "laser-flash" e detecção de oxigênio singlete por fosforescência. Entre 4 isômeros formados, o principal produto foi o *all-trans*-bixina em atmosfera saturada com ar ou nitrogênio. A degradação da bixina seguiu uma cinética de primeira ordem irreversível, com constante de velocidade (k_{obs}) similar à da formação de isômeros. A k_{obs} decresceu com o aumento da concentração de bixina na presença de ar. Os parâmetros de energia de ativação foram similares nas soluções saturadas com ar ou N_2 . Todos os resultados indicam o mecanismo no qual o estado triplete da bixina foi produzido sob dois diferentes caminhos de transferência de energia: i) bixina desativando o estado triplete excitado do sensibilizador ($^3S^*$) em soluções saturadas com N_2 , e ii) desativação seqüencial do oxigênio singlete pela bixina e posterior desativação do $^3S^*$ por oxigênio triplete em condições de ar saturado.

Foi avaliada também a degradação de bixina por foto-sensitização e por aquecimento em água/etanol (8:2). Verificou-se a formação de vários produtos de degradação da bixina à temperatura de 125°C, contudo em temperaturas mais baixas, os mesmos produtos foram formados somente após 24 horas de aquecimento. A isomerização da bixina foi a reação preferencial durante a foto-sensitização e aquecimento a temperaturas menores que 100°C. Em todos os sistemas e temperaturas estudadas, a degradação da bixina seguiu uma cinética de primeira ordem. A energia de ativação (E_a) em temperatura acima de 86°C foi de 6,2 kcal/mol,

similar ao valor observado no sistema de foto-sensitização (7,0 kcal/mol). Para temperatura menor que o ponto de ebulição do sistema, a E_a calculada foi de 41 kcal/mol.

SUMMARY

The attractive color that carotenoids provide to foods is a decisive choice factor for the consumers' preference. However, as the majority of natural dyes, carotenoids are easily degraded, and consequently suffer decrease in color and/or beneficial biological functions are expected. The use of colorants containing bixin and norbixin benefits the national industry, since Brazil is one of the largest worldwide producers of annatto seeds.

An analytical method to analyse annatto in extruded snacks was developed. A pretreatment of the samples was necessary, digesting 5 g ground sample with 200 μ l α -amylase for 2 h at room temperature. The pigment was extracted by shaking with 30 ml ethyl acetate at 150 rpm at room temperature for 10 min, 8 extractions being necessary for completion extract the pigment. With the objective of eliminating the lipids, the extract was saponified with 35 ml 35% KOH in methanol, with mild shaking at 50°C for 20 min. Under these conditions, 100% of the bixin was converted into norbixin, which was quantified by high-performance liquid chromatography (HPLC). The method had a mean recovery of 97% and a coefficient of variation for duplicates analysis of 1%.

Using this method, 13 commercial samples of extruded snacks were analysed, being 4 flavours from brand A, 7 from brand B and 2 from brand C. Among all the samples, the brand A parmesan cheese flavoured snack showed the highest level of dye expressed as norbixin (15.5 mg/kg), whilst the onion flavored snacks from brands B and C presented the lowest levels (0.7 and 0.4 mg/kg, respectively). For brand A there was no significant difference between the batches of all the flavours analysed. This fact indicates standardisation on the part of the industry, offering products to the consumer with a uniform visual aspect. Among the 7 flavours of brand B, only the cheddar and provolone cheese flavoured batches did not present significant difference. The results indicated that the industry responsible for brand C had standardised poorly the amount of dye added, since there was a significant difference between the batches of all the flavours analysed. The amounts found in all the samples analysed were all below the maximum limits permitted by the Brazilian legislation for cereal-based foods (25 mg/kg).

The use of high purity standards are required for quantification by HPLC or for model-systems studies, however standards are costly and not always commercially available. Thus, reversed-phase HPLC with diode array detector was used to monitor the isolation of high purity bixin and norbixin standards. Bixin crystals, 98% purity, were obtained through successive crystallizations and norbixin was purified by column chromatography on silica-gel reaching a purity of 93%.

The photo-sensitized stability of bixin was studied in methanol/acetonitrile (1:1). The reaction with rose bengal or methylene blue as sensitizer was studied by UV-visible spectrophotometry, HPLC, laser-flash photolysis and time-resolved phosphorescence detection of singlet oxygen. Among the 4 isomers formed, the main product was all-*trans*-bixin in air and nitrogen saturated atmosphere. The disappearance of bixin followed an irreversible first-order kinetic law, with a similar observed rate constant (k_{obs}) to those for the formation of isomers. The k_{obs} decreased with an increase of bixin concentration in the presence of air. The activation parameters were similar in both N_2 - and air-saturated solutions, suggesting that the same degradation mechanism operated under both conditions. All the results support the mechanism in which the excited triplet state of bixin is produced under two different energy-transfer pathways: i) bixin quenching of the sensitizer in the excited triplet state ($^3\text{S}^*$) in N_2 -saturated solutions, and ii) by sequential quenching of singlet oxygen by bixin, after deactivation of $^3\text{S}^*$ by triplet oxygen in air-saturated conditions.

The thermal and photo-sensitized degradation of bixin was also evaluated in water/ethanol (8:2). Many degradation products were formed at 125°C, however the same compounds were only observed after 24 h of heating at lower temperatures. The isomerization of bixin was the preferential reaction during photosensitization and heating at temperatures lower than 100°C. In all systems and temperatures evaluated, the bixin degradation followed a first-order kinetic reaction. The activation energy (E_a) at temperature higher than 86°C was 6.2 kcal/mol, similar to the value observed in the photosensitized system (7.0 kcal/mol). At temperature lower than the system boiling, the calculated E_a was 41 kcal/mol.

INTRODUÇÃO GERAL

O impacto visual causado pela cor é um dos atributos mais importantes na comercialização de alimentos e influencia a aceitação e preferência de determinado produto pelo consumidor.

Os carotenóides são uma classe de compostos que apresentam poder corante e estes pigmentos têm sido largamente utilizados nas indústrias de alimentos que vêm buscando substituir os corantes sintéticos por naturais. Aliado ao fato de que existe uma exigência e preferência do consumidor por compostos naturais, há uma tendência mundial quanto ao aumento da utilização de produtos elaborados com ingredientes naturais.

Os carotenóides não são apenas outro grupo de pigmentos naturais, pois apresentam propriedades funcionais que formam a base de diversas funções e ações em organismos vivos. Alguns carotenóides apresentam importante função nutricional na dieta de humanos como precursores de vitamina A, além de outras ações benéficas como proteção contra certos tipos de câncer, doenças cardiovasculares, cataratas, degeneração macular e fortalecimento do sistema imunológico (Krinsky, 1994).

Assim, nos últimos anos, grande atenção tem sido dirigida aos experimentos que associam os carotenóides com suas funções biológicas em seres humanos. Esses pigmentos podem ainda ser importantes na proteção de células atuando como antioxidantes contra radicais livres e seqüestrando oxigênio singlete devido ao seu longo sistema de duplas ligações conjugadas (Bendich & Olson, 1989; Tinkler *et al.*, 1994; Edge *et al.*, 1997).

Porém, o sistema de ligações duplas conjugadas presente na estrutura dos carotenóides, o cromóforo capaz de absorver luz na região visível, é também responsável pela sua suscetibilidade à isomerização e oxidação, levando à perda de cor e da atividade biológica. Assim, a utilização dos carotenóides como corantes naturais para alimentos depara com a sensibilidade que estes compostos apresentam a condições de processamento e estocagem, tais como disponibilidade ao oxigênio, exposição à luz, temperatura, presença de metais e de sensibilizadores, atividade de água e pH (Rodriguez-Amaya, 1999).

Em anos recentes, o cultivo de urucum apresentou grande impulso, em função da demanda de corantes naturais, tanto no mercado nacional como no internacional e o Brasil é um dos maiores produtores e exportadores de suas sementes. Em 1999, a produção nacional foi estimada em 7.000 toneladas de sementes por ano, representando cerca de 40% da produção mundial (Carvalho, 1999).

Nos anos 70, a ingestão diária aceitável (IDA) para o extrato de urucum era de 1,25 mg/kg de peso corpóreo (FAO/WHO, 1970, 1976), entretanto a IDA foi diminuída para 0,065 mg/kg de peso corpóreo em 1982 (FAO/WHO, 1982). Deste modo, a aplicação de extratos de urucum em alimentos tem sofrido severas restrições no que se refere à gama de produtos a que pode ser adicionado bem como quanto à quantidade permitida. Uma das alegações para a redução da IDA é que na época pouco se conhecia sobre a composição e efeitos destes extratos.

O controle da quantidade de pigmentos presentes nos alimentos se faz necessário, uma vez que, estas informações são importantes tanto para o consumidor quanto para os setores envolvidos na segurança de alimentos no sentido de possibilitar uma revisão sobre as restrições impostas.

Existem vários trabalhos na literatura que avaliaram a estabilidade de β -caroteno, licopeno e luteína em alimentos e sistemas-modelo (Pesek & Warthesen, 1988; DiMascio *et al.*, 1992; Sharma & Maguer, 1996; Henry *et al.*, 1998;), porém poucos estudaram os carotenóides de urucum.

Além disso, muitos dos estudos sobre degradação de bixina foram realizados pela leitura em espectrofotômetro do extrato total no comprimento de onda máximo (Najar *et al.*, 1988; Carvalho *et al.*, 1993; Pimentel & Stringheta, 1999). Apesar dos carotenóides totais de urucum poderem ser determinados por espectrofotometria (Davies, 1976; Britton, 1995), os isômeros apresentam comprimento de onda de absorção muito próximo ao do carotenóide original tornando-se praticamente impossível acompanhar sua formação e de outros compostos através da simples leitura do extrato total. O método que utiliza CLAE é mais indicado para separar os produtos de isomerização e degradação de carotenóides (Scotter *et al.*, 1994; Lancaster & Lawrence, 1995).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BENDICH, A.; OLSON, J. A. Biological actions of carotenoids. **FASEB Journal**, 3: 1927-1932, 1989.
- BRITTON, G. **UV/visible Spectroscopy**. In: "Carotenoids, Vol 1B: Spectroscopy". G. Britton, S. Liaaen-Jensen and H. Pfander (Eds). Birkhauser, Basel. 1995. p. 13-62.
- CARVALHO, P. R. N. Urucum – avanços tecnológicos e perspectivas. **Arch. Latinoam. Nutr.**, 49: 71S-73S, 1999.
- CARVALHO, P. R. N.; SARANTOPOULOS, C. I. G. L.; SHIROSE, I.; SILVA, M. G. da. Estudo de vida-de-prateleira do corante (bixina) extraído do urucum (*Bixa orellana*, L.). **Coletânea do ITAL** 23: 98-104, 1993.
- DAVIES, B.H. Carotenoids. In: "Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments". T.W. Goodwin (Ed.), vol 2. Academic Press, London. 1976. p. 38-165.
- DIMASCIO, P; SUNDQUIST, A. R.; DEVASAGAYAM, T.P.A.; SIES, H. Assay of lycopene and other carotenoids as singlet oxygen quenchers. **Methods in Enzymology**, 213: 429-438, 1992.
- EDGE, R.; MCGARVEY, D.J.; TRUSCOTT, T. G. The carotenoids as anti-oxidants – a review. **J. Photochem. Photobiol. B: Biol.**, 41: 189-200, 1997.
- FAO/WHO. 1970. Food Additive Series 70. 36. Geneva.
- FAO/WHO. 1976. Food Additives Serie 7. Geneva, 11 p.
- FAO/WHO. 1982. Food and Nutrition Paper 25. Rome. p. 22.
- HENRY, L.K.; CATIGNANI, G. L.; SCHWARTZ, S. J. Oxidative degradation kinetics of lycopene, lutein and 9-*cis* and all-*trans* β -carotene. **J. Amer. Oil Chem. Soc.**, 75: 823-829, 1998.
- KRINSKY, N. I. The biological properties of carotenoids. **Pure Appl. Chem.**, 66: 1003-1010, 1994.
- LANCASTER, F. E.; LAWRENCE, J. F. Determination of annatto in high-fat dairy products, margarine and hard candy by solvent extraction followed by high-performance liquid chromatography. **Food Addit. Contam.**, 12: 9-19, 1995.
- NAJAR, S. V.; BOBBIO, F. O.; BOBBIO, P. A. Effects of light, air, anti-oxidants and pro-oxidants annatto extracts (*Bixa orellana*). **Food Chem.**, 29: 283-289, 1988.

-
- PESEK, C. A.; WARTHESEN, J.J. Characterization of the photodegradation of b-carotene in aqueous model systems. **J. Food Sci.**, 53:1517-1520, 1988.
- PIMENTEL, F. A.; STRINGHETA, P. C. Influência da luz e do oxigênio sobre a estabilidade do norbixinato de potássio em presença de maltodextrina. **Rev. Bras. Cor. Nat.**, 3: 21-26, 1999.
- RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. A guide to carotenoid analysis in foods. Some physicochemical properties of carotenoids, 14-22, 1999.
- SCOTTER, M. J.; THORPE, S. A.; REYNOLDS, S. L.; WILSON, L. A.; STRUTT, P. R. Characterization of the principal colouring components of annatto using high performance liquid chromatography with photodiode-array detection. **Food Addit. Contam.**, 11: 301-315, 1994.
- SHARMA, S. K.; MAGUER, M. L. Kinetics of lycopene degradation in tomato pulp solids under different processing and storage conditions. **Food Res. Inter.**, 29: 309-315, 1996.
- TINKLER, J. H.; BÖHM, F.; SCHALCH, W.; TRUSCOTT, T.G. Dietary carotenoids protect human cells from damage. **J. Photochem. Photobiol. B: Biol.**, 26: 283-285, 1994.

OBJETIVOS

Devido ao fato de que, dentre os corantes naturais, o urucum é o mais utilizado pela indústria brasileira, com aplicações nos mais diversos tipos de alimentos, os objetivos deste trabalho foram:

1. Desenvolver um método analítico para extração e quantificação do corante de urucum em “snacks” extrusados à base de farinha de milho.
2. Acompanhar por CLAE o isolamento de bixina e norbixina com alto teor de pureza e a influência das diferentes condições na extração de bixina e sua conversão em norbixina durante a saponificação.
3. Aplicar o método desenvolvido na análise de várias amostras comerciais de “snacks” extrusados disponíveis no comércio local de Campinas – SP.
4. Avaliar a degradação térmica e foto-sensitizada da bixina em sistemas-modelo, separando por CLAE os isômeros e compostos de degradação formados.
5. Estudar os parâmetros cinéticos da degradação da bixina e dos principais produtos de isomerização e de degradação formados.
6. Propor mecanismos para a degradação térmica e a foto-sensitizada da bixina.

CAPÍTULO 1

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. Planta de urucum

O urucueiro é originário da América Tropical, pertence à família Bixaceae e responde pelo nome botânico de *Bixa orellana* L. (Gouveia *et al.*, 2000). Dependendo da região de cultivo e da idade da planta, apresenta-se como um arbusto perene grande ou como uma árvore pequena, variando de 2 a 5 metros de altura. A planta exibe grande variabilidade de coloração, com caule, frutos verdes e flores brancas ou caule vermelho, flores rosas e frutos vermelhos-escuros (Ingram & Francis, 1969).

Os frutos de urucum consistem de uma cápsula ou cachopa, coberta de espinhos flexíveis. As cachopas variam em tamanho e aparência, podendo ser arredondas ou alongadas com extremos pontudos. No interior estão normalmente divididas em duas valvas com 10 a 50 sementes. As sementes, das quais obtem-se o corante natural, estão cobertas por uma fina camada resinosa com tonalidades que vão desde o amarelo brilhante até o amarelo-vermelho (Ingram & Francis, 1969; Preston & Rickard, 1980).

A planta de urucum é cultivada em muitos países tropicais na América Central e do Sul, África e Ásia (Mercadante & Pfander, 1998) e os principais exportadores de sementes são Peru, Brasil e Kenia (Stiles, 1991).

No Brasil, o cultivo de urucum apresentou nos últimos anos grande impulso, em função da demanda de corantes naturais, tanto no mercado nacional como no internacional (Rebouças *et al.*, 2000). É cultivado em maior frequência nos Estados do Pará, Amazonas, Paraíba, Bahia, Ceará e Maranhão (Embrapa, 2001).

A produção nacional é estimada em 7.000 toneladas de sementes por ano, representando cerca de 40% da produção mundial. Os principais importadores de sementes de urucum do Brasil são os Estados Unidos, Inglaterra, França e Japão (Carvalho, 1999).

Nos últimos anos, resultados importantes foram obtidos a partir dos trabalhos desenvolvidos sobre melhoramento das sementes de urucum, visando não só a produtividade, mas principalmente o aumento do teor dos pigmentos.

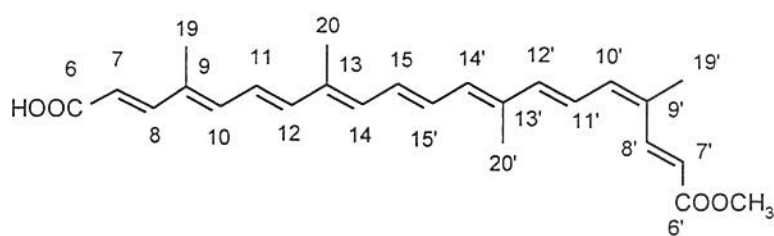
O teor de bixina aumentou de uma média inferior a 2% para valores superiores a 2,5%. A produtividade média gira em torno de 1.500 kg/ha a partir do 5º ano de produção (Carvalho, 1999). São José *et al.* (2000) estudaram algumas características

de urucueiros do Banco Ativo de Germoplasma da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia e os teores de bixina nas sementes variaram de 0,61 a 4,44%.

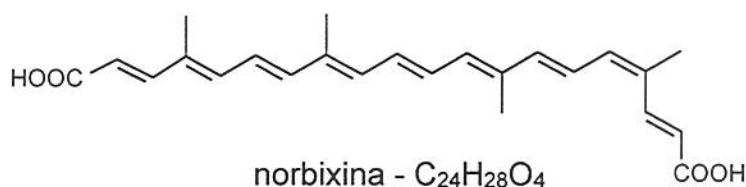
No Brasil, a cultura do urucum ainda não dispõe de variedades, mas a denominação de cultivares. Os principais tipos cultivados de interesse para as principais regiões produtoras são: Peruana Paulista (São Paulo), Bico de Pato (Bahia), Piave Vermelha (Pará), Piave Vermelha Grande, Bico de Calango, Verde Amarela, entre outros cultivados nas demais regiões do país (Rebouças & São José, 1996).

2. Composição de carotenóides nas sementes

Os principais pigmentos presentes nas sementes de urucum pertencem à classe dos carotenóides. A bixina (metil hidrogênio 9'-*cis*-6,6'-diapocaroteno-6,6'-dioato) (Figura 1), um diapocarotenóide ($C_{25}H_{30}O_4$) com configuração *cis* (Barber *et al.*, 1961; Kelly *et al.*, 1996) e solúvel em solventes orgânicos é o pigmento predominante nas sementes. Diferentemente do β -caroteno que está amplamente distribuído em vegetais e frutas, a bixina foi somente encontrada em urucum constituindo mais de 80% dos carotenóides totais presentes nas suas sementes (Preston & Rickard, 1980).



bixina - $C_{25}H_{30}O_4$



norbixina - $C_{24}H_{28}O_4$

Figura 1. Estrutura da bixina e da norbixina.

A norbixina (6,6'-diapocaroteno-6,6'-ácido dióico) (Figura 1) é encontrada em pequena quantidade nas sementes. Este pigmento também é um diapocarotenóide com configuração *cis* (C₂₄H₂₈O₄) (Kelly *et al.*, 1996), porém solúvel em solventes polares (Preston & Rickard, 1980).

Outros carotenóides presentes em pequenas quantidades nas sementes foram isolados e completamente identificados recentemente. Mercadante *et al.* (1996) isolaram por cromatografia em coluna e camada delgada e identificaram através dos espectros no UV-visível, de massas e de ressonância magnética nuclear (RMN) de ¹H um novo pigmento, o metil 9'-*cis*-apo-6'-licopenoato (C₃₃H₄₄O₂) (Figura 2). A presença de fitoeno, fitoflueno, ζ-caroteno e neurosporeno nas sementes de urucum também foi confirmada através dos espectros de massas (Mercadante *et al.*, 1996).

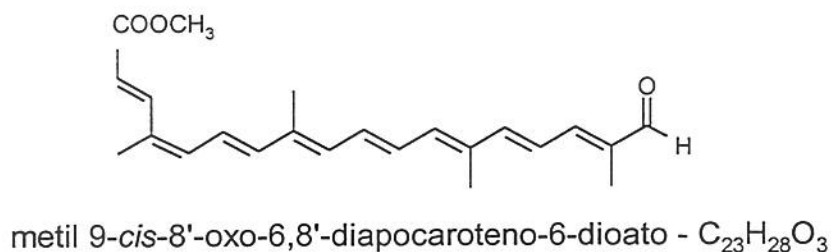
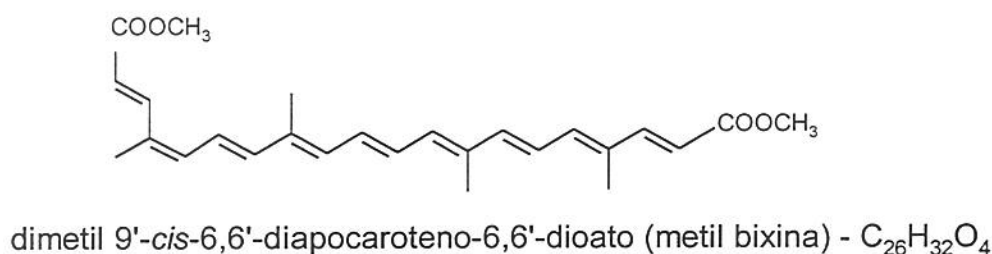
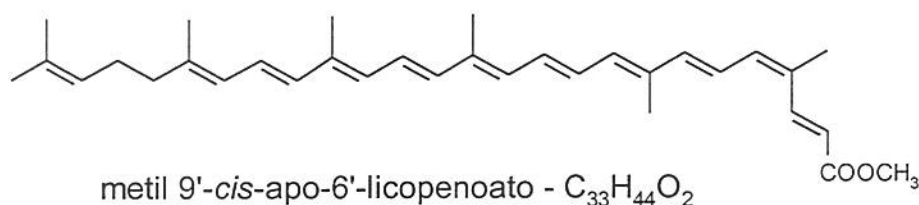


Figura 2. Carotenóides encontrados em pequenas quantidades nas sementes de urucum por Mercadante *et al.* (1996) e Jondiko & Pattenden (1989).

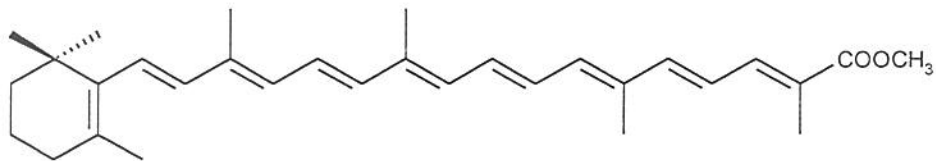
Metil bixina (dimetil 9'-*cis*-6,6'-diapocaroteno-6,6'-dioato - $C_{26}H_{32}O_4$) e um novo apocarotenóide, metil 9-*cis*-8'-oxo-6,8'-diapocaroteno-6-dioato ($C_{23}H_{28}O_3$) (Figura 2) foram isolados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e as estruturas identificadas através dos espectros no UV-visível, de massas e RMN de 1H por Jondiko & Pattenden (1989). Estes autores também identificaram a presença de terpenóides como *all-trans*-geranilgeraniol, farnesil acetona, geranilgeranil octadecanoato e geranilgeranil formato e também de δ -tocotrienol.

Mercadante *et al.* (1997a e b, 1999) isolaram carotenóides de sementes de urucum por cromatografia em coluna, camada delgada e CLAE semi-preparativa. Foram identificados 13 carotenóides através dos espectros no UV-visível, de massas e RMN de 1H e ^{13}C . Deste número, dez compostos não haviam sido descritos anteriormente na literatura (Straub, 1987; Kull & Pfander, 1995).

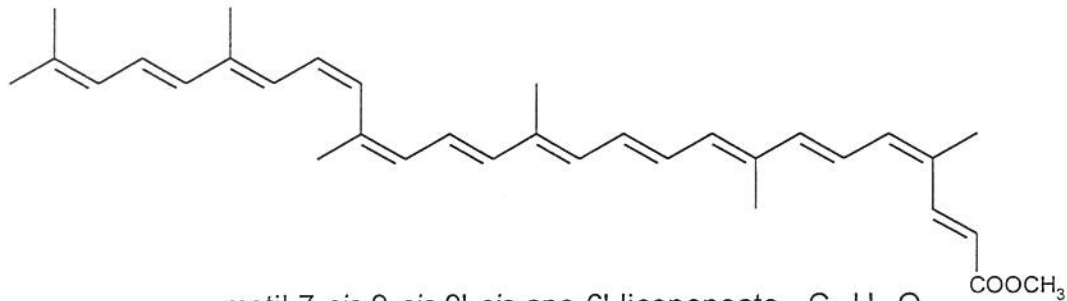
No trabalho de Mercadante *et al.* (1997a) foram identificados 5 novos apocarotenóides (Figura 3). O apocarotenóide metil 8'-apo- β -caroteno-8'-oato ($C_{31}H_{42}O_2$) apresenta em sua estrutura um anel β -ionona conjugado com 8 duplas ligações carbono-carbono da cadeia poliênica e um grupo éster metílico. Os demais apocarotenóides apresentam o mesmo grupo éster encontrado na bixina, sendo que metil 7-*cis*,9-*cis*,9'-*cis*-apo-6'-licopenoato ($C_{33}H_{44}O_2$) é um isômero com 3 ligações na forma *cis*, metil 9-*cis*-apo-8'-licopenoato ($C_{31}H_{42}O_2$) possui 1 ligação *cis* na posição 9 e os compostos metil apo-8'-licopenoato ($C_{31}H_{42}O_2$) e metil apo-6'-licopenoato ($C_{33}H_{44}O_2$) são isômeros *all-trans*.

Mercadante *et al.* (1997b) relataram em seu trabalho 2 novos diapocarotenóides (Figura 4), dimetil 9-*cis*,9'-*cis*-6,6'-diapocaroteno-6-6'-dioato ($C_{26}H_{32}O_4$) e metil 9-*cis*-10'-oxo-6,10'-diapocaroteno-6-oato ($C_{20}H_{24}O_3$), que apresentam um dos grupos terminais idêntico ao da bixina. Os compostos dimetil 9-*cis*-6,6'-diapocaroteno-6,6'-dioato) e metil 9-*cis*-8'-oxo-6,8'-diapocaroteno-6-dioato (Figura 2) também foram isolados porém já haviam sido descritos por Jondiko & Pattenden (1989).

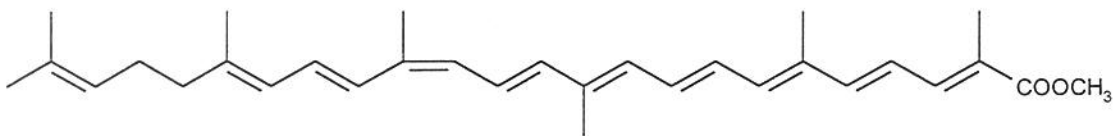
Três novos diapocarotenóides esterificados com geranilgeraniol foram identificados e isolados no estudo conduzido por Mercadante *et al.* (1999) (Figura 5). O composto 6-geranilgeranil 8'-metil-6,8'-diapocaroteno-6-8'-dioato ($C_{43}H_{60}O_4$) é um



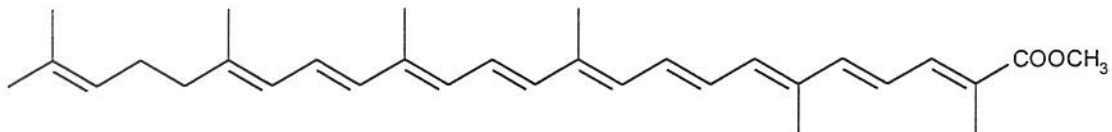
metil 8'-apo- β -caroteno-8'-oato - $C_{31}H_{42}O_2$



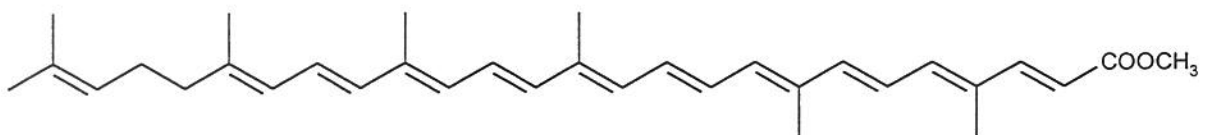
metil 7-*cis*,9-*cis*,9'-*cis*-apo-6'-licopenoato - $C_{33}H_{44}O_2$



metil 9-*cis*-apo-8'-licopenoato - $C_{31}H_{42}O_2$

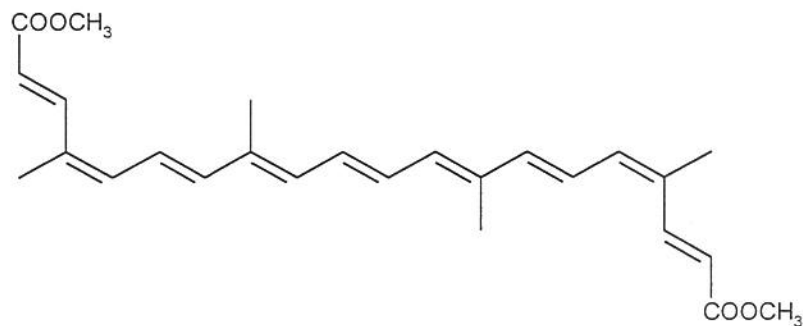


metil apo-8'-licopenoato - $C_{31}H_{42}O_2$

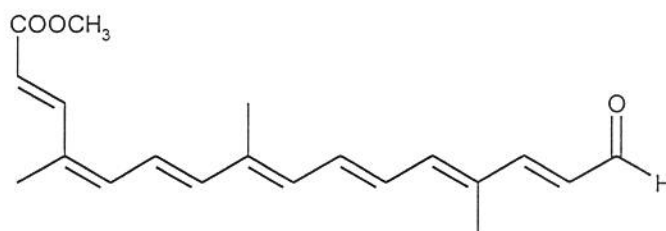


metil apo-6'-licopenoato - $C_{33}H_{44}O_2$

Figura 3. Apocarotenóides isolados e identificados por Mercadante *et al.* (1997a).

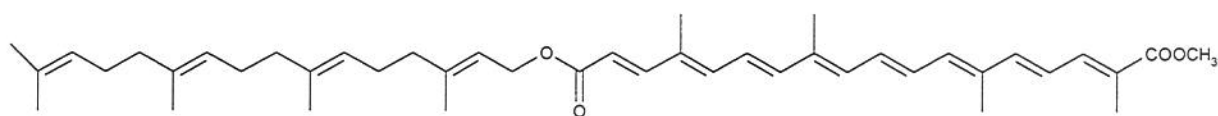


dimetil 9-*cis*,9'-*cis*-6,6'-diapocaroteno-6,6'-dioato - $C_{26}H_{32}O_4$

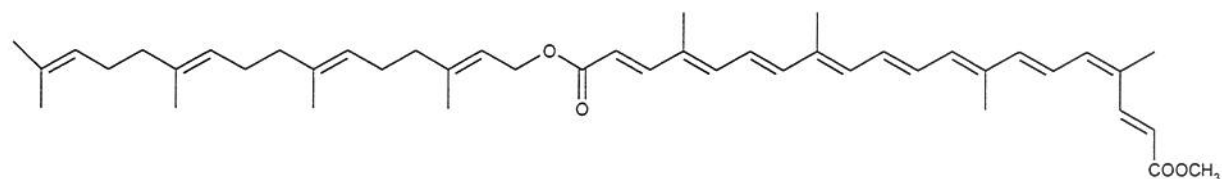


metil 9-*cis*-10'-oxo-6,10'-diapocaroteno-6-oato - $C_{20}H_{24}O_3$

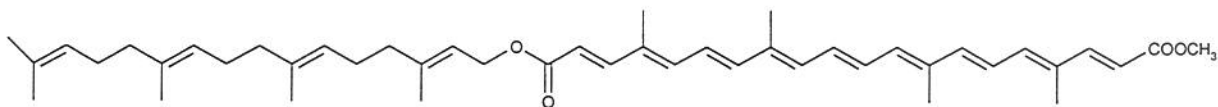
Figura 4. Diapocarotenóides isolados e identificados por Mercadante *et al.* (1997b).



6 geranylgeranyl 8' metil 6,8'-diapocaroteno-6,8'-dioato - $C_{43}H_{60}O_4$



6 geranylgeranyl 6' metil 9-*cis*-6,6'-diapocaroteno-6,6'-dioato - $C_{45}H_{62}O_4$



6 geranylgeranyl 6' metil-6,6'-diapocaroteno-6,6'-dioato - $C_{45}H_{62}O_4$

Figura 5. Diapocarotenóides isolados e identificados por Mercadante *et al.* (1999).

diapocarotenóide com 8 duplas ligações conjugadas carbono-carbono na cadeia poliênica. Dois desses compostos apresentam o mesmo número de ligações duplas conjugadas na cadeia poliênica que a bixina. Os três diapocarotenóides contêm em uma das extremidades o grupo éster metílico presente na bixina. Na outra extremidade estão esterificados com geranilgeraniol, que na forma de difosfato é um intermediário na biossíntese de compostos isoprenóides, incluindo carotenóides. O geranilgeraniol na sua forma livre já havia sido isolado e identificado em sementes de urucum por Jondiko & Pattenden (1989) conforme descrito acima. Este é o único relato de carotenóide esterificado com geranilgeraniol.

3. Corante de urucum

A cor é o principal fator que influencia a aceitação e preferência de um produto, fazendo desse atributo um dos mais importantes na comercialização de alimentos.

Dentre os corantes naturais, o urucum é o mais usado na indústria brasileira. Representa cerca de 90% dos corantes naturais usados no Brasil e 70% do mundo (Ghiraldini, 1989).

Do total de semente de urucum comercializada nacionalmente, cerca de 15% é usada na fabricação de corantes de uso industrial, na forma de preparações lipossolúveis e hidrossolúveis. Do restante das sementes, 60%, é empregado na fabricação do colorífico, totalmente consumido no mercado interno para o uso doméstico, e 25% para exportação de sementes *in natura* (Carvalho, 1999).

Três principais processos comerciais são utilizados para extração do pigmento das sementes de urucum: extração direta em óleo vegetal, extração direta em álcali aquoso e extração indireta com solventes (Preston & Rickard, 1980).

Para extração dos pigmentos com óleo vegetal, usualmente são utilizadas altas temperaturas (cerca de 125°C), na extração com álcali a temperatura não excede 70°C e na extração com solventes não é utilizado aquecimento (McKeown, 1963; Preston & Rickard, 1980).

O colorífico é o produto resultante da mistura de urucum em pó ou extrato oleoso de urucum com farinha de milho ou de mandioca, óleo vegetal e sal, sendo utilizado como condimento e corante na culinária doméstica (Carvalho, 1999).

A bixina é o pigmento predominante nas sementes, nas preparações comerciais lipossolúveis de urucum e em colorífico. A norbixina é encontrada em pequena quantidade nas sementes, podendo ser obtida pela saponificação da bixina em meio alcalino e é o pigmento principal das preparações hidrossolúveis (Mercadante, 2001; Tocchini & Mercadante, 2001).

Produtos de degradação presentes em pequenas quantidades também podem ser encontrados nas preparações comerciais de urucum. O número e a concentração destes pigmentos podem variar devido ao método de extração, temperatura, período de aquecimento, origem da semente e vida-de-prateleira do produto (Preston & Rickard, 1980).

Após aquecimento da bixina, a 125°C, Mckeown & Mark (1962), utilizando cromatografia de papel, isolaram um composto amarelo com 17 carbonos (C17), o qual foi posteriormente identificado como ácido monometil ester 4,8,dimetil tetradecahexanodióico (Mckeown, 1963, 1965). Scotter (1995) confirmou a estrutura deste composto proveniente da degradação térmica da bixina utilizando CLAE, espectros de massas e de RMN de ^1H .

Scotter *et al.* (1998) analisaram por espectrofotometria no UV-visível amostras comerciais de corantes de bixina e norbixina em grânulos, cristais, encapsuladas, soluções hidro- e lipossolúveis. Somente as amostras de norbixina foram analisadas por CLAE e os isômeros identificados como *all-trans* e *di-cis*-norbixina estavam em quantidades diferentes em todos os produtos. Os autores atribuíram tal diferença aos métodos utilizados na obtenção da norbixina comercial. Na amostra preparada com aquecimento a 70°C foi encontrado um teor de *all-trans* 6 vezes maior que na amostra com extração sem aquecimento.

Preston & Rickard (1980) investigando extratos de urucum obtidos por diferentes processos comerciais verificaram a presença de bixina, *all-trans*-bixina e do C17 em extrato de bixina solúvel em óleo, bixina e *trans*-bixina em suspensão de bixina em óleo e em bixina extraída com solvente, e norbixina e *trans*-norbixina (sais de sódio ou potássio) em extrato de urucum solúvel em água.

Cada uma das preparações comerciais tem especificidade diferente, cujas aplicações são geralmente recomendadas pelo fabricante. O seu uso é permitido em

produtos como massas alimentícias, produtos extrusados, laticínios, salsicharias, cereais matinais, doces, produtos de panificação, margarinas, cremes, sorvetes, molhos e condimentos.

No Brasil, o uso de corantes em alimentos é determinado pela legislação do Ministério da Saúde o qual contém uma lista de corantes permitidos, os alimentos aos quais podem ser adicionados e os limites máximos de adição. Os alimentos nos quais o corante de urucum pode ser adicionado e os níveis máximos de adição estão apresentados na Tabela 1.

Nos anos 70, a ingestão diária aceitável (IDA) para o extrato de urucum era de 1,25 mg/kg de peso corpóreo (FAO/WHO, 1970, 1976), entretanto a IDA foi diminuída para 0,065 mg/kg de peso corpóreo em 1982 (FAO/WHO, 1982). Nos últimos tempos, a aplicação de extratos de urucum em alimentos tem sofrido severas restrições no que se refere à gama de produtos a que pode ser adicionado bem como quanto à quantidade permitida. Uma das alegações para a redução da IDA é que na época pouco se conhecia sobre a composição e efeitos destes extratos.

Entretanto, a partir de estudos conduzidos em 1998 no Estado da Bahia, foi estimada uma ingestão potencial de bixina/norbixina na faixa de 0,097 a 0,14 mg/kg de peso corpóreo (Mascarenhas & Toledo, 1999). Embora o estudo tenha evidenciado uma ingestão de bixina acima da IDA, sabe-se que grandes quantidades de urucum fazem parte do hábito alimentar de algumas regiões do Brasil há mais de 100 anos, não havendo até o momento uma associação direta com qualquer tipo de doença (Toledo, 1999).

Tabela 1: Usos permitidos de urucum e níveis máximos de adição de acordo o Ministério da Saúde.

Alimentos em que podem ser adicionados. Resolução N° 04/88 – CNS/MS	Limite máximo g/100g – g/100ml
Amargos e aperitivos	q.s.p.
Batidas	q.s.p.
Cerejas em calda (somente para restituição da cor perdida no processamento)	q.s.p.
Cooler	q.s.p.
Creme Vegetal	q.s.p.
Geléias	q.s.p.
Gordura e compostos gordurosos	q.s.p.
Iogurtes aromatizados	q.s.p.
Leites aromatizados	q.s.p.
Leites geleificados aromatizados	q.s.p.
Licores	q.s.p.
Manteiga (nos tipos permitidos)	q.s.p.
Margarinas	q.s.p.
Mistela composta	q.s.p.
Néctares de frutas	q.s.p.
Óleos vegetais (somente para restituição da cor perdida no processamento)	q.s.p.
Produtos de frutas, cereais, legumes e outros ingredientes para uso em iogurtes, queijos tipo petit-suisse e similares	q.s.p.
Proteína texturizada de soja	q.s.p.
Queijo tipo prato	q.s.p.
Queijos (exclusivamente na crosta)	q.s.p.
Revestimento de embutidos cozidos de carne	q.s.p.
Sangria	q.s.p.
Sucos de frutas	q.s.p.
Vinhos compostos	q.s.p.
Vinhos licorosos	q.s.p.
Categoria 3 – gelados comestíveis. Resolução n° 384 – ANVS/MS 05 de agosto de 1999	Limite máximo g/100g
3.1 – Gelados Comestíveis Prontos Para o Consumo	0,02 (como bixina)
3.2 – Misturas Para o Preparo de Gelados Comestíveis	0,02 (como bixina)
3.3 – Pós Para o Preparo de Gelados Comestíveis	0,02 (como bixina)
Categoria 5 – balas, confeitos, bombons, chocolates de similares. Resolução n° 387 – ANVS/MS 05 de agosto de 1999	Limite máximo g/100g
5.1 – Balas, Caramelos, Pastilhas, Confeitos e Similares	
5.1.1 – Balas e caramelos	0,02 (como bixina)
5.1.2 – Pastilhas	0,02 (como bixina)
5.1.3 – Confeitos	0,02 (como bixina)
5.1.4 – Balas de goma e balas de gelatina	0,02 (como bixina)
5.2 – Goma de Mascar ou Chicle	0,02 (como bixina)
5.3 – Torrones, Marzipans, Pasta de Sementes Comestíveis Com ou Sem Açúcar	0,02 (como bixina)

5.7 – Bombons	
5.7.2 – Outros Bombons (sem chocolate)	0,02 (como bixina)
5.8 – Coberturas e Xaropes Para Produtos de Panificação e Biscoitos, Produtos de Confeitaria, Sobremesas, Gelados Comestíveis, Balas, Confeitos, Bombons, Chocolates e Similares e Banhos de Confeitaria	
5.8.1 – Coberturas e xaropes para produtos de panificação e biscoitos, produtos de confeitaria, sobremesas, gelados comestíveis, balas, confeitos, bombons, chocolates e similares e banhos de confeitaria, prontos para o consumo	0,02 (como bixina)
5.8.2 – Pós para produtos de panificação e biscoitos, produtos de confeitaria, sobremesas, gelados comestíveis, balas, confeitos, bombons, chocolates e similares e banhos de confeitaria	0,02 (como bixina)
5.9 – Recheios Para Produtos de Panificação e Biscoitos, Produtos de Confeitaria, Sobremesas, Gelados Comestíveis, Balas, Confeitos, Bombons, Chocolates e Similares e Banhos de Confeitaria	
5.9.1 – Recheios para produtos de panificação e biscoitos, produtos de confeitaria, sobremesas, gelados comestíveis, balas, confeitos, bombons, chocolates e similares e banhos de confeitaria, prontos para o consumo	0,02 (como bixina)
5.9.2 – Pós para preparo de recheios para produtos de panificação e biscoitos, produtos de confeitaria, sobremesas, gelados comestíveis, balas, confeitos, bombons, chocolates e similares e banhos de confeitaria	0,02 (como bixina)
Categoria 6 – cereais e produtos de ou a base de cereais. Resolução nº 385 – ANVS/MS 05 de agosto de 1999	Limite máximo g/100g
6.2 – Alimentos a Base de Cereais	0,0025 (como bixina)
6.4 – Massas Alimentícias	0,02 (como bixina)
6.4.1 – Massas alimentícias secas	
6.4.1.1 – Massas alimentícias secas com ovos, com ou sem vegetais verdes, tomate, pimentão e outros	<i>quantum satis</i>
6.4.1.2 – Massas alimentícias secas sem ovos, com ou sem vegetais verdes, tomate, pimentão e outros	<i>quantum satis</i>
6.4.1.3 – Massas alimentícias secas instantâneas com ovos, com ou sem vegetais verdes, tomate, pimentão e outros	<i>quantum satis</i>
6.4.1.4 – Massas alimentícias secas instantâneas sem ovos, com ou	

sem vegetais verdes, tomate, pimentão e outros	<i>quantum satis</i>
6.4.1.5 – Massas alimentícias secas com ovos, com recheio	<i>quantum satis</i>
6.4.1.6 – Massas alimentícias secas sem ovos, com recheio	<i>quantum satis</i>
6.4.2 – Massas alimentícias frescas	
6.4.2.1 – Massas alimentícias frescas de curta duração (até 48 h) com ovos, com ou sem vegetais, recheadas ou não	<i>quantum satis</i>
6.4.2.2 – Massas alimentícias frescas de curta duração (até 48 h) sem ovos, com ou sem vegetais, recheadas ou não	<i>quantum satis</i>
6.4.2.3 – Massas alimentícias frescas de longa duração (mais de 48 h) com ovos, com ou sem vegetais, recheadas ou não	<i>quantum satis</i>
6.4.2.4 – Massas alimentícias frescas de longa duração (mais de 48 h) sem ovos, com ou sem vegetais, recheadas ou não	<i>quantum satis</i>
Categoria 7 – produtos de panificação e biscoitos. Resolução nº 383 – ANVS/MS 05 de agosto de 1999	Limite máximo g/100g
7.2 – Biscoitos e Similares	
7.2.1 – Biscoitos e Similares com ou sem recheio, com ou sem cobertura	<i>quantum satis</i>
7.3 – Produtos de Confeitaria	
7.3.1 – Bolos, tortas, doces e massas de confeitaria, com fermento biológico ou fermentação natural, com ou sem recheio, com ou sem cobertura, prontos para o consumo ou semiprontos (inclue panetone e pan dulce)	0,001 (como bixina)
7.3.2 – Bolos, tortas, doces e massas de confeitaria, com fermento químico, com ou sem recheio, com ou sem cobertura, prontos para o consumo ou semiprontos	0,001 (como bixina)
Categoria 8 – carne e produtos cárneos. Portaria nº 1004 – SVS/MS 11 de dezembro de 1998	Limite máximo g/100g
8.2 - Produtos Cárneos	
8.2.1 – Industrializados	
8.2.1.1 – Produtos frescos embutidos ou não embutidos	0,002 (10)
8.2.1.2 – Produtos secos, curados e/ou maturados embutidos ou não	0,002 (10)
8.2.1.3 – Produtos cozidos embutidos ou não	0,002 (10)
8.2.2 – Produtos salgados	
8.2.2.1 – Produtos salgados crus	0,002 (10)
8.3 – Conservas e Semiconservas de Origem Animal	
8.3.1 Conservas cárneas, mistas e semiconservas cárneas	0,002 (10)

Categoria 12 – sopas e caldos. Resolução RDC nº 33 – ANVS/MS 09 de março de 2001	Limite máximo g/100g
12.1 – Sopas e Caldos Prontos Para o Consumo	0,015 (como bixina)
12.2 – Sopas e Caldos Concentrados	0,015 (como bixina)
12.3 – Sopas e Caldos Desidratados	0,015 (como bixina)
Categoria 13 – molhos e condimentos. Resolução nº 382 – ANVS/MS 05 de agosto de 1999	Limite máximo g/100g
13 – Molhos e Condimentos	
13.2 – Molhos Emulsionados (Incluindo Molhos a Base de Maionese)	0,001
13.3 – Maionese	0,001
13.4 – Molhos Não Emulsionados (exceto para produtos cuja denominação inclui a palavra tomate)	0,001
13.6 – Mostarda de Mesa	0,001
13.7 – Molhos Desidratados	0,001
13.8 – Condimentos Preparados	0,001
Categoria 16 – bebidas – subcategoria 16.2.2 – bebidas não alcoólicas gaseificadas e não gaseificadas. Resolução nº 389 – ANVS/MS 05 de agosto de 1999	Limite máximo g/100g
16.2.2 – Bebidas não alcoólicas gaseificadas e não gaseificadas	
16.2.2.1 – Prontas para o consumo	0,005 (como bixina)
16.2.2.2 – Preparados líquidos para bebidas gaseificadas e não gaseificadas	0,005 (como bixina)
16.2.2.3 – Pós para o preparo de bebidas gaseificadas e não gaseificadas	0,005 (como bixina)
Categoria 19 – sobremesas. Resolução nº 388 – ANVS/MS 05 de agosto de 1999	Limite máximo g/100g
19.1 – Sobremesas de Gelatina	
19.1.1 – Prontas para o consumo	0,001 (como bixina)
19.2 – Outras Sobremesas (Com ou Sem Gelatina, Com ou Sem Amidos, Com ou Sem Gelificantes)	
19.2.1 – Outras sobremesas (com ou sem gelatina, com ou sem amidos, com ou sem gelificantes) prontas para o consumo	0,001 (como bixina)
19.2.2 – Pós para preparo de outras sobremesas (com ou sem gelatina, com ou sem amidos, com ou sem gelificantes)	0,001 (como bixina)

Categoria 21 – preparações culinárias industriais. Resolução RDC nº 34 – ANVS/MS 09 de março de 2001	Limite máximo g/100g
21.1 – Prontas Para o Consumo (Congeladas ou Não)	0,015 (como bixina)
21.2 – Desidratadas	0,015 (como bixina)
Aditivos alimentares para suplementos vitamínicos e ou de minerais (líquidos) Resolução RDC nº 02 – ANVS/MS 02 de janeiro de 2001	Limite máximo g/100mL 0,01 (como bixina)
Aditivos alimentares para suplementos vitamínicos e ou de minerais (sólidos) Resolução RDC nº 02 – ANVS/MS 02 de janeiro de 2001	Limite máximo g/100 mg 0,02 (como bixina)

q.s.p.: quantidade suficiente para obter efeito desejado; (10):Somente na superfície

Fonte: Ministério da Saúde (1999).

4. Determinação de corante de urucum em alimentos

4.1 Métodos

Lancaster & Lawrence (1995) quantificaram os pigmentos de urucum em margarina, manteiga e queijos. Para cada 20 g de amostra realizou-se extração exaustiva com etanol/água/hidróxido de amônio concentrado (29,7% NH_3) e éter de petróleo para eliminação de lipídeos. A seguir adicionou-se uma solução com ácido acético e clorofórmio. Após centrifugação (1.700 rpm) os pigmentos foram transferidos para clorofórmio e a parte aquosa foi descartada. Esta etapa foi repetida e uma alíquota do extrato em clorofórmio foi evaporada sob nitrogênio. Os pigmentos foram solubilizados em metanol e analisados por CLAE em coluna de C_{18} (Supelco) e metanol/ácido acético 2% aquoso (9:1) como fase móvel. Cabe ressaltar que devido à extração dos pigmentos em meio alcalino, a bixina foi parcialmente convertida em norbixina e ambos os compostos foram quantificados.

A exatidão do método foi avaliada através da recuperação com valores de 87,6% para norbixina e de 92,6% bixina em queijos e 93,2% para ambos compostos em margarina e manteiga. O valor médio dos coeficientes de variação entre duplicatas foi de 1,8% para queijo e 6% para manteiga e margarina. O limite de detecção foi de 0,005 mg/kg para os compostos estudados e o limite de quantificação não foi relatado (Lancaster & Lawrence, 1995).

Scotter *et al.* (2002), desenvolvendo método para determinação de corante de urucum em diversos alimentos, utilizaram a metodologia descrita por Lancaster &

Lawrence (1995) com algumas modificações. O tamanho das amostras foi reduzido para 3 g para queijos, produtos a base de queijos e sobremesas com baixo teor de gordura, 5 g para peixes, sorvetes e iogurte, 8 g para margarinas e manteigas e 10 g para sobremesas, bolos, cereais matinais e “snacks” extrusados. Somente as amostras que continham alto teor de lipídeos foram previamente lavadas com hexano. A velocidade de centrifugação foi aumentada para 2.500 rpm e foi adicionado BHT como antioxidante. Para peixes, sorvetes e iogurte os pigmentos foram extraídos com acetonitrila e nos demais alimentos a extração seguiu o método desenvolvido por Lancaster & Lawrence (1995). Os pigmentos foram analisados por CLAE em coluna de C₁₈ (HiChrom) com acetonitrila/ácido acético 0,4% (65:35) como fase móvel. Os limites de detecção e de quantificação encontrados foram de 0,01 mg/kg e 0,1 mg/kg, respectivamente. A recuperação do método variou de 61 a 96% para os diversos alimentos, sendo que para “snacks” extrusados esta foi de 61%.

Bareth *et al.* (2002) descreveram um método para quantificação dos pigmentos de urucum em queijos, manteiga e margarina. Para queijos foi utilizado 5 g de amostra realizando duas extrações com acetona em ácido hidrocloreídrico (1%). A seguir o extrato foi evaporado e a água residual eliminada pela adição de etanol absoluto. O resíduo foi dissolvido em acetona e transferido para uma coluna de extração em fase sólida de NH₂, previamente condicionada com hexano. Lipídeos e β -caroteno foram eluídos com hexano/éter etílico (1:1 v/v) e a bixina e norbixina foram eluídas com metanol/ácido acético (7:3 v/v). Para manteiga e sorvete, os autores utilizaram o método descrito por Lancaster & Lawrence (1995), porém utilizando 5 g de amostra e eliminando a etapa de transferência dos pigmentos para clorofórmio. Uma alíquota do extrato em metanol/ácido acético foi analisada por CLAE com coluna de C₁₈ (Hypersil) e acetonitrila/ácido acético 5% aquoso (75:25) como fase móvel.

Bareth *et al.* (2002) também desenvolveram um método espectrofotométrico para quantificação de corante natural de urucum em queijos e laticínios. Os autores relataram que interferentes como lipídeos e β -caroteno podem ser previamente separados por extração em fase sólida sem o uso de solventes halogenados. Para outros alimentos que contém corantes como curcumina e β -apo-8'-carotenal juntamente

com urucum, o método por CLAE é o mais indicado, além do fato de que por CLAE torna-se possível a separação de bixina e norbixina.

Nas metodologias descritas por Bareth *et al.* (2002), a recuperação variou de acordo com o tipo de amostra analisada, sendo que por espectrofotômetro estas foram de 92 a 99% e de 80 a 90% e por CLAE de 97 a 99% e de 80 a 91% para bixina e norbixina, respectivamente. Os valores médios do coeficiente de variação para bixina foram de 0,9% em queijos, 5,9% em sorvetes e 8,5% em manteiga, e para norbixina, detectada somente em queijos, de 2,5%. O limite de quantificação foi de 0,15 mg/kg para ambos os compostos e o limite de detecção não foi relatado.

Tocchini & Mercadante (2001) quantificaram os teores de bixina e norbixina em várias marcas e lotes de colorífico. Os carotenóides foram extraídos com acetona e metanol em ultra-som. Os extratos foram unidos em um balão volumétrico e o volume foi completado com metanol. Desta solução uma alíquota foi analisada por CLAE. Os carotenóides foram separados em coluna de C₁₈ (Spherisorb) com acetonitrila/ácido acético 2% (65:35) como fase móvel (Scotter *et al.* 1994). A recuperação do método variou de 95 a 105% para bixina e de 100 a 106% para norbixina. Os coeficientes de variação, entre triplicatas, foi no máximo 3% para bixina e 21% para norbixina. Os autores relataram que o alto valor do coeficiente de variação obtido para norbixina era esperado, visto que a sua concentração nas amostras foi cerca de 100 vezes menor que a da bixina e apenas 10 vezes maior que o limite de detecção. Os limites de detecção foram de 0,018 µg/mL e 0,017 µg/mL para bixina e norbixina respectivamente, e o limite de quantificação não foi relatado pelos autores.

Maga & Kim (1990) estudaram a estabilidade de corante natural de beterraba, cúrcuma, páprica e urucum, em amostras de farinha de arroz extrusada e não extrusada. A extração foi realizada de acordo com procedimento descrito por Marty & Berset (1986), que consiste de uma digestão prévia do extrusado para facilitar a liberação do pigmento da matriz alimentícia com α -amilase em tampão fosfato pH 7,0, seguida de extração com hexano/acetona. A separação foi realizada por cromatografia de camada delgada de sílica gel e como fase móvel ciclohexano/clorofórmio/acetona/ácido acético (50:20:20:1 v/v) para pigmentos lipossolúveis e clorofórmio/metanol/ácido acético (50:30:1 v/v) para os hidrossolúveis.

Após a separação, a placa de sílica foi exposta a vapor de iodo e a quantificação realizada através de densitômetro. Parâmetros de recuperação, precisão e limites de detecção e de quantificação não foram relatados pelos autores.

Scotter *et al.* (1998) desenvolveram um procedimento analítico para determinação simultânea dos principais componentes, isômeros minoritários e produtos de degradação térmica de formulações comerciais de urucum. A extração dos pigmentos foi realizada de acordo com as características de cada tipo de corante (Tabela 2). Os pigmentos foram analisados por CLAE em coluna de C₁₈ (HiChrom) com acetonitrila/ácido acético 0,4% (65:35) como fase móvel. Os limites de detecção e quantificação, recuperação do método e coeficiente de variação não foram relatados pelos autores.

Diante do exposto acima, verifica-se que o tipo de extração depende da composição e complexidade da matriz alimentícia e que na grande maioria dos trabalhos a quantificação foi realizada por CLAE, sendo que em todos os estudos foi utilizada coluna de fase reversa C₁₈.

Tabela 2. Métodos para extração de pigmentos de urucum de formulações comerciais.

Pigmento	Forma	Processo comercial para obtenção do corante	Método de extração
bixina	cristalina	extração direta em óleo	dissolvido em DMF e diluído em ACN
bixina	líquida dispersível em água	extração direta	dissolvido em NaOH 0,1 N e diluído em MeOH
bixina	pó seco ou cristalina	extração indireta com solvente	dissolvido em DMF e diluído em ACN
bixina	pó seco encapsulado	-----	dissolvido em H ₂ O e diluído em ACN
bixina	solução/suspensão em óleo	extração direta em óleo quente	dissolvido em ácido acético 0,5% em DMF e diluído em MeOH (lavagem prévia com EP)
norbixina	grânulos ou pó	extração direta em álcali aquoso	dissolvido em NaOH 0,1 N e diluído em MeOH
norbixina	solução aquosa	extração indireta com solvente ou extração direta em álcali aquoso	diluído em NaOH 0,1 M/MeOH (1:9)
norbixina	solução	extração direta em álcali aquoso	dissolvido em H ₂ O e diluído em ACN

DMF: dimetilformamida; ACN: acetonitrila; EP: éter de petróleo.

Fonte: Scotter *et al.* (1998).

4.2 Teores

A Tabela 3 apresenta uma compilação dos níveis de corantes de urucum encontrados em diversos alimentos.

Tabela 3. Teores de bixina e norbixina em várias amostras.

Amostras	Bixina (mg/kg)	<i>trans</i> - Bixina (mg/kg)	Norbixina (mg/kg)
Manteiga Marca A ^a	0,20	NQ	0,91
Manteiga Marca B ^a	0,012	NQ	ND
Manteiga Marca C1 ^a	0,014	NQ	0,019
Manteiga Marca C2 ^a	0,019	NQ	0,027
Manteiga Marca D ^a	0,017	NQ	0,033
Margarina ^a	ND	NQ	ND
Queijo canadense ^a	16,8	NQ	5,1
Queijo canadense "Colby" ^a	21,2	NQ	ND
Queijo "Cheddar" ^a	18,2	NQ	ND
Queijo "Cheddar" Sharp ^a	68,8	NQ	ND
Queijo de leite desnatado ^a	15,6	NQ	ND
Queijo em pasta processado ^a	1,1	NQ	5,9
Queijo em pedaços processado ^a	2,5	NQ	ND
Biscoitos ^b	ND	ND	0,3
Bolo de limão/laranja ^b	ND	ND	2,4
Bolo de queijo ^b	ND	ND	1,7
Cereais extrusados ^b	ND	ND	4,1
Cereais matinais ^b	0,5	0,7	2,2
Creme caramelo ^b	ND	ND	0,4
Geléia de morango ^b	ND	ND	1,3
Iogurte ^b	ND	ND	0,2 – 2,2
Iogurte de damasco ^b	ND	ND	0,5
Iogurte de frutas ^b	ND	ND	0,4

logurte de frutas, baixo teor de gordura ^b	ND	ND	0,1
logurte de laranja ^b	ND	ND	2,7
Manteiga ^b	2,9	0,9	ND
Margarina ^b	2,4	0,9	ND
Margarina, baixo teor de gordura ^b	2,6	0,9	ND
Massas ^b	ND	ND	0,2
"Milk shake" ^b	ND	ND	0,4
Mousse ^b	ND	ND	0,3
Mousse de chocolate ^b	ND	ND	0,1
Mousse de laranja/damasco ^b	ND	ND	0,6
Pão de alho com queijo ^b	ND	ND	0,2
Peixe defumado, com manteiga ^b	ND	ND	1,5 – 4,6
Pipoca ^b	ND	ND	0,8
Pizza ^b	ND	ND	0,2
Pudim ^b	ND	ND	0,1
Queijo "Cheddar" ^b	ND	ND	9,1
Queijo "Cheddar", light ^b	ND	ND	0,1
Queijo "Cheshire" ^b	ND	ND	1,3
Queijo "Cottage" ^b	ND	ND	0,3
Queijo "Double Gloucester" ^b	ND	ND	2,9 – 4,0
Queijo "Edam" ^b	ND	ND	0,2 – 0,5
Queijo "Edam" com cebola e alho ^b	ND	ND	0,4
Queijo fatiado ^b	ND	ND	0,3
Queijo "Gloucester", baixo teor de gordura ^b	ND	ND	0,2
Queijo "Gloucester" com ervas ^b	ND	ND	1,3
Queijo "Gouda" ^b	ND	ND	0,2
Queijo "Leicester" ^b	ND	ND	14,1 – 16,1
Queijo "Leicester", baixo teor de gordura ^b	ND	ND	9,0
"Snack" extrusado, mistura de sabores ^b	ND	ND	0,3
"Snack" extrusado, sabor camarão Marca A ^b	ND	ND	0,6
"Snack" extrusado, sabor camarão Marca B ^b	ND	ND	0,6

"Snack" extrusado, sabor queijo Marca A ^b	3,4	1,8	1,1
"Snack" extrusado, sabor queijo Marca B ^b	3,2	2,5	0,5
"Snack" extrusado, sabor queijo Marca C ^b	3,4	7,6	1,0
Sobremesa instantânea ^b	ND	ND	6,0 – 23,4
Sobremesa pronta para servir ^b	ND	ND	0,7
Sorvete de baunilha ^b	ND	ND	2,4 – 2,6
Sorvete de chocolate ^b	ND	ND	0,5
Sorvete de framboesa ^b	ND	ND	3,3
Sorvete de frutas ^b	ND	ND	1,0
Queijo "Camembert" (casca) ^c	< 0,15	NQ	11,89
Queijo "Camembert" (interior) ^c	< 0,15	NQ	< 0,15
Queijo "Edamer" (inteiro) ^c	< 0,15	NQ	0,84
Queijo "Green" ^c	< 0,15	NQ	0,91
Queijo manteiga ^c	< 0,15	NQ	0,95
Queijo manteiga (casca) ^c	< 0,15	NQ	7,54
Queijo manteiga (interior) ^c	< 0,15	NQ	0,43
Queijo "Peperoni" ^c	< 0,15	NQ	1,08
Queijo presunto ^c	< 0,15	NQ	0,57
Queijo semi duro Marca A (casca) ^c	< 0,15	NQ	5,6
Queijo semi duro Marca A (interior) ^c	< 0,15	NQ	< 0,15
Queijo semi duro Marca B (casca) ^c	< 0,15	NQ	9,45
Queijo semi duro Marca B (interior) ^c	< 0,15	NQ	0,28
Colorífico Marca A ^d	1.850	NQ	59
Colorífico Marca B ^d	2.290	NQ	32
Colorífico Marca C ^d	1.540	NQ	21
Colorífico Marca D ^d	3.200	NQ	45
Colorífico Marca E ^d	3.540	NQ	66
Colorífico Marca F ^d	2.020	NQ	33
Colorífico Marca G ^d	1.540	NQ	36

^aLancaster & Lawrence (1995), ^bScotter *et al.* (2002), ^cBareth *et al.* (2002), ^dTocchini & Mercadante (2001). NQ: não quantificado, ND: não detectado.

Lancaster & Lawrence (1995) verificaram a presença de norbixina em vários tipos de queijo com valores variando entre 1,1 a 68,8 mg/kg. A bixina foi encontrada somente em uma das marcas de queijo (5,9 mg/kg) e em uma marca de queijo cheddar (5,1 mg/kg) (Tabela 3). Os níveis adicionados de corante foram mais baixos em manteiga (ordem de $\mu\text{g/kg}$) quando comparado com os adicionados em queijos (mg/kg). Os autores destacaram ainda que as amostras analisadas de margarina não apresentaram quantidades significativas de bixina e norbixina.

Scotter *et al.* (2002) analisaram corante natural de urucum em diversos alimentos num total de 165 amostras (Tabela 3).

Bareth *et al.* (2002) quantificaram os teores de bixina e norbixina em 9 amostras comerciais de queijo. O teor de bixina foi abaixo do limite de quantificação (0,15 mg/kg) e não pode ser determinado e a norbixina estava presente em todas as amostras. Os autores relataram que este fato ocorreu, pois o corante normalmente utilizado em queijos é a norbixina solúvel em água. O valor médio de norbixina na parte interna das amostras foi de 0,77 mg/kg e a concentração na casca variou de 5,6 mg/kg a 11,9 mg/kg.

Tocchini & Mercadante (2001) quantificaram os teores de bixina e norbixina em várias marcas e lotes de colorífico. Foi demonstrado que as indústrias possuem um bom controle da matéria prima e do processo, entretanto os autores destacaram que existe uma variação de até 100% nos teores de carotenóides nas diferentes marcas estudadas (Tabela 3).

Scotter *et al.* (1998) analisaram formulações utilizadas pelas indústrias de bixina solúvel em óleo (Tabela 4) e de norbixina solúvel em água (Tabela 5), mostrando uma enorme variação no teor de corante destas preparações.

Os níveis de corante de urucum encontrados em todos os alimentos estavam dentro do limite máximo permitido pela legislação dos países onde estes produtos foram adquiridos.

Tabela 4. Conteúdo de bixina em formulações comerciais de urucum solúvel em óleo.

Formulações comerciais de urucum	Bixina (%)
cristalina	34,5
líquida/dispersível em água	0,1
pó seco	9,2
pó seco	51,0
solução em óleo	0,3
solução/suspensão em óleo	1,8
solução/suspensão em óleo	3,8

Fonte: Scotter *et al.* (1998).

Tabela 5. Conteúdo de norbixina em formulações comerciais de urucum solúvel em água.

Formulações comerciais de urucum	Norbixina (%)
grânulos	25,9
grânulos	32,6
grânulos	43,6
grânulos	47,3
pó	30,2
pó seco encapsulado	7,3
solução	1,5
solução aquosa	1,7
solução aquosa	3,3
solução aquosa	5,9

Fonte: Scotter *et al.* (1998).

5. Estabilidade de carotenóides

5.1. Degradação térmica

Dentre as diversas etapas de processamento de um alimento o aquecimento é muitas vezes indispensável. Entretanto, devido ao seu longo sistema de ligações duplas conjugadas os carotenóides são suscetíveis a altas temperaturas.

Marty & Berset (1990) avaliaram a degradação térmica de β -caroteno (98% de pureza) durante o processo de extrusão do amido e em 3 sistemas-modelo constituídos por β -caroteno em diclorometano em ampolas seladas, β -caroteno em frascos com circulação de ar e β -caroteno, amido e água em proporções idênticas ao processo de extrusão. Os sistemas foram aquecidos a 180°C por 2 horas e os pigmentos foram separados por cromatografia preparativa, em coluna e CLAE. Um total de 25 produtos foram separados e identificados após a extrusão sendo os principais: 13,13'-di-*cis*- β -caroteno, 9,13'-di-*cis*- β -caroteno, 15-*cis*- β -caroteno, 13-*cis*- β -caroteno, 9,9'-di-*cis*- β -caroteno e 9-*cis*- β -caroteno. Somente no sistema com ampolas seladas não foram detectados os isômeros 9,13'-di-*cis*- β -caroteno, 15-*cis*- β -caroteno e 9,9'-di-*cis*- β -caroteno. Os autores concluíram que a resistência do pigmento em altas temperaturas dependeu das condições do meio, sendo que o aquecimento a 180°C por 2 horas causou quebra na molécula quando em estado puro (7,5% em ampolas seladas e 15% frascos com circulação de ar), porém a presença de constituintes usuais nos alimentos como água e amido, combinados com mistura mecânica, favoreceu a difusão de oxigênio a degradação foi de 40%. As perdas tornaram-se máximas durante o processo de extrusão devido ao aumento da energia do sistema pela alta pressão atingindo 92% de degradação. Os parâmetros cinéticos não foram relatados pelos autores.

Maga & Kim (1990) investigaram a estabilidade de corante comercial de beterraba, cúrcuma, páprica e urucum na temperatura de extrusão (125°C ou 155°C), usando farinha de arroz como base para os corantes. Os pigmentos foram separados por cromatografia em camada delgada de sílica gel e quantificados por espectrofotometria e a retenção de cor nos produtos extrusados avaliados pelos parâmetros HunterLab. A norbixina mostrou ser o pigmento mais estável seguido dos corantes curcuminóides hidro e lipossolúvel, bixina e páprica. O corante de beterraba não apresentou boa estabilidade durante a extrusão nas condições avaliadas. Produtos formados e parâmetros cinéticos não foram relatados pelos autores.

Henry *et al.* (1998) estudaram, por CLAE, degradação de licopeno, luteína, 9-*cis*- e all-*trans*- β -caroteno durante aquecimento em óleo de semente de cártamo a 75, 85 e 95°C por 24, 12 e 5 horas, respectivamente. Os resultados indicaram que a degradação destes carotenóides seguiu um modelo cinético de primeira ordem. O licopeno

apresentou constante de reação (k) de aproximadamente o dobro dos demais pigmentos estudados e a luteína foi o carotenóide mais estável (Tabela 6). A energia de ativação (E_a) calculada foi de 26,2 kcal/mol para *all-trans*- β -caroteno, 25,1 kcal/mol para 9-*cis*- β -caroteno, 19,8 kcal/mol para licopeno e 24,9 kcal/mol para luteína. Os autores relataram que houve formação de 13-*cis*- e 9-*cis*- β -caroteno e também de um isômero *cis* não identificado a partir da degradação de *all-trans*- β -caroteno, e que em todas as temperaturas e períodos de aquecimento avaliados o 13-*cis*- β -caroteno estava sempre presente em maiores concentrações. Embora numerosos produtos de degradação de licopeno e luteína tenham se formado nas condições experimentais, os mesmos não foram monitorados.

Tabela 6. Constantes de velocidade de degradação térmica de carotenóides em diferentes sistemas-modelo líquidos.

Carotenóide	Sistema-modelo	Condições experimentais	Constante de reação (min ⁻¹)	Referência
all- <i>trans</i> -β-caroteno	óleo de semente de cártamo, escuro, com O ₂	75°C	0,0007	Henry <i>et al.</i> , 1998
		85°C	0,0020	
		95°C	0,0054	
all- <i>trans</i> -β-caroteno	cristais (isomerização para 13- <i>cis</i> -β-caroteno)	150°C	0,0125	Chen <i>et al.</i> , 1994
all- <i>trans</i> -β-caroteno	cristais (isomerização para 9- <i>cis</i> -β-caroteno)	150°C	0,0043	Chen <i>et al.</i> , 1994
all- <i>trans</i> -α-caroteno	cristais (isomerização para 13- <i>cis</i> -α-caroteno)	150°C	0,0323	Chen <i>et al.</i> , 1994
all- <i>trans</i> -α-caroteno	cristais (isomerização para 9- <i>cis</i> -α-caroteno)	150°C	0,0038	Chen <i>et al.</i> , 1994
all- <i>trans</i> -α-caroteno	cristais (isomerização para 15- <i>cis</i> -α-caroteno)	150°C	0,0067	Chen <i>et al.</i> , 1994
9- <i>cis</i> -β-caroteno	óleo de semente de cártamo, escuro, com O ₂	75°C	0,0008	Henry <i>et al.</i> , 1998
		85°C	0,0018	
		95°C	0,0059	
bixina	H ₂ O/EtOH (8:2), escuro e O ₂	98°C	0,08	Tocchini <i>et al.</i> , 2002
bixina	H ₂ O/EtOH (8:2), escuro e O ₂	125°C	0,16	Tocchini <i>et al.</i> , 2002
bixina	MeOH, presença de luz e O ₂	65°C	0,41 x 10 ⁻³	Scotter <i>et al.</i> , 2001

bixina	EtOH, presença de luz e O ₂	78°C	0,65 x 10 ⁻³	Scotter <i>et al.</i> , 2001
bixina	<i>n</i> -propanol, presença de luz e O ₂	97°C	1,25 x 10 ⁻³	Scotter <i>et al.</i> , 2001
licopeno	óleo de semente de cártamo, escuro, com O ₂	75°C	0,0018	Henry <i>et al.</i> , 1998
		85°C	0,0036	
		95°C	0,0086	
luteína	óleo de semente de cártamo, escuro, com O ₂	75°C	0,0006	Henry <i>et al.</i> , 1998
		85°C	0,0022	
		95°C	0,0045	
norbixina	H ₂ O/EtOH (8:2), escuro e O ₂	98°C	0,18	Tocchini <i>et al.</i> , 2002

Chen *et al.* (1994) monitoraram reações de isomerização e de degradação de cristais de α -caroteno e β -caroteno por CLAE em temperaturas de 50, 100 e 150°C por 10, 20 e 30 minutos. Foram separados e detectados quatro isômeros *cis* de β -caroteno (13,15-di-*cis*-, 15-*cis*-, 13-*cis*- e 9-*cis*-) e três de α -caroteno (15-*cis*-, 13-*cis*- e 9-*cis*-). A formação de 13-*cis*- e 9-*cis*- a partir de α - e β -caroteno foi reversível, sendo o equilíbrio atingido mais rapidamente à temperatura de 150°C e a formação de 13-*cis* preferencial. Em todas as condições avaliadas, α -caroteno apresentou maior velocidade de degradação que β -caroteno. As constantes cinéticas foram relatadas somente para a temperatura de 150°C (Tabela 6) e E_a não foi calculada pelos autores.

Os produtos de degradação térmica de bixina foram estudados por Mckeown & Mark (1962) que utilizaram cromatografia de papel para isolar um composto amarelo com 17 carbonos, o qual foi posteriormente identificado como ácido monometil ester 4,8,dimetil tetradecahexanodióico (Mckeown, 1963, 1965) juntamente com pequenas quantidades de vários compostos aromáticos principalmente *m*-xileno (Figura 6). Posteriormente, Scotter (1995) confirmou a estrutura deste composto amarelo proveniente da degradação térmica da bixina à temperatura de 209-212°C, utilizando espectros de massas e de RMN de ^1H .

Ainda de acordo com o estudo de Scotter (1995), o composto C17 após vários meses de armazenamento em temperatura ambiente apresentou a formação de isômeros identificados através dos espectros no UV-visível como *all-trans*, 9-*cis*, 13-*cis* e 15-*cis*-C17 (Figura 7). Os parâmetros cinéticos não foram relatados pelo autor.

Tocchini *et al.* (2002) também verificaram por CLAE a formação de produtos de degradação de bixina em sistemas-modelo água/etanol (8:2) a 125°C, enquanto que à temperatura de 98°C, a isomerização da bixina e norbixina foi a reação preferencial. Os produtos formados não foram caracterizados. A norbixina apresentou maior estabilidade que a bixina (Tabela 6). Nos sistemas avaliados a presença de oxigênio molecular não apresentou efeito marcante sobre a degradação térmica dos carotenóides. A E_a não foi relatada pelos autores.

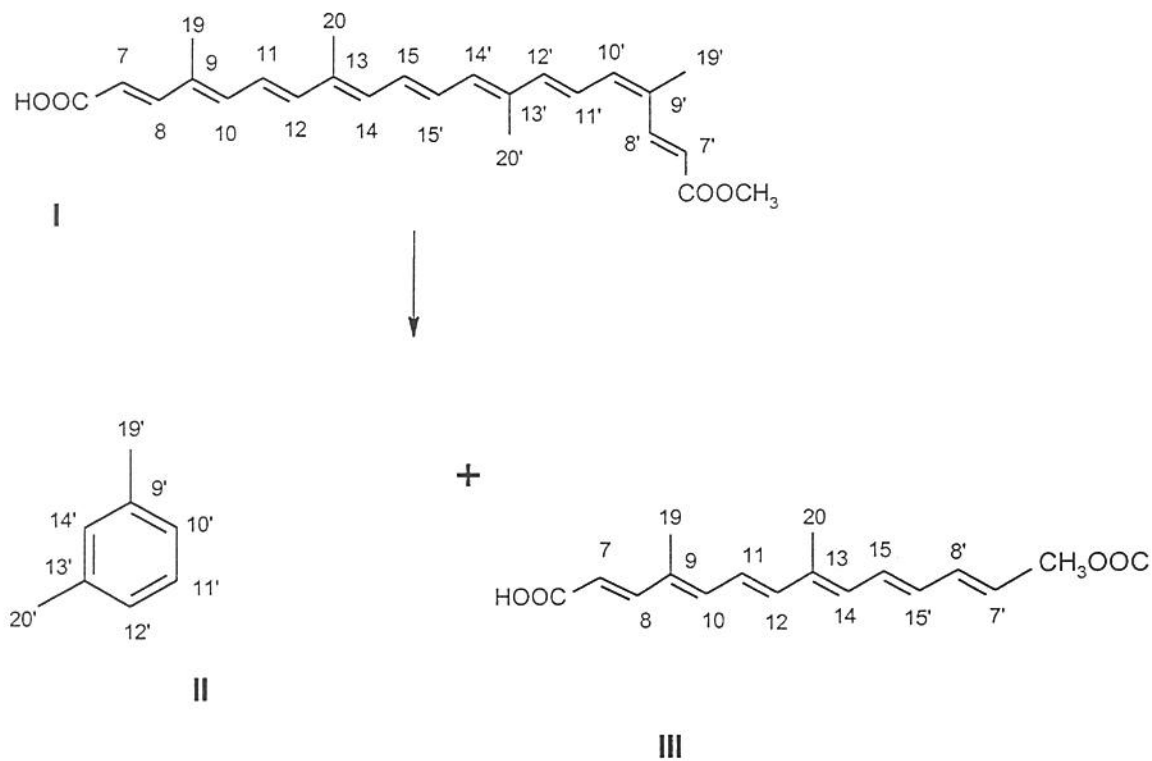


Figura 6. Esquema da degradação térmica de bixina de acordo com Mckeown (1963, 1965). I: bixina, II: *m*-xileno, III: C17.

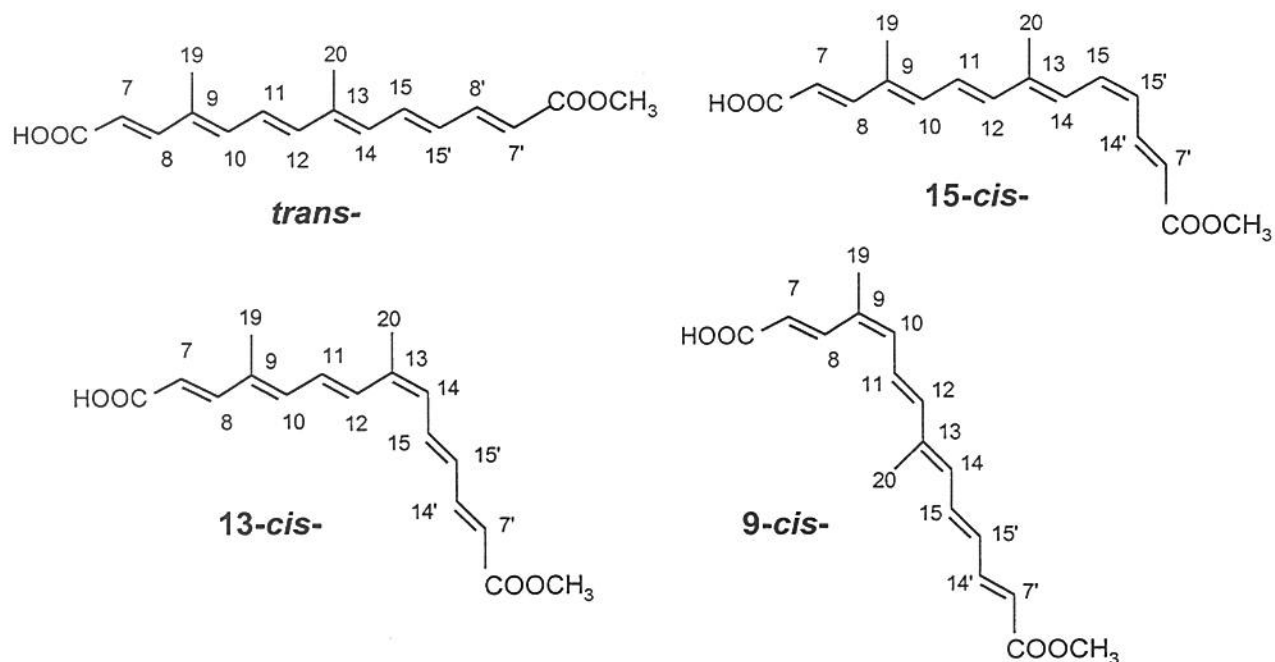


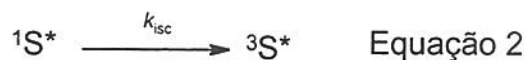
Figura 7. Estruturas dos isômeros de C17.

Scotter *et al.* (2001) avaliaram por CLAE a estabilidade térmica de bixina em sistemas-modelo alcoólicos de metanol, etanol e *n*-propanol nas temperaturas de 65, 78 e 97°C, respectivamente, por até 24 horas. Um di-*cis*-isômero foi formado rapidamente nos primeiros 180 minutos de aquecimento a 78°C ($k = 0,021 \text{ min}^{-1}$), todavia tanto *trans*-bixina quanto o composto de degradação C17 foram formados em menor velocidade ($k = 0,72 \times 10^{-4} \text{ min}^{-1}$ e $0,78 \times 10^{-4} \text{ min}^{-1}$, respectivamente). Como esperado, a velocidade de degradação da bixina aumentou com a temperatura, porém as constantes cinéticas foram relatadas somente para a temperatura de 78°C (Tabela 6). A E_a para bixina foi de 8,6 kcal/mol.

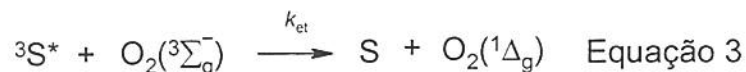
Estes autores também conduziram um experimento para verificar se compostos de degradação análogos ao C17 poderiam ser detectados durante a degradação térmica de norbixina. Assim foi utilizado formulações comerciais de corante contendo 44% de norbixina, 9 mg/kg de xileno e traços de C17 e tolueno. As formulações foram dissolvidas em NaOH 0,1 M e aquecidas por 1 hora a 100°C e suspensas em *n*-butil acetato e etano-1,2-diol com aquecimento por 1 hora em temperaturas de 126°C e 198°C, respectivamente. Os resultados evidenciaram a formação de C17 análogo da norbixina nas temperaturas de 126°C (*n*-butil acetato) e 198°C (etano-1,2-diol), contudo em temperaturas menores (100°C) a isomerização foi a reação predominante. Os parâmetros cinéticos para norbixina não foram relatados (Scotter *et al.*, 2001).

5.2. Ação do oxigênio singlete

Os alimentos contêm sensibilizadores naturais tais como clorofila, hematoporfirinas e riboflavina. Estes sensibilizadores, cujo estado fundamental é singlete (1S), são capazes de captar luz ($h\nu$), como mostram as Equações 1 e 2, induzindo reações de oxidação foto-sensitizada (Bradley & Min, 1992).

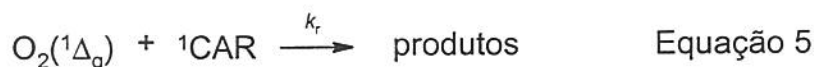
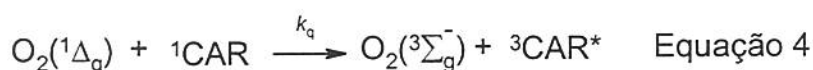


O sensibilizador no estado triplete ($^3S^*$) pode ser desativado através de dois mecanismos, conhecidos como Tipo I, que consiste na associação direta do sensibilizador com outra molécula formando radicais livres, e Tipo II através da formação de oxigênio singlete, $O_2(^1\Delta_g)$, pela transferência de energia de $^3S^*$ para o O_2 atmosférico, $O_2(^3\Sigma_g^-)$, como mostra a Equação 3.



O $O_2(^1\Delta_g)$ pode interagir com outras moléculas, como os carotenóides, de dois modos diferentes: através de reações químicas (processo químico) ou reações de transferência de energia (processo físico), conduzindo à sua desativação.

A desativação física (Equação 4) envolve a transferência de energia de excitação do $O_2(^1\Delta_g)$ para o carotenóide (1CAR), resultando em formação de oxigênio no seu estado fundamental, $O_2(^3\Sigma_g^-)$, e estado triplete excitado do carotenóide (3CAR), cuja energia é dissipada através de interações rotacionais e vibracionais entre o carotenóide no estado triplete (3CAR) e o solvente para recuperar o estado fundamental do carotenóide (1CAR) (Stahl & Sies, 1993). Em contraste com a desativação física (k_q), o processo químico (k_r) resulta em destruição do cromóforo e na formação de produtos de oxidação, como mostra a Equação 5 (Stratton *et al.*, 1993).



O primeiro relato que comprovou a eficiência dos carotenóides como desativador de $O_2(^1\Delta_g)$ foi publicado por Foote & Denny (1968). Neste trabalho, foi utilizado azul de metileno como sensibilizador em sistema-modelo de benzeno/metanol (4:1) a 25°C e β -caroteno com diversas concentrações de 2-metil-2-penteno. Assim, verificou-se uma redução em até 95% na formação de hidroperóxidos do 2-metil-penteno quando o β -

caroteno estava presente no sistema. Neste trabalho pioneiro não foi relatado se houve degradação do β -caroteno.

DiMascio *et al.* (1989) determinaram a constante de desativação física (k_q) de 11 carotenóides em etanol/clorofórmio/água (50:50:1) (Tabela 7), utilizando a dissociação térmica do endoperóxido 3,3'-(1,4-naftilideno) dipropionato (NDPO₂) para geração de O₂(¹ Δ_g). Comparando a estrutura química do β -caroteno, γ -caroteno e licopeno e a habilidade de desativar O₂(¹ Δ_g), pode-se comprovar que a abertura do anel β -ionona aumentou a habilidade sequestrante desses carotenóides. Segundo os autores este resultado sugere que a abertura do anel provoca uma diminuição do nível de energia do carotenóide, havendo uma aproximação do nível de energia do estado triplete do carotenóide ao estado excitado do oxigênio facilitando o processo de transferência de energia. Por esta razão, o licopeno foi o carotenóide mais eficiente na desativação do O₂(¹ Δ_g). Os autores não determinaram a desativação química (k_r).

Conn *et al.* (1991) estudaram a desativação de O₂(¹ Δ_g) por diversos carotenóides em solventes orgânicos (tolueno e benzeno) utilizando fenazine como sensibilizador. O licopeno mostrou ser o composto mais efetivo na desativação de O₂(¹ Δ_g), contudo como mostra a Tabela 7, os valores encontrados foram menores que os relatados por DiMascio *et al.* (1989).

Utilizando endoperóxido ácido 3-(4-metil-1-naftil) propiônico e bixina ou norbixina em sistemas-modelo líquidos, Speranza *et al.* (1990) verificaram que os valores de k_q foram de duas e quatro ordens de grandeza maiores que os valores de k_r em solução aquosa e orgânica respectivamente, para os dois carotenóides avaliados, comprovando que a desativação de O₂(¹ Δ_g) por carotenóides ocorre principalmente pelo processo físico. Este fato também ocorreu em sistema de micela inversa para outros carotenóides, inclusive com bixina (Tabela 7) (Montenegro *et al.*, 2002).

Tabela 7. Constantes de desativação química (k_r), física (k_q) e total (k_t) para carotenóides.

Carotenóide	Sistema-modelo	Constantes de reação ($M^{-1}.s^{-1}$)			Referência
		k_r	k_q	k_t	
ácido β -apo-6'-carotenóico	AOT/hexano/ H_2O $W = 5$	$1,4 \times 10^6$	-----	$1,0 \times 10^{10}$	Montenegro <i>et al.</i> , 2002
ácido β -apo-12'-carotenóico	AOT/hexano/ H_2O $W = 5$	$1,9 \times 10^6$	-----	$0,04 \times 10^{10}$	Montenegro <i>et al.</i> , 2002
all- <i>trans</i> -retinol	benzeno/MeOH (4:1) – 25°C	-----	4×10^9	-----	Footo <i>et al.</i> , 1970a
α -caroteno	tolueno	-----	$0,82 \times 10^{10}$	-----	Conn <i>et al.</i> , 1991
α -caroteno	EtOH/ $CHCl_3$ / H_2O (50:50:1)	-----	$1,9 \times 10^{10}$	-----	DiMascio <i>et al.</i> , 1989
α -caroteno	AOT/hexano/ H_2O $W = 5$	$1,6 \times 10^6$	-----	$1,3 \times 10^{10}$	Montenegro <i>et al.</i> , 2002
astaxantina	benzeno	-----	$1,4 \times 10^{10}$	-----	Conn <i>et al.</i> , 1991
astaxantina	EtOH/ $CHCl_3$ / H_2O (50:50:1)	-----	$2,4 \times 10^{10}$	-----	DiMascio <i>et al.</i> , 1989
astaxantina	óleo de soja /DCM/clorofila	-----	-----	$9,79 \times 10^9$	Lee & Min, 1990
astaxantina	tolueno - 25°C	-----	-----	$2,1 \times 10^8$	Nielsen <i>et al.</i> , 1996
β -caroteno	benzeno	-----	$1,3 \times 10^{10}$	-----	Conn <i>et al.</i> , 1991
β -caroteno	ciclohexano	-----	$1,4 \times 10^{10}$	-----	Conn <i>et al.</i> , 1991
β -caroteno	CCl_4	-----	$0,99 \times 10^{10}$	-----	Conn <i>et al.</i> , 1991
β -caroteno	$CHCl_3$	-----	$1,1 \times 10^{10}$	-----	Conn <i>et al.</i> , 1991
β -caroteno	tolueno	-----	$1,4 \times 10^{10}$	-----	Conn <i>et al.</i> , 1991

β-caroteno	EtOH/CHCl ₃ /H ₂ O (50:50:1)	-----	1,2 x 10 ¹⁰	-----	Conn <i>et al.</i> , 1991
β-caroteno	EtOH/CHCl ₃ /H ₂ O (50:50:1)	-----	1,4 x 10 ¹⁰	-----	DiMascio <i>et al.</i> , 1989
β-caroteno	óleo de soja /DCM/clorofila	-----	-----	4,60 x 10 ⁹	Jung & Min, 1991
β-caroteno	AOT/hexano/H ₂ O W = 5	1,1 x 10 ⁶	-----	1,3 x 10 ¹⁰	Montenegro <i>et al.</i> , 2002
β-caroteno	AOT/hexano/H ₂ O W = 50	0,9 x 10 ⁶	-----	1,3 x 10 ¹⁰	Montenegro <i>et al.</i> , 2002
β-caroteno	tolueno - 25°C	-----	-----	1,1 x 10 ⁸	Nielsen <i>et al.</i> , 1996
β-apo-8'- carotenal	óleo de soja /DCM/clorofila	-----	-----	3,06 x 10 ⁹	Jung & Min, 1991
β-apo-8'- carotenal	AOT/hexano/H ₂ O W = 5	1,1 x 10 ⁶	-----	1,1 x 10 ¹⁰	Montenegro <i>et al.</i> , 2002
9- <i>cis</i> -β- caroteno	benzeno	-----	1,1 x 10 ¹⁰	-----	Conn <i>et al.</i> , 1991
9- <i>cis</i> -β- caroteno	tolueno	-----	0,9 x 10 ¹⁰	-----	Conn <i>et al.</i> , 1991
15- <i>cis</i> -β- caroteno	benzeno	-----	1,1 x 10 ¹⁰	-----	Conn <i>et al.</i> , 1991
15- <i>cis</i> -β- caroteno	tolueno	-----	1,2 x 10 ¹⁰	-----	Conn <i>et al.</i> , 1991
γ-caroteno	CHCl ₃	-----	0,08 x 10 ¹⁰	-----	Conn <i>et al.</i> , 1991
γ-caroteno	EtOH/CHCl ₃ /H ₂ O (50:50:1)	-----	2,5 x 10 ¹⁰	-----	DiMascio <i>et al.</i> , 1989
bixina	CHCl ₃	-----	0,92 x 10 ¹⁰	-----	Conn <i>et al.</i> , 1991
bixina	EtOH/CHCl ₃ /H ₂ O (50:50:1)	-----	1,4 x 10 ¹⁰	-----	DiMascio <i>et al.</i> , 1989
bixina	AOT/hexano/H ₂ O W = 5	1,6 x 10 ⁶	-----	1,6 x 10 ¹⁰	Montenegro <i>et al.</i> , 2002
bixina	AOT/hexano/H ₂ O W = 50	1,7 x 10 ⁶	-----	1,0 x 10 ¹⁰	Montenegro <i>et al.</i> , 2002

bixina	H ₂ O (pH = 7,8) 35°C	0,9 x 10 ⁸	1,8 x 10 ¹⁰	-----	Speranza <i>et al.</i> , 1990
bixina	H ₂ O (pH = 7,8) SDS 0,1 M – 35°C	0,7 x 10 ⁸	1,1 x 10 ¹⁰	0,7 x 10 ¹⁰	Speranza <i>et al.</i> , 1990
bixina	DMF - 35°C	1,6 x 10 ⁶	2,3 x 10 ¹⁰	2,0 x 10 ¹⁰	Speranza <i>et al.</i> , 1990
bixina	DMSO - 35°C	1,4 x 10 ⁶	2,1 x 10 ¹⁰	1,5 x 10 ¹⁰	Speranza <i>et al.</i> , 1990
C ₃₀	benzeno/MeOH (4:1) – 25°C	-----	7 x 10 ⁹	-----	Foote <i>et al.</i> , 1970a
C ₃₅	benzeno/MeOH (4:1) – 25°C	-----	não mensurável	-----	Foote <i>et al.</i> , 1970a
cantaxantina	tolueno	-----	1,3 x 10 ¹⁰	-----	Conn <i>et al.</i> , 1991
cantaxantina	EtOH/CHCl ₃ /H ₂ O (50:50:1)	-----	2,1 x 10 ¹⁰	-----	DiMascio <i>et al.</i> , 1989
cantaxantina	óleo de soja /DCM/clorofila	-----	-----	1,12 x 10 ¹⁰	Jung & Min, 1991
cantaxantina	tolueno - 25°C	-----	-----	2,5 x 10 ⁸	Nielsen <i>et al.</i> , 1996
criptoxantina	EtOH/CHCl ₃ /H ₂ O (50:50:1)	-----	0,6 x 10 ¹⁰	-----	DiMascio <i>et al.</i> , 1989
crocetina	H ₂ O (pH = 7,8) 35°C	2,50 x 10 ⁸	5,5 x 10 ⁹	-----	Manitto <i>et al.</i> , 1987
crocetina	DMF - 35°C	< 0,05 x 10 ⁸	≅ 7,0 x 10 ⁹	-----	Manitto <i>et al.</i> , 1987
crocetina	DMSO - 35°C	< 0,05 x 10 ⁸	≅ 2,0 x 10 ⁹	-----	Manitto <i>et al.</i> , 1987
crocina	EtOH/CHCl ₃ /H ₂ O (50:50:1)	-----	0,11 x 10 ¹⁰	-----	DiMascio <i>et al.</i> , 1989
crocina	H ₂ O (pH = 7,4) 35°C	0,56 x 10 ⁸	1,8 x 10 ⁹	-----	Manitto <i>et al.</i> , 1987
emi-crocina	H ₂ O (pH = 7,4) 35°C	1,30 x 10 ⁸	5,1 x 10 ⁹	-----	Manitto <i>et al.</i> , 1987
isoeaxantina	óleo de soja /DCM/clorofila	-----	-----	7,39 x 10 ⁹	Lee & Min, 1990

licopeno	benzeno	-----	$1,7 \times 10^{10}$	-----	Conn <i>et al.</i> , 1991
licopeno	ciclohexano	-----	$1,9 \times 10^{10}$	-----	Conn <i>et al.</i> , 1991
licopeno	CCl ₄	-----	$1,4 \times 10^{10}$	-----	Conn <i>et al.</i> , 1991
licopeno	CHCl ₃	-----	$1,9 \times 10^{10}$	-----	Conn <i>et al.</i> , 1991
licopeno	tolueno	-----	$1,8 \times 10^{10}$	-----	Conn <i>et al.</i> , 1991
licopeno	EtOH/CHCl ₃ /H ₂ O (50:50:1)	-----	$1,75 \times 10^{10}$	-----	Conn <i>et al.</i> , 1991
licopeno	EtOH/CHCl ₃ /H ₂ O (50:50:1)	-----	$3,1 \times 10^{10}$	-----	DiMascio <i>et al.</i> , 1989
licopeno	óleo de soja /DCM/clorofila	-----	-----	$6,93 \times 10^9$	Lee & Min, 1990
licopeno	AOT/hexano/H ₂ O W = 5	$2,1 \times 10^6$	-----	$2,0 \times 10^{10}$	Montenegro <i>et al.</i> , 2002
licopeno	AOT/hexano/H ₂ O W = 50	$2,3 \times 10^6$	-----	$2,5 \times 10^{10}$	Montenegro <i>et al.</i> , 2002
luteína	CHCl ₃	-----	$1,6 \times 10^{10}$	-----	Conn <i>et al.</i> , 1991
luteína	EtOH/CHCl ₃ /H ₂ O (50:50:1)	-----	$0,8 \times 10^{10}$	-----	DiMascio <i>et al.</i> , 1989
luteína	óleo de soja /DCM/clorofila	-----	-----	$5,72 \times 10^9$	Lee & Min, 1990
luteína	AOT/hexano/H ₂ O W = 5	$1,8 \times 10^6$	-----	$1,2 \times 10^{10}$	Montenegro <i>et al.</i> , 2002
metilbixina	DMF - 35°C	$2,1 \times 10^6$	$3,0 \times 10^{10}$	$1,6 \times 10^{10}$	Speranza <i>et al.</i> , 1990
metilbixina	DMSO - 35°C	$1,0 \times 10^6$	$1,3 \times 10^{10}$	$2,2 \times 10^{10}$	Speranza <i>et al.</i> , 1990
neoxantina	AOT/hexano/H ₂ O W = 5	$1,8 \times 10^6$	-----	$0,9 \times 10^{10}$	Montenegro <i>et al.</i> , 2002
neoxantina	AOT/hexano/H ₂ O W = 50	$1,8 \times 10^6$	-----	$0,9 \times 10^{10}$	Montenegro <i>et al.</i> , 2002

norbixina	DMF - 35°C	$1,7 \times 10^6$	$1,2 \times 10^{10}$	$1,7 \times 10^{10}$	Speranza <i>et al.</i> , 1990
norbixina	DMSO - 35°C	$1,9 \times 10^6$	$1,7 \times 10^{10}$	$0,9 \times 10^{10}$	Speranza <i>et al.</i> , 1990
norbixina	H ₂ O (pH = 7,8) 35°C	$1,5 \times 10^8$	$2,3 \times 10^{10}$	-----	Speranza <i>et al.</i> , 1990
norbixina	H ₂ O (pH = 7,8)/ SDS 0,1 M – 35°C	$0,8 \times 10^8$	$0,9 \times 10^{10}$	$0,6 \times 10^{10}$	Speranza <i>et al.</i> , 1990
<i>trans</i> - metilbixina	DMF - 35°C	$2,0 \times 10^6$	$0,6 \times 10^{10}$	$0,9 \times 10^{10}$	Speranza <i>et al.</i> , 1990
<i>trans</i> - metilbixina	DMSO - 35°C	$0,8 \times 10^6$	$0,4 \times 10^{10}$	$0,4 \times 10^{10}$	Speranza <i>et al.</i> , 1990
<i>trans</i> -norbixina	DMF - 35°C	$0,8 \times 10^6$	$0,3 \times 10^{10}$	$0,8 \times 10^{10}$	Speranza <i>et al.</i> , 1990
<i>trans</i> -norbixina	DMSO - 35°C	$0,9 \times 10^6$	$0,3 \times 10^{10}$	$0,4 \times 10^{10}$	Speranza <i>et al.</i> , 1990
violaxantina	benzeno	-----	$1,6 \times 10^{10}$	-----	Conn <i>et al.</i> , 1991
violaxantina	AOT/hexano/H ₂ O W = 5	$1,0 \times 10^6$	-----	$1,0 \times 10^{10}$	Montenegro <i>et al.</i> , 2002
violaxantina	AOT/hexano/H ₂ O W = 50	$0,8 \times 10^6$	-----	$0,8 \times 10^{10}$	Montenegro <i>et al.</i> , 2002
zeaxantina	benzeno	-----	$1,2 \times 10^{10}$	-----	Conn <i>et al.</i> , 1991
zeaxantina	EtOH/CHCl ₃ /H ₂ O (50:50:1)	-----	$1,0 \times 10^{10}$	-----	DiMascio <i>et al.</i> , 1989
zeaxantina	óleo de soja /DCM/clorofila	-----	-----	$6,79 \times 10^9$	Lee & Min, 1990
zeaxantina	tolueno - 25°C	-----	-----	$0,95 \times 10^8$	Nielsen <i>et al.</i> , 1996

AOT: surfactante sulfosucinato bis (2-etilhexil) de sódio; W: total de água presente no sistema expresso como razão molar entre água e surfactante; DCM: diclorometano; SDS: sulfato dodecil de sódio; DMF: dimetilformamida; DMSO: dimetilsulfóxido.

Montenegro *et al.* (2002) estudaram o processo de desativação física e química de $O_2(^1\Delta_g)$ por vários carotenóides em micelas inversas com sensibilizador rosa de bengala. A degradação dos compostos, medida por espectrofotometria, seguiu uma cinética de primeira ordem. O valor de k_q aumentou com a extensão da cadeia de ligações duplas conjugadas, sendo que a presença de grupos substituintes na estrutura diminuiu o valor de k_q devido à maior diferença de energia entre os estados fundamentais e excitados dos carotenóides. Por outro lado, a k_r foi independente do tipo de carotenóide e 4 ordens de magnitude menor que a k_q . Foi observado também um decréscimo na k_q com o aumento do total de água presente no sistema (W = expresso como razão molar entre água e surfactante), provavelmente devido à menor acessibilidade do $O_2(^1\Delta_g)$ ao carotenóide, uma vez que com o aumento de W houve maior agregação micelar (Tabela 7).

Manitto *et al.* (1987) estudaram as constantes de desativação física e química de crocina e seus derivados em água, dimetilformamida (DMF) e dimetilsulfóxido (DMSO). Os resultados indicaram que em água, diapocarotenóides apresentaram valores de k_q ligeiramente maiores do que em solventes orgânicos (Tabela 7).

Lee & Min (1990) estudando a oxidação foto-sensitizada por clorofila na temperatura de 25°C em óleo de soja purificado concluíram que os valores de peróxidos encontrados no óleo foram menores na presença de carotenóides com 11 ou 13 ligações duplas conjugadas quando comparados com carotenóides com 10 ligações duplas conjugadas. Jung & Min (1991) realizaram um estudo semelhante e concluíram que a formação de peróxidos no óleo sob iluminação foi devido à presença de clorofila e que na presença de carotenóides houve uma redução em até 85% do valor total de peróxidos. Os valores das constantes de desativação total para os compostos estudados encontram-se na Tabela 7.

Nielsen *et al.* (1996) estudaram o estado triplete excitado de carotenóides em tolueno a 25°C. Assim como nos outros estudos, os resultados demonstraram que a menor diferença de energia entre o carotenóide no estado fundamental e excitado propicia maior eficiência na desativação de $O_2(^1\Delta_g)$. De acordo com as constantes de desativação total (Tabela 7), os carotenóides mais efetivos na desativação de $O_2(^1\Delta_g)$ foram, em ordem decrescente, cantaxantina, astaxantina, β -caroteno e zeaxantina.

Foote *et al.* (1970a) estudaram parâmetros de desativação física para *all-trans*-retinol e 2 carotenóides sintéticos (carotenos C₃₀ e C₃₅) na inibição da foto-oxigenação de 2-metil-2-penteno, sensibilizada por azul de metileno em sistema-modelo de benzeno/metanol (4:1) a 25°C. O carotenóide C₃₅ não apresentou k_q mensurável nas concentrações utilizadas e os demais carotenóides desativaram tanto O₂(¹Δ_g) quanto o sensibilizador no estado excitado (Tabela 7).

Em outro estudo, Foote *et al.* (1970b) verificaram que ocorreu isomerização do 15-*cis*-β-caroteno em *all-trans*-β-caroteno em sistema-modelo idêntico ao descrito acima (Foote *et al.*, 1970a). Houve formação de até 89% de *all-trans*-β-caroteno na presença de oxigênio ou nitrogênio. A reação não ocorreu na ausência de sensibilizador.

A fotoxidação de β-caroteno por O₂(¹Δ_g) foi estudada por Stratton *et al.* (1993) em sistema-modelo tolueno/metanol (85:15) com rosa de bengala como sensibilizador. Os produtos da reação foram isolados e analisados por CLAE em fase reversa e normal com detector de arranjo de diodos e através de espectrometria de massas e cromatografia gasosa. Os autores relataram a formação de β-apo-8'-carotenal, β-apo-10'-carotenal, β-apo-14'-carotenal e 5,8-endoperóxido β-caroteno. Parâmetros cinéticos não foram relatados pelos autores.

Em resumo, na maioria dos trabalhos, os valores de k_q foram da ordem de 10¹⁰M⁻¹.s⁻¹ para carotenóides com estruturas muito diferentes, tanto em sistemas aquosos quanto em orgânicos. Os valores apresentados na Tabela 7 também comprovam que a velocidade de desativação química (k_r) do O₂(¹Δ_g) foi sempre menor do que a física (k_q). Entretanto, é importante determinar esta velocidade, pois a degradação química implica na perda do poder corante do carotenóide. Poucos trabalhos acompanharam a degradação foto-sensibilizada dos carotenóides e produtos formados.

6. Referências

- BARBER, M. S.; HARDISSON, A.; JACKMAN, L. M.; WEEDON, B. C. L. Studies in nuclear resonance. Part IV. Stereochemistry of the bixins. **Proc. Chem. Soc.**, 61C, 1625-1630, 1961.
- BARETH, A.; STROHMAR, W.; KITZELMANN, E. HPLC and spectrophotometric determination of annatto in cheese. **Eur. Food Res. Technol.**, 215: 359-364, 2002.
- BRADLEY, D. G.; MIN, D. B. Singlet oxygen oxidation of foods. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.**, 31: 211-236, 1992.
- CARVALHO, P. R. N. Urucum – avanços tecnológicos e perspectivas. **Arch. Latinoam. Nutr.**, 49: 71S-73S, 1999.
- CHEN, B. H.; CHEN, T. M.; CHIEN, J. T. Kinetic model for studying the isomerization of α - and β -carotene during heating and illumination. **J. Agric. Food Chem.**, 42: 2391-2397, 1994.
- CONN, P. F.; SCHALCH, W.; TRUSCOTT, T. G. The singlet oxygen and carotenoid interaction. **J. Photochem. Photobiol. B: Biol.**, 11: 41-47, 1991.
- DIMASCIO, P. D.; KAISER, S. SIES, H. Lycopene as the most efficient biological carotenoid singlet oxygen quencher. **Arch. Biochem. Biophys.**, 274: 532-538, 1989.
- EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Pesquisa Estadual em Foco, Ano V, n 11, Jan/Abr 2001.
- FAO/WHO. 1970. Food Additive Series 70. 36. Geneva.
- FAO/WHO. 1976. Food Additives Serie 7. Geneva, 11 p.
- FAO/WHO. 1982. Food and Nutrition Paper 25. Rome. p. 22.
- FOOTE, C. S.; CHANG, Y.C.; DENNY, R.W. Chemistry of singlet oxygen. X. Carotenoids quenching parallels biological protection. **J. Am. Chem. Sci.**, 92: 5216-5218, 1970a.
- FOOTE, C. S.; CHANG, Y.C.; DENNY, R.W. Chemistry of singlet oxygen. XI. *Cis-trans* isomerization of carotenoids by singlet oxygen and a probable quenching mechanism. **J. Am. Chem. Sci.**, 92: 5218-5219, 1970b.
- FOOTE, C. S.; DENNY, R.W. Chemistry of singlet oxygen. VII. Quenching by β -carotene. **J. Am. Chem. Sci.**, 90: 6233-6235, 1968.

- GHIRALDINI, J. E. Produção e comercialização interna de corantes naturais para alimentos. In: **Seminário de Corantes Naturais para Alimentos**, Campinas, SP, Brasil, p. 20-25, 1989.
- GOUVEIA, J. P. G. de; MOURA, R. S. F. de; MEDEIROS, B. G. S. Determinação de algumas propriedades físicas das sementes de urucum. **Rev. Bras. Cor. Nat.**, 4: 35-38, 2000.
- HENRY, L.K.; CATIGNANI, G. L.; SCHWARTZ, S. J. Oxidative degradation kinetics of lycopene, lutein and 9-*cis* and all-*trans* β -carotene. **J. Amer. Oil Chem. Soc.**, 75: 823-829, 1998.
- INGRAM, J. S.; FRANCIS, B. J. The annatto tree (*Bixa orellana* L.) – A guide to its occurrence, cultivation, preparation and uses. **Trop. Sci.**, 11: 97-103, 1969.
- JONDIKO, I. J. O.; PATTENDEN, G. Terpenoids and an apocarotenoid from seeds of *Bixa orellana*. **Phytochem.**, 28: 3159-3162, 1989.
- JUNG, M. Y.; MIN, D. B. Effects of quenching mechanisms of carotenoids on the photosensitized oxidation of soybean oil. **J. Amer. Oil Chem. Soc.**, 68: 653-658, 1991.
- KELLY, D. R.; EDWARDS, A. A.; PARKINSON, J. A.; OLOVSSON, G.; TROTTER, J.; JONES, S.; MALIK, K. M. A.; HURSTHOUSE, M. B.; HIBBS, D. E. NMR, MS and X-ray crystal structure determination of bixin family of apocarotenoids. **J. Chem. Res. Part M: Microfiche**, 10: 2637-2645, 1996.
- KULL, D.; PFANDER, H. List of New Carotenoids. In: "Carotenoids, vol 1A: Isolation and Analysis". G. Briotn, S. Liaaen-Jensen and H. Pfander (Eds.). Birkhauser, Basel. 1995. p. 295-318.
- LANCASTER, F. E.; LAWRENCE, J. F. Determination of annatto in high-fat dairy products, margarine and hard candy by solvent extraction followed by high-performance liquid chromatography. **Food Addit. Contam.**, 12: 9-19, 1995.
- LEE, S. H.; MIN, D. B. Effects, quenching mechanism, and kinetics of carotenoids in chlorophyll-sensitized photooxidation of soybean oil. **J. Agric. Food Chem.**, 38: 1630-1634, 1990.
- MAGA, J. A.; KIM, C. H. Stability of natural colourants (annatto, beet, paprika, turmeric) during extrusion cooking. **Lebensm.-Wiss. Food Sci. Technol.**, 23: 427-432, 1990.

- MANITTO, P.; SPERANZA, G.; MONTI, D.; GRAMATICA, P. Singlet oxygen reactions in aqueous solution. Physical and chemical quenching rate constants of crocin and related carotenoids. **Tetrahedron Lett.**, 28: 4221-4224, 1987.
- MARTY, C.; BERSET, C. Degradation of *trans*- β -carotene during heating in sealed glass tubes and extrusion cooking. **J. Food Sci.**, 51: 698-702, 1986.
- MARTY, C.; BERSET, C. Factors affecting the thermal degradation of *all-trans*- β -carotene. **J. Agric. Food Chem.**, 38: 1063-1067, 1990.
- MASCARENHAS, J. M. O.; TOLEDO, M. C. F. Potential intake of annatto extracts in Brazil. Book of Abstracts of the Institute of Food Technologists Annual Meeting, Chicago, IL, USA, 1999.
- MCKEOWN, G. G.; MARK, E. The composition of oil-soluble annatto food colors. **J. Assoc. Off. Agric. Chem.**, 45: 761-766, 1962.
- MCKEOWN, G. G. Composition of oil-soluble annatto food colors.2. Thermal degradation of bixin. **J. Assoc. Off. Agric. Chem.**, 46: 790-796, 1963.
- MCKEOWN, G. G. Composition of oil-soluble annatto food colors.3. Structure of the yellow pigment formed by the thermal degradation of bixin. **J. Assoc. Off. Agric. Chem.**, 48: 835-857, 1965.
- MERCADANTE, A. Z.; PFANDER, H. Carotenoids from annatto: A review. **Agric. Food Chem.**, 2: 79-91, 1998.
- MERCADANTE, A. Z.; STECK, A.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B.; PFANDER, H.; BRITON, G. Isolation of methyl 9'*Z*-apo-6'-lycopenoate from *Bixa orellana*. **Phytochem.**, 41: 1201-1203, 1996.
- MERCADANTE, A. Z.; STECK, A.; PFANDER, H. Isolation and identification of new apocarotenoids from annatto (*Bixa orellana* L.) seeds. **J. Agric. Food Chem.**, 45: 1050-1054, 1997a.
- MERCADANTE, A. Z.; STECK, A.; PFANDER, H. Isolation and structure elucidation of minor carotenoids from annatto (*Bixa orellana* L.) seeds. **Phytochem.**, 46: 1379-1383, 1997b.
- MERCADANTE, A. Z.; STECK, A.; PFANDER, H. Three minor carotenoids from annatto (*Bixa orellana* L.) seeds. **Phytochem.**, 52: 135-139, 1999.

- MERCADANTE, A. Z. **Composition of Carotenoids from Annatto**. In: "Chemistry and Physiology of Selected Food Colorants". J. M. Ames & T. F. Hofmann (eds.). ACS Symposium Series 775, Washington. 2001. p. 92-101.
- Ministério da Saúde, Secção de legislação de alimentos. **Resolução 385, de 5 agosto, 1999**, [www.anvisa.gov.br]. 10 abril, 2003.
- MONTENEGRO, M. A.; NAZARENO, M. A.; DURANTINI, E. N.; BORSARELLI, C. D. Singlet molecular oxygen quenching ability of carotenoids in a reverse-micelle membrane mimetic system. **Photochem. Photobiol.**, 75: 353-361, 2002.
- NIELSEN, B. R.; MORTENSEN, A.; JORGENSEN, K.; SKIBSTED, L. H. Singlet versus triplet reactivity in photodegradation of C₄₀ carotenoids. **J. Agric. Food. Chem.**, 44: 2106-2113, 1996.
- PRESTON, H. D.; RICKARD, M. D. Extration and chemistry of annatto. **Food Chem.**, 5: 47-56, 1980.
- REBOUÇAS, T. N. H.; ATAÍDE, E. M.; DIAS, A. A.; RIBEIRO, A. E. L.; MOREIRA, M. L.; VILA, M. T. R.; SÃO JOSÉ, A. R. Efeito da propagação sexual e vegetativa no crescimento e produção de urucueiros (*Bixa orellana* L.). **Rev. Bras. Cor. Nat.**, 4: 7-11, 2000.
- REBOUÇAS, T. N. H.; SÃO JOSÉ, A. R. A cultura do urucum: Práticas de cultivo e comercialização, DFZ/UESB/SBCN, Vitória da Conquista, BA, 1996. 42 p.
- SÃO JOSÉ, A. R.; ATAÍDE, E. M.; REBOUÇAS, T. N. N.; HOJO, R. H.; SILVA, G. F. A.; CHAIZIVAGIANNIS, M. A. F. Estudo e conservação de germoplasma de urucueiros (*Bixa orellana* L.) no Estado da Bahia. **Rev. Bras. Cor. Nat.**, 4: 103-106, 2000.
- SCOTTER, M. J.; CASTLE, L.; APPLETON, G. P. Kinetics and yields for the formation of coloured and aromatic thermal degradation products of annatto in foods. **Food Chem.**, 74: 365-375, 2001.
- SCOTTER, M. J.; CASTLE, L.; HONEYBONE, C. A.; NELSON, C. Method development and analysis of retail foods for annatto food colouring material. **Food Addit. Contam.**, 19: 205-222, 2002.
- SCOTTER, M. J.; THORPE, S. A.; REYNOLDS, S. L.; WILSON, L. A.; STRUTT, P. R. Characterization of the principal colouring components of annatto using high

- performance liquid chromatography with photodiode-array detection. **Food Addit. Contam.**, 11: 301-315, 1994.
- SCOTTER, M. J.; WILSON, L. A.; APPLETON, G. P.; CASTLE, L. Analysis of annatto (*Bixa orellana*) food coloring formulations. 1. Determination of coloring components and colored thermal degradation products by high – performance liquid chromatography with photodiode array detection. **J. Agric. Food Chem.**, 46: 1031-1038, 1998.
- SCOTTER, M. J. Characterization of the coloured thermal degradation products of bixin from annatto and a revised mechanism for their formation. **Food Chem.**, 53: 177-185, 1995.
- SPERANZA, G.; MANITTO, P.; MONTI, D. Interaction between singlet oxygen and biologically active compounds in aqueous solution. III. Physical and chemical $^1\text{O}_2$ -quenching rate constants of 6,6'-diapocarotenoids. **J. Photochem. B: Biol.**, 8: 51-61, 1990.
- STAHL, W.; SIES, H. Physical quenching of singlet oxygen and *cis-trans* isomerization of carotenoids. **Ann. New York Acad. Sci.**, 691: 10-19, 1993.
- STILES, D. 1991. I Simpósio Internacional de Urucum, Brasil, p. 189.
- STRATTON, S. P.; SCHAEFER, W. H.; LIEBLER, D. C. Isolation and identification of singlet oxygen oxidation products of β -carotene. **Chem. Res. Toxicol.**, 6: 542-547, 1993.
- STRAUB, O. Key to Carotenoids. H. Pfander (Ed). Birkhauser, Verlag, Basel. 1987. 295 p.
- TOCCHINI, L.; BORSARELLI, C. D.; MERCADANTE, A. Z. Stability of bixin and norbixin in model-systems. A kinetic study. 13th International Carotenoid Symposium, Estados Unidos. 2002. p. 108.
- TOCCHINI, L.; MERCADANTE, A. Z. Extração e determinação, por CLAE, de bixina e norbixina em coloríficos. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, 21: 310-313, 2001.
- TOLEDO, M. C. de F. Regulamentação de uso de corantes naturais. **Arch. Latinoam. Nutr.**, 49: 67S-70S, 1999.

CAPÍTULO 2

NOVEL METHOD FOR THE DETERMINATION OF ADDED ANNATTO COLOUR IN EXTRUDED SNACK PRODUCTS

**TRABALHO ACEITO PARA PUBLICAÇÃO NA REVISTA:
“FOOD ADDITIVES AND CONTAMINANTS”**



Novel method for the determination of added annatto colour in extruded corn snack products

A. de Oliveira Rios and A. Z. Mercadante*

Department of Food Science, Faculty of Food Engineer, State University of Campinas, C.P. 6121, 13083-970 Campinas, SP, Brazil

(Received 20 January 2003; revised 17 October 2003; accepted 23 October 2003)

There is considerable interest in determining the added levels of the natural dye annatto in foods like snack products, particularly because they are mostly consumed by young people. The objective was to use response surface methodology to develop a new method to analyse annatto in extruded snacks. A pretreatment of the samples was necessary, digesting the ground sample with α -amylase at room temperature. The pigment was extracted by shaking with ethyl acetate at room temperature, eight extractions being necessary for completion extract the pigment. Lipids were removed by alkaline saponification. Under these conditions, 100% of the bixin was converted into norbixin, which was then quantified by high-performance liquid chromatography. The method had a mean recovery of 97% and a coefficient of variation for duplicate analysis of 1%. Using this method, of the 13 commercial samples analysed, a parmesan cheese-flavoured snack product showed the highest level of dye expressed as norbixin (15.5 mg kg^{-1}), whilst other brands of onion-flavoured snack products had the lowest levels (0.7 and 0.4 mg kg^{-1} , respectively).

Keywords: annatto dye, extruded snack, method, high-performance liquid chromatography (HPLC)

Introduction

Colour is considered to be the main attribute influencing the acceptance and preference of a food product,

in addition to indicating the quality by way of its proven influence on the visual aspect in the flavour identification and threshold of the sweet taste (Clydesdale 1993). Carotenoids are a class of compounds showing colouring power and these pigments have been widely used for this purpose in the food industry.

Annatto preparations are used to colour butter, cheese, bakery products, oils, ice creams, sausages, cereals and extruded products. Bixin is the predominant pigment in fat-soluble preparations, as well as in colorifico, a condiment widely used in the North Eastern region of Brazil (Tocchini and Mercadante 2001). Norbixin, obtained by saponification of bixin, is the main pigment in water-soluble preparations (Scotter *et al.* 1998, Mercadante 2001). The bixin content of fat-soluble annatto formulations ranges from 0.25 to 51.0%, depending on the form and production data (Scotter *et al.* 1998). In 25 samples of the condiment colorifico produced by seven Brazilian industries, the bixin levels varied from 1.54 to 3.54 mg g^{-1} (Tocchini and Mercadante 2001).

The potential intake of annatto extracts in Bahia State, located in the North East of Brazil, was reported to be in the range $0.097\text{--}0.14 \text{ mg kg}^{-1}$ body weight (bw), expressed as bixin/norbixin (Mascarenhas and Toledo 1999). Colorifico accounted for over 70% of the estimated intake. Although the consumption of annatto extracts in Brazil exceeds the recommended Joint Expert Committee on Food Additives (JECFA) acceptable daily intake (ADI) of $0.065 \text{ mg bixin kg}^{-1} \text{ bw}$ (FAO/WHO 1982), Brazilians have been exposed to high amounts of bixin for over a century and no related disease has been identified among the consumers. In fact, Paumgartten *et al.* (2002) reported that there was no evidence found for annatto-induced maternal or developmental toxicity and that the no observed adverse effect level (NOAEL) was determined as $> 140 \text{ mg bixin kg}^{-1} \text{ bw day}^{-1}$ in rats via oral dosing.

The quantification of pigments in snack products has become important because it allows for a revision

* To whom correspondence should be addressed.
e-mail: azm@fea.unicamp.br

of the restrictions imposed, providing useful information for the consumer, since such products are mostly consumed by youngsters who reach the limit of their ADI quicker than adults.

The objective of the present study was (1) to develop a methodology for the determination of annatto dye in extruded corn flour snack products based and (2) to apply the developed method to determine the levels of the dye in various samples of snack products. Response surface methodology was chosen for the method development stage because it can consider simultaneously many variables at different levels and determine the interactions amongst these parameters using a smaller number of experiments. Furthermore, it is possible to evaluate the importance of each individual variable.

Recently, Scotter *et al.* (2002) published a method for the determination of bixin, norbixin and their isomers in different types of foods, including extruded snacks.

Material and methods

Samples

Extruded snacks based on corn flour were obtained from the local market in Campinas, Brazil, as follows: four flavours of brand A, seven flavours of brand B and two flavours of brand C. Three batches of each sample were taken, each batch consisting of three packets. The labels on all the samples indicated the presence of the natural dye annatto. The labels also showed that the fat content varied from 16 to 28%. The contents of the three packets were blended and ground.

Preliminary tests showed that it is necessary to include a digestion step, followed by extraction of the carotenoids from the hydrolysed material, saponification of the extract and quantification. All the assays were carried out in duplicate.

Sample digestion

With the objective of hydrolysing the starch to facilitate liberation of the dye from the food matrix, the following were studied: acid hydrolysis (50% acetic acid in methanol) and enzymatic hydrolysis,

as described by Marty and Berset (1986) using α -amylase.

Pulverized sample (5 g) was weighed into a conical flask and 25 ml phosphate buffer (0.05 M, pH 7), 100 ml distilled H₂O, 10 ml hydroquinone in absolute ethanol (0.2%) and 200 μ l bacterial α -amylase (Novo Nordisk Bioindustrial do Brasil, BAN 240L) were added. The mixture was shaken at 100 rpm for 2 h at room temperature in the dark. The degree of starch hydrolysis was monitored with the addition of iodine on aliquots withdrawn at different times.

Carotenoid extraction

The effects of the factors type (ethyl acetate and methylene chloride) and volume (25 and 50 ml) of solvent, the number of extractions (three and six) and time of each extraction (10 and 20 min) were determined in eight assays using a 2^{4-1} fractional factorial design. Subsequently, a complete factorial design was carried out with the significant factors aimed at optimizing the extraction of the pigments. The response measured was the peak area of norbixin, as given by the high-performance liquid chromatography (HPLC) analysis.

All extractions were carried out at room temperature in the dark on a table shaken at 150 rpm. To facilitate separation of the liquid and solid phases, 25 ml 20% NaCl were added and the mixture filtered through glass wool. The organic phase was separated from the aqueous phase in a separating funnel after three successive rinses with distilled water. The extract was concentrated to about 10 ml in a rotary evaporator ($T \leq 30^\circ\text{C}$).

Extract saponification

The best conditions for extract saponification were evaluated with the objective of eliminating lipids from the samples. Since bixin is transformed into norbixin in an alkaline environment, another objective was to obtain 100% conversion. In this case, the advantages were the use of a single standard and a shorter elution time of the norbixin on the HPLC reversed-phase column.

At room temperature, a 2^{4-1} fractional factorial design was used to verify the effects of the following

factors: saponification time (20 and 24 h), shaking (presence or absence), nitrogen (presence or absence) and final amount of KOH (10 and 20%) in the solution composed of 10 ml methanolic KOH and 10 ml carotenoid extract in ethyl acetate. For the hot saponification, the same factors and quantities of extract were studied, decreasing the saponification time (20 and 40 min) and using two temperature levels (50 and 70°C), by way of a 2^{5-1} fractional factorial design.

To optimize this step, a complete factorial design was carried out with the significant factors. All the responses were measured by HPLC and expressed as a function of the percentage of norbixin area in relation to total area (norbixin + bixin areas). After saponification, 200 ml ethyl acetate/diethyl ether (1:1) and acetic acid to a pH of about 3.5 were added to the total amount of the mixture methanolic KOH and extract. Successive rinsing with distilled water (about six times) was carried out in a separating funnel to remove the alkali and acid. Anhydrous Na_2SO_4 was then added to remove residual water, and the extract was concentrated in a rotary evaporator, dried under N_2 and stored in the freezer.

Quantification

Using the optimized method to prepare the carotenoid extract, the extract was quantified both by HPLC and by direct measurement of absorbance in a spectrophotometer.

High-performance liquid chromatography (HPLC)

Carotenoid analysis was carried out using a Waters HPLC equipped with a photodiode array detector (Waters, model 996). The equipment also included an on-line degasser, a Rheodyne injection valve with a 20- μl loop and an external oven. Data acquisition and processing were performed using Millennium Waters software. For all samples, the carotenoid separation was carried out using a C_{18} Spherisorb ODS-2 column, 150×4.6 mm i.d. (3 μm particle size) with a mobile phase of acetonitrile/2% aqueous acetic acid (65:35) and a flow rate of 1 ml min^{-1} (Scotter *et al.* 1994), with the column temperature set at 29°C. The chromatograms were processed at 450 nm and the spectra were recorded at between 250 and 600 nm.

Bixin and norbixin were identified according to the elution order from the reversed phase column and their ultraviolet (UV)-visible spectra. For the external standardization, the calibration curve for norbixin was constructed with seven levels of concentration in the range $10.4\text{--}31.1 \mu\text{g ml}^{-1}$, each in duplicate. Carotenoid quantification was done by comparison of the peak area of the samples with that of the standard, injected daily.

The norbixin standard was obtained according to Tocchini and Mercadante (2001). Briefly, the carotenoids were extracted using a mixture of methanol/methylene chloride (1:1) from annatto seeds previously washed with petroleum ether. After evaporation of the methylene chloride, a 10% methanolic solution of KOH was added to the extract to saponify the bixin, thus producing norbixin. This mixture was neutralized by the addition of acetic acid, precipitating the salt of norbixin, which was collected by filtration. Finally, the norbixin was purified on a silica gel column, with a purity of 93% as determined by HPLC. The dry carotenoid extract was dissolved in methanol/acetonitrile (1:1) immediately before injection.

UV/visible spectrophotometry

The methodology developed by Lara (1984) for quantification of water-soluble extracts of annatto was used. Briefly, the standard or extract was dissolved in a 0.5% aqueous solution of KOH and the absorbance measured at a fixed wavelength (453 nm). The concentration was calculated using an absorption coefficient ($A^{1\%}_{1\text{cm}}$) of 3473 (FAO/WHO 1981).

Evaluation of the methodology

Since no certified reference material for norbixin or bixin in the matrix under study is available, the accuracy of the method was evaluated through recovery by addition of norbixin at four levels (5.2, 10.4, 20.7 and $31.1 \mu\text{g}$) to 5 g of the ground sample. The precision was given from the coefficients of variation between duplicates.

The limits of detection (LOD) and of quantification (LOQ) were determined according to the methodology described by Long and Winefordner (1983).

Statistical analysis

The experimental designs were analysed by the response surface methodology using the Statistic 5.0 software (Statsoft 1995). The analysis of variance (ANOVA) was used to compare the HPLC and spectrophotometric quantification methods, and the three batches of the same brand, also using the Statistic 5.0 software.

Results and discussion

Sample digestion

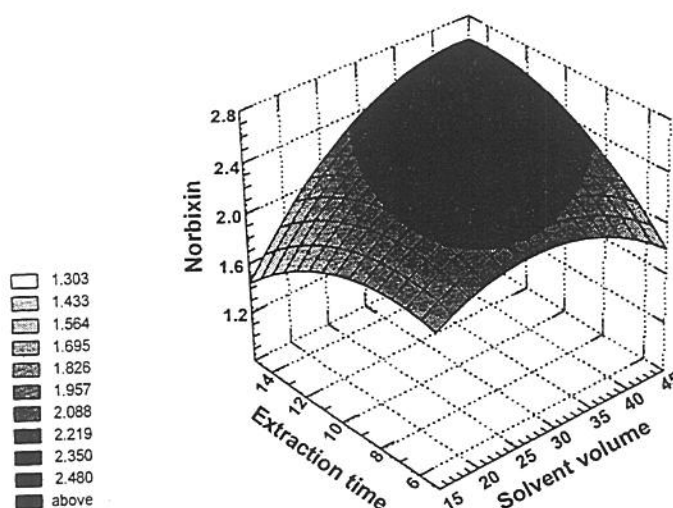
Using acetic acid, the starch was not completely hydrolysed. Total hydrolysis of the starch of the snack product was achieved using the method of Marty and Berset (1986) and thus this approach was chosen. According to the manufacturer's instructions, the best conditions for the activity of the α -amylase is at neutral pH at 70°C. The method of Marty and Berset uses a neutral pH at room temperature, which, although the temperature is not the optimum for enzymatic activity, avoids the possible thermal degradation of the carotenoids at high temperature. Therefore, other time/pH conditions were not evaluated in the present study.

Optimization of the carotenoid extraction conditions

The analysis of the results of the fractional factorial design assays (data not shown) showed that the effects of type and volume of solvent and the number of extractions were all significant ($p < 0.05$). Ethyl acetate was more efficient than methylene chloride in the extraction of the annatto dye and consequently was chosen as the solvent to obtain the optimum extraction conditions by way of a 2^3 complete factorial design with three central and six axial points. Since solvent volume and extraction time both had a negative effect, the initial levels were decreased from 25 and 50 to 15 to 45 ml solvent and the time of extraction from 10 and 20 to 5 to 15 min. On the other hand, the number of extractions had a positive effect and consequently the number of extractions was increased from three and six times to four to eight times.

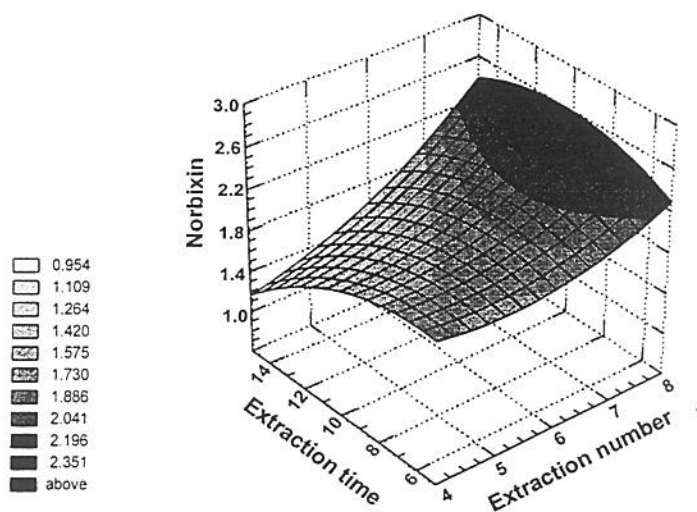
From an analysis of the responses from the complete factorial design, all the factors studied were shown to be significant ($p < 0.05$), the effects of solvent volume and number of extractions being positive and the time of extraction negative (results not shown). From the valid ANOVA, response surfaces were generated for the interactions between the factors (figures 1–3).

The optimum conditions for extraction (figure 1) were obtained when using 30 ml ethyl acetate and an extraction time of 10 min, corresponding to the central points studied in the design. Figures 2 and 3 showed



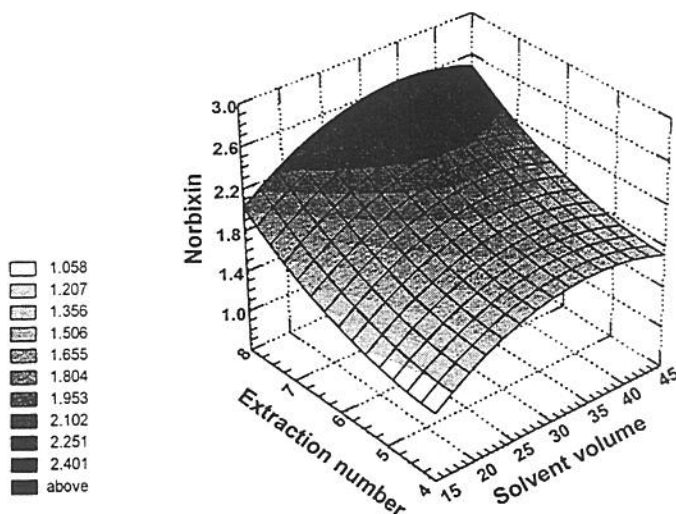
2

Figure 1. Response surface for the relative area of norbixin as a function of the solvent volume (ml) and extraction time (min).



2

Figure 2. Response surface for the relative area of norbixin as a function of the extraction number and extraction time (min).



2

Figure 3. Response surface for the relative area of norbixin as a function of solvent volume (ml) and extraction number.

that the greatest yields of pigment were obtained when eight successive extractions were performed.

Optimization of the conditions for extract saponification

The responses of the fractional factorial design assays were of the same magnitude for all the factors studied at both range of temperatures (data not shown).

When energy was added to the process, the saponification time considerably decreased and thus a temperature greater than room temperature was chosen to attain the optimum saponification conditions in a shorter time of analysis.

In fact, the statistical analysis proved that only the concentration of KOH presented a significantly positive effect. The other factors studied, time/temperature binomial, shaking and the presence of nitrogen, were not significant in the evaluated ranges

6

A. de Oliveira Rios and A. Z. Mercadante

(data not shown). Since the conversion of bixin to norbixin only reached about 20% within the evaluated range, the following variables were fixed: with shaking, the smallest saponification time (20 min) and without nitrogen and a new 2^2 complete factorial design was carried out increasing the KOH concentration and maintaining the same temperature range of 50–70°C.

The responses from this later factorial planning generated the response surface (figure 4) and were also used to calculate the codified empirical model for the conversion of bixin to norbixin (equation 1), with $R^2=0.96$. Figure 4 shows that as the KOH percentage increased, the ratio of norbixin/bixin also increased. However, when the temperature was raised, the ratio remained almost constant. In fact, this design confirmed again that the KOH concentration was the most important factor for saponification:

$$\text{Norbixin (\%)} = [31.05 + (12.31 \times \% \text{KOH}) - (2.59 \times \% \text{KOH} \times \text{temperature})] \quad (1)$$

Applying equation (1) with the factor temperature fixed at the lowest level (50°C), it would be necessary to use 52.5% KOH in the solution to obtain 100% conversion of the bixin to norbixin. This result was confirmed experimentally with new trials varying the final KOH from 45 to 70%. Total conversion of the

bixin into norbixin was obtained when the final KOH concentration varied from 52.5 to 70%.

Considering that the amount of annatto dye and lipids can vary considerably from one sample to another, the use of 35 ml 35% KOH in methanol was chosen, corresponding to a final %KOH of 62.5%, as a margin of security. After optimization, total conversion of bixin to norbixin was achieved by adding 35 ml 35% methanolic solution of KOH to 10 ml extract and shaking during 20 min at 50°C. It is important to note that compared with saponification at room temperature, no additional isomers of bixin and norbixin were formed in the range of higher temperature within the reaction time.

Quantification

The norbixin contents of the extracts, obtained using the developed method, from the three differently flavoured samples, quantified simultaneously by HPLC and spectrophotometrically, are presented in table 1.

For all the samples, the levels of norbixin were significantly higher when measured by UV/visible spectrophotometry. This result was already expected since in this case there was no separation between the annatto dye and the natural carotenoids of the corn, or even between the chlorophyll added to brand C.

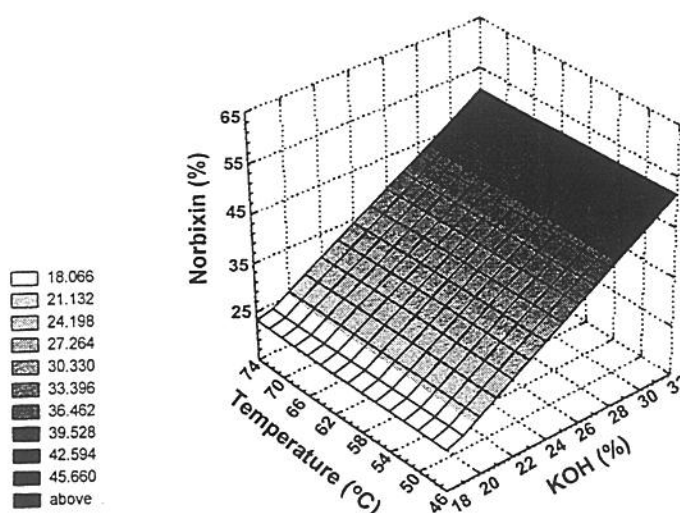


Figure 4. Response surface for the per cent of norbixin area in relation to total area as a function of temperature and per cent KOH.

Determination of added annatto colour in extruded corn snack products

7

Table 1. Norbixin contents in snacks as determined by HPLC and UV-visible spectrophotometry.

Brand—batch	Norbixin (mg kg ⁻¹ sample)	
	HPLC	UV-visible
A—1	15.1 ± 0.3 ^a	27.5 ± 0.1 ^b
A—2	15.6 ± 0.1 ^a	29.3 ± 0.1 ^b
A—3	15.4 ± 0.1 ^a	28.2 ± 0.5 ^b
B—1	3.6 ± 0.0 ^a	18.5 ± 1.3 ^b
B—2	5.1 ± 0.0 ^a	23.1 ± 0.2 ^b
B—3	7.2 ± 0.1 ^a	28.2 ± 1.7 ^b
C—1	0.4 ± 0.0 ^a	24.8 ± 0.7 ^b
C—2	0.3 ± 0.0 ^a	24.2 ± 0.9 ^b
C—3	0.2 ± 0.0 ^a	21.5 ± 0.1 ^b

Values on the same line with different letters are significantly different ($p \leq 0.01$).

The extract was applied on silica gel plate using petroleum ether/diethyl ether (9:1) as mobile phase and the presence of β -carotene, coming from the corn, in the extracts was confirmed. This fact justifies the higher values found when the samples were analysed by spectrophotometric measurement of the total extract.

Method performance

The scheme for the method developed and optimized is shown in figure 5.

The accuracy of the method was shown by the recoveries found between 96 and 98%. This recovery value is greater than that of 61% obtained in the method reported by Scotter *et al.* (2002) for extruded snacks. The mean for the coefficient of variation (CV) between duplicates was 1.13% and the variation between injections was even lower, with 1.06%, demonstrating the good precision of the developed method. Scotter *et al.* reported variability of 6% between eight replicate analyses of spiked samples.

The LOD and LOQ obtained for norbixin were 1.25×10^{-2} and 4.17×10^{-2} mg kg⁻¹, respectively. These values were similar to those reported by Scotter *et al.* (2002) since the method developed for annatto presented an LOD = 0.01 mg kg⁻¹ and an LOQ = 0.1 mg kg⁻¹. Tocchini and Mercadante (2001), using a method involving successive dilutions, found an LOQ = 1.7×10^{-2} mg kg⁻¹ for norbixin.

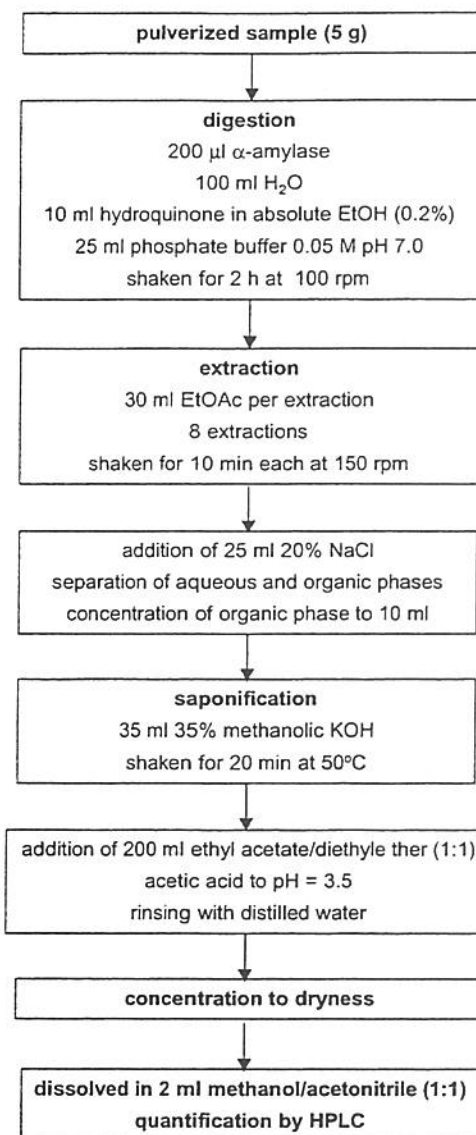


Figure 5. Schematic flow sheet of the method developed and optimized.

Annatto dye contents, expressed as norbixin, in commercial extruded snacks

Table 2 presents the levels of norbixin found in the 13 samples analysed. The levels of the dye varied from 15.5 mg kg⁻¹ for the Parmesan cheese-flavoured snacks from brand A to 0.2 mg kg⁻¹ for the onion-flavoured snacks from brand C. This difference could

Table 2. Norbixin contents (mg kg^{-1} sample) in extruded snacks.

Brands—flavours	Batch 1	Batch 2	Batch 3
A—Cheddar cheese	6.0 ± 0.2^a	6.1 ± 0.0^a	6.1 ± 0.0^a
A—Parmesan cheese	15.1 ± 0.3^a	15.5 ± 0.1^a	15.4 ± 0.1^a
A—Swiss cheese	1.5 ± 0.0^a	1.4 ± 0.0^a	1.5 ± 0.0^a
A—Cream cheese	12.6 ± 0.4^a	12.8 ± 0.3^a	13.0 ± 0.3^a
B—Onion	0.7 ± 0.0^a	0.7 ± 0.0^{ab}	0.8 ± 0.0^b
B—Barbecue	3.7 ± 0.1^a	4.5 ± 0.1^b	4.7 ± 0.1^b
B—Pizza	3.6 ± 0.0^a	5.1 ± 0.0^b	7.2 ± 0.1^c
B—Ham	6.7 ± 0.1^a	8.4 ± 0.3^b	8.6 ± 0.3^b
B—Cheddar cheese	2.0 ± 0.0^a	2.0 ± 0.0^a	2.0 ± 0.0^a
B—Parmesan cheese	1.8 ± 0.0^a	1.9 ± 0.0^a	2.3 ± 0.1^b
B—Provolone cheese	4.8 ± 0.1^a	4.7 ± 0.1^a	4.6 ± 0.1^a
C—Onion	0.4 ± 0.0^c	0.3 ± 0.0^b	0.2 ± 0.0^a
C—Cheese	1.1 ± 0.0^a	1.5 ± 0.0^b	1.7 ± 0.0^c

Values on the same line with different letters are significantly different ($p \leq 0.01$).

be perceived visually, since the Parmesan and cream cheese-flavoured samples presented a yellow colour, whereas the onion-flavoured samples were green. Figures 6 and 7 illustrate this fact, representing the chromatogram of the Parmesan-flavoured snack from brand A and the onion-flavoured snack from brand C, which contained other coloured compounds.

For brand A, there was no significant difference between the batches for all the flavours analysed. This fact indicates a standardization on the part of the industry, offering products to the consumer with a uniform visual aspect. Of the seven flavours of brand B, only the Cheddar and Provolone cheese-flavoured batches did not have significant differences. The results also indicated that the industry responsible for brand C had poorly standardized the amount of dye added, since there was a significant difference between the batches of all the flavours analysed.

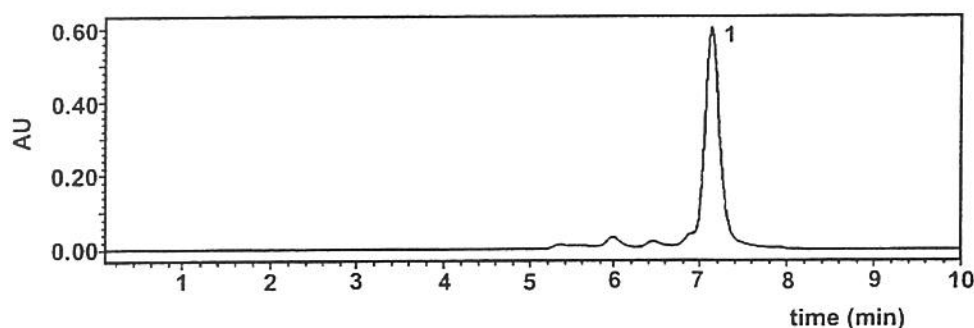


Figure 6. Chromatogram obtained by HPLC of the extract of brand A, cheese-flavoured snack. Peak 1, norbixin. For chromatographic conditions, see the text.

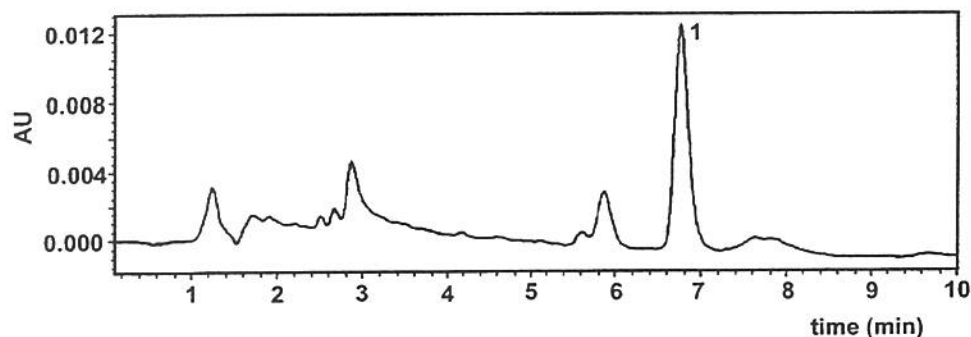


Figure 7. Chromatogram obtained by HPLC of the extract of brand C, onion-flavoured snack. Peak 1, norbixin. For chromatographic conditions, see the text.

Tocchini and Mercadante (2001) found variations of up to three times in the concentration of annatto carotenoids between brands and batches of colorífico commercialized by seven Brazilian industries.

Conclusions

The use of response surface methodology enabled us to establish the best conditions for the extraction of annatto dye from extruded snack products and to develop the subsequent saponification step. The method developed in the present study for extruded snack products showed better accuracy and precision compared with the method reported by Scotter *et al.* (2002), that separately quantified bixin and norbixin. However, both methods involve many steps and are time consuming.

The amount of dye added was not stated on any of the labels. However, the amounts found in the samples analysed were all below the maximum limits permitted by Brazilian legislation (Ministério da Saúde 1999) for cereal-based foods (25 mg kg^{-1}). Based on the amounts of norbixin found in the samples analysed and the ADI of $0.065 \text{ mg kg}^{-1} \text{ bw}$ established by JECFA for annatto dye, it is to be expected that a child weighing 20 kg would exceed the ADI by consuming a packet of a snack product weighing 83 g or more. Considering this observation, it is recommended that competent authorities and other organizations should re-evaluate the currently approved use of this dye to guarantee consumption within the value recommended as safe.

Acknowledgements

The authors are grateful to FAPESP for financial support and to CAPES for a scholarship to A. d. O. R.

References

- CLYDESDALE, F. M., 1993, Color as a factor in food choice. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **33**, 83–101.
- FAO/WHO, 1981, *Specifications for the Identity and Purity of Food Colors*. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (Rome: FAO).
- FAO/WHO, 1982, *Food and Nutrition Paper 25* (Rome: FAO).
- LARA, W. H. (editor), 1984, *Monografias de Corantes Naturais para Fins Alimentícios. Padrões de Identidade e Qualidade* (São Paulo), pp. 22–29.
- LONG, G. L., and WINEFORDNER, J. D., 1983, Limit of detection, a closer look at the IUPAC definition. *Analytical Chemistry*, **55**, 712–724.
- MARTY, C., and BERSET, C., 1986, Degradation of *trans*- β -carotene during heating in sealed glass tubes and extrusion cooking. *Journal of Food Science*, **51**, 698–702.
- MASCARENHAS, J. M. O., and TOLEDO, M. C. F., 1999, Potential intake of annatto extracts in Brazil. Book of Abstracts of the Institute of Food Technologists Annual Meeting, Chicago, IL, USA.
- MERCADANTE, A. Z., 2001, Composition of carotenoids from annatto. *Chemistry and Physiology of Selected Food Colorants*, edited by J. M. Ames and T. F. Hofmann (Washington, DC: ACS), pp. 92–101.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1999, Resolution 385 of 5 August 1999 (available at <http://www.anvisa.gov.br>). Section Legislation, Foods.
- PAUMGARTEN, F. J. R., DE-CARVALHO, R. R., ARAUJO, I. B., PINTO, F. M., BORGES, O. O., SOUZA, C. A. M., and KURIYAMA, S. N., 2002, Evaluation of the developmental toxicity of annatto in the rat. *Food and Chemical Toxicology*, **40**, 1595–1601.
- SCOTTER, M. J., CASTLE, L., HONEYBONE, C. A., and NELSON, C., 2002, Method development and analysis of retail foods for annatto food colouring material. *Food Additives and Contaminants*, **19**, 205–222.
- SCOTTER, M. J., THORPE, S. A., REYNOLDS, S. L., WILSON, L. A., and STRUTT, P. R., 1994, Characterization of the principal colouring components of annatto using high performance liquid chromatography with photodiode-array detection. *Food Additives and Contaminants*, **11**, 301–315.
- SCOTTER, M. J., WILSON, L. A., APPLETON, G. P., and CASTLE, L., 1998, Analysis of annatto (*Bixa orellana*) food coloring formulations. 1. Determination of coloring components and colored thermal degradation products by high-performance liquid chromatography with photodiode-array detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **46**, 1031–1038.
- STATSOFT, 1995, *Statistica for Windows — Computer Program Manual* (Tulsa: Statsoft, Inc.).
- TOCCHINI, L., and MERCADANTE, A. Z., 2001, Extração e determinação, por CLAE, de bixina e norbixina em coloríficos. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, **21**, 310–313.

CAPÍTULO 3

APLICAÇÃO DE CLAE PARA ACOMPANHAR A CRISTALIZAÇÃO DE BIXINA E A OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE SUA EXTRAÇÃO E SAPONIFICAÇÃO EM “SNACKS” EXTRUSADOS

**TRABALHO ENVIADO PARA PUBLICAÇÃO NA REVISTA DO:
“INSTITUTO ADOLFO LUTZ”**

RESUMO

A escolha do método de análise de corante natural de urucum depende do tipo de matriz alimentícia que influencia as etapas iniciais de um procedimento analítico tais como extração e saponificação. Para quantificação por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é necessário o uso de padrões que às vezes não estão disponíveis comercialmente. Os objetivos deste trabalho foram acompanhar por CLAE em fase reversa com detector de arranjo de diodos o isolamento de padrão de bixina e de norbixina com alto teor de pureza e verificar a influência de diferentes condições na extração de bixina de “snacks” extrusados e sua conversão em norbixina durante a saponificação. Através de cristalizações sucessivas foram obtidos cristais de bixina com 98% de pureza e norbixina purificada por coluna de sílica-gel com pureza de 93%. As condições de extração e saponificação foram estudadas através de planejamento experimental fatorial e as respostas obtidas por CLAE. Os cromatogramas evidenciaram que o melhor solvente para extração foi acetato de etila e que volume de solvente e tempo de extração não apresentaram influência significativa, entretanto foi necessário o uso de 8 extrações sucessivas para completa extração dos pigmentos. Na saponificação, o monitoramento por CLAE mostrou ser necessário adicionar 35 mL de KOH 35% metanólico com agitação a 50°C por 20 minutos para obter 100% de conversão de bixina em norbixina.

Palavras-chave: corante, urucum, snacks extrusados, bixina, norbixina, CLAE.

Application of HPLC to follow bixin crystallization and optimization of the conditions for its extraction and saponification from extruded snacks

SUMMARY

The choice of analytical method for the determination of natural annatto colorant depends on the type of food matrix, since this influences the initial steps in the analytical process such as extraction and saponification. For quantification by high performance liquid chromatography (HPLC) it is necessary to use standards that are not always commercially available. This study aimed at using reversed phase HPLC with photodiode array detector to follow the isolation of bixin and norbixin standards with high purity levels, and to evaluate the influence of different conditions on bixin extraction from extruded snacks and their conversion to norbixin during saponification. Bixin crystals with 98% purity were obtained by crystallization, and the norbixin standard was purified on a silica-gel column, achieving 93% purity. Experimental factorial design were used to study the sample extraction and saponification conditions and the responses obtained by HPLC. The chromatograms showed that ethyl acetate was the best solvent for extraction whilst solvent volume and extraction time showed no significant influence. However for complete extraction, 8 successive extractions were necessary. For saponification, HPLC monitoring showed that it was necessary to use 35 mL of 35% methanolic KOH at 50°C, with stirring for 20 min, to obtain 100% conversion of bixin to norbixin

Key-words: colorant, annatto, extruded snacks, bixin, norbixin, HPLC.

INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, o corante natural de urucum tem sido extensivamente utilizado pelas indústrias de alimentos para colorir diversos produtos como massas alimentícias, produtos extrusados, cereais matinais, produtos de panificação, gelados comestíveis, sobremesas, molhos e condimentos¹¹.

O corante de urucum é extraído das sementes do urucueiro *Bixa orellana* L., uma planta nativa da América Tropical e o Brasil é um dos maiores produtores e exportadores de suas sementes⁵. Para uso industrial o corante é comercializado na forma de pó e como preparações lipossolúveis e hidrossolúveis.

A semente de urucum apresenta um pericarpo rico em bixina, sendo este pigmento pertencente à classe dos carotenóides. A bixina (metil hidrogênio 9'-*cis*-6,6'-diapocaroteno-6,6'-dioato) (Figura 1) é um diapocarotenóide ($C_{25}H_{30}O_4$) com configuração *cis*^{1,7}, solúvel em solventes orgânicos sendo o pigmento predominante nas sementes¹², nas preparações comerciais lipossolúveis de urucum⁹ e em colorífico¹⁸.

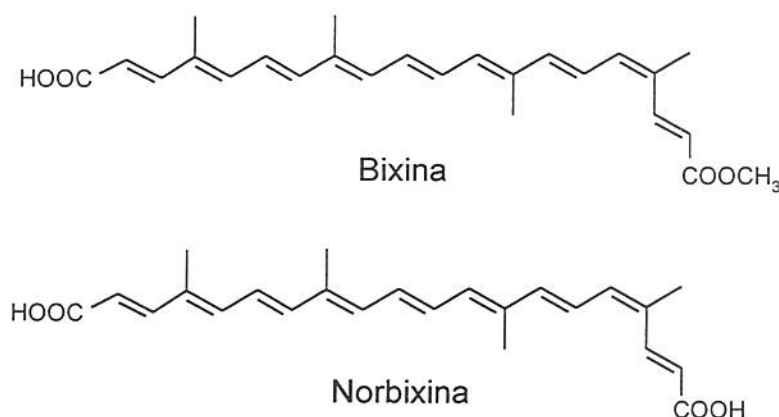


Figura 1. Estrutura da bixina e da norbixina.

A norbixina (9-*cis*-6,6'-diapocaroteno-6,6'-dioato) (Figura 1) é encontrada em pequena quantidade nas sementes e pode ser obtida pela saponificação da bixina em meio alcalino. Este pigmento também é um diapocarotenóide com configuração *cis* ($C_{24}H_{28}O_4$)⁷, porém solúvel em solventes polares e o pigmento principal das preparações hidrossolúveis⁹.

Os carotenóides totais de urucum podem ser determinados no extrato total através de leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda máximo de absorbância ($\lambda_{\max}$)². Porém, como os isômeros apresentam $\lambda_{\max}$ próximos aos do carotenóide original, torna-se praticamente impossível verificar a presença de isômeros através da simples leitura do extrato total em espectrofotômetro. Atualmente a técnica que utiliza cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é a mais indicada para separação desses compostos.

Em todos os trabalhos a seguir, os pigmentos foram separados e quantificados por CLAE em coluna de C₁₈.

Lancaster e Lawrence⁸ analisaram os pigmentos de urucum em produtos como margarina, manteiga e queijos. A extração exaustiva dos pigmentos foi realizada com etanol/água/hidróxido de amônio concentrado (29,7% NH₃) e éter de petróleo. Devido à extração em meio alcalino a bixina foi convertida parcialmente em norbixina.

Scotter et al.¹⁶ desenvolvendo método para determinação de corante de urucum em diversos alimentos, utilizaram para “snacks” extrusados hexano para eliminação de lipídeos. Em seguida foi também realizada extração exaustiva com etanol/água/hidróxido de amônio (100:35:15 v/v/v) com conversão parcial de bixina em norbixina.

Tocchini e Mercadante¹⁸ quantificaram os teores de bixina e norbixina em várias marcas e lotes de colorífico. Os carotenóides foram extraídos com acetona e metanol com uso de ultra-som.

Deste modo, verifica-se que o tipo de extração na análise de carotenóides de urucum dependeu da composição e complexidade da matriz alimentícia, tornando importante o estudo da influência de diferentes condições na extração do corante de urucum.

Levando em consideração que a ingestão diária aceitável (IDA) para o extrato de urucum é de 0,065 mg/kg de peso corpóreo⁴, e os “snacks” são consumidos principalmente pelo público infantil que atinge mais rapidamente o limite de IDA, há necessidade de se estudar uma metodologia para a determinação do corante neste tipo de produto.

Os objetivos do presente estudo foram acompanhar por CLAE com detector de arranjo de diodos (DAD) (1) a obtenção de padrão de bixina e de norbixina com alto teor de pureza e (2) a influência de diferentes condições na extração de bixina de “snacks” extrusados à base de farinha de milho e sua conversão em norbixina durante a saponificação.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Materiais

Sementes de urucum e uma amostra comercial de “snack” extrusado sabor queijo que possuía em sua formulação corante natural de urucum foram adquiridas no comércio de Campinas, São Paulo.

Cristais de bixina foram gentilmente cedidos pela Roche Vitamins Ltd. (Basiléia, Suíça).

2. Isolamento dos padrões

2.1. Bixina

2.1.1. Extração

A seguinte metodologia foi desenvolvida para a obtenção de um extrato com menor teor de impurezas possível, onde foram realizadas lavagens prévias das sementes de urucum com hexano e metanol para eliminação de lipídeos e compostos polares, respectivamente. Para tal, utilizou-se 25 g de sementes de urucum, que foram lavadas duas vezes com 50 mL de hexano por 15 minutos, sendo o solvente descartado. Nova lavagem foi realizada com 50 mL de metanol por 15 minutos por duas vezes, sendo as sementes filtradas e o solvente também descartado. Foram realizadas duas extrações não quantitativas dos pigmentos com 50 mL de acetato de etila cada por 15 minutos, e o extrato obtido foi seco em evaporador rotatório ($T < 30^{\circ}\text{C}$).

2.1.2. Cristalização

Após avaliar a combinação de vários solventes (acetona, acetato de etila, clorofórmio, diclorometano, etanol e metanol) para cristalização de bixina, a seguinte

metodologia foi desenvolvida. O extrato seco contendo os pigmentos foi diluído em diclorometano e adicionou-se lentamente etanol absoluto na proporção em volume de 1:4. Em seguida, a mistura foi levada para banho de gelo por 5 minutos e posteriormente colocada no congelador por uma noite. Assim, verificou-se a formação de cristais de bixina, que foram filtrados e lavados com etanol absoluto e secos em estufa a vácuo à temperatura ambiente por 24 horas. A pureza dos cristais foi verificada por CLAE e através do espectro no UV-visível da bixina obtido pelo DAD. O procedimento de cristalização foi novamente realizado para obtenção de cristais com maior teor de pureza.

Utilizou-se microscopia eletrônica de varredura para verificar a forma dos cristais. As amostras foram aspergidas sobre fita metálica adesiva de dupla face, colocadas sobre suportes metálicos e recobertas com ouro (240s/40mA) em metalizador a vácuo (Balzers). As micrografias foram obtidas no microscópio Jeol modelo T-300 sob aceleração de 15KV através de captura de imagem¹⁷.

2.2. Norbixina

O padrão de norbixina foi obtido de acordo com o procedimento descrito por Tocchini e Mercadante¹⁸. Brevemente, os carotenóides foram extraídos com uma mistura de metanol/diclorometano (1:1) a partir de sementes de urucum previamente lavadas com éter de petróleo para eliminação de lipídeos. Após evaporação do diclorometano, adicionou-se ao extrato uma solução metanólica de KOH 10% para ocorrer saponificação da bixina, originando sais de norbixina. À esta mistura foi então acrescentado ácido acético para neutralização e precipitação da norbixina que foi recolhida por filtração.

A norbixina foi purificada por coluna de sílica-gel utilizando uma coluna de 2,5 cm de diâmetro e 10 cm de altura. A coluna foi molhada com acetato de etila e o mesmo solvente foi utilizado para dissolver a amostra, acrescentando apenas algumas gotas de metanol (com a finalidade de solubilizar completamente o pigmento) e éter de petróleo para equilibrar a polaridade. Após eluição de uma banda amarela com aproximadamente 100 mL de acetato de etila, aumentou-se a polaridade do solvente acrescentando uma mistura de metanol/acetato de etila (1:1) para eliminação de uma

banda amarela mais forte que a primeira. Partiu-se então para 100% de metanol e uma faixa laranja escura rapidamente moveu-se do topo, sendo recolhida a parte intermediária da mesma. Após concentração em evaporador rotatório verificou-se pureza de 93% por CLAE.

3. Metodologia para análise de corante de urucum em “snacks” extrusados

Foi utilizado o método desenvolvido por Rios e Mercadante¹³ que consiste das seguintes etapas: digestão, extração, saponificação e quantificação por CLAE.

Resumidamente, para cada 5 g de amostra triturada, foi realizada uma digestão com 200 μ L de α -amilase bacteriana por 2 horas em temperatura ambiente. Os pigmentos foram extraídos com 30 mL de acetato de etila a 150 rpm em temperatura ambiente por 10 minutos, sendo necessário 8 extrações sucessivas. A saponificação foi realizada sob agitação com 35 mL de KOH 35% em metanol a 50°C por 20 minutos. Após lavagem para retirada do álcali, o extrato foi seco e os carotenóides analisados por CLAE¹³.

4. Cromatografia líquida de alta eficiência

Foi utilizado um cromatógrafo líquido com sistema quaternário de bombeamento de solventes (Waters), injetor “Rheodyne” de 20 μ L, forno externo com controle de temperatura, desgaseificador “on line”, DAD (Waters) e sistema de aquisição e processamento de dados Millenium (Waters).

Os carotenóides foram separados em coluna de C₁₈ Spherisorb ODS-2 (150 x 4,6 mm), com 3 μ m de diâmetro de partícula, mantida em forno a 29°C. Foi utilizada como fase móvel, ao fluxo de 1mL/min, acetonitrila/ácido acético 2% (65:35)^{15,18}. Os espectros foram adquiridos entre 250 e 600 nm e os cromatogramas processados no comprimento de onda de 450 nm.

Os extratos secos de carotenóides foram diluídos em metanol/acetonitrila (1:1) e filtrados em membrana de polietileno com 0,22 μ m de poro imediatamente antes da injeção no cromatógrafo. Todos os solventes utilizados foram grau cromatográfico e

previamente filtrados em sistema Millipore de filtração a vácuo, com membrana para solvente orgânico de 0,45 μm .

Bixina e norbixina foram identificadas segundo a ordem de eluição e comparação dos λ_{max} , estrutura fina e intensidade do pico *cis* dos espectros UV-visível, obtidos no detector de arranjo de diodos, com dados da literatura^{2,3}.

A estrutura fina (%III/II) foi determinada traçando uma linha reta no valor mínimo entre os picos de maior comprimento de onda (III) e o pico designado de λ_{max} (II), e após a medição da altura destes picos realizou-se o cálculo em porcentagem de altura pico III sobre altura do pico II. A intensidade do pico *cis* (% $A_{\text{B}}/A_{\text{II}}$) foi determinada a partir da linha de base do espectro medindo a altura do pico de λ_{max} (II) e a altura da banda de absorção a 285 nm conhecida como pico *cis* e calculando a porcentagem de altura do pico *cis* (A_{B}) sobre pico II (A_{II}).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. Cristalização de bixina

Como mostra a Figura 2 e Tabela 1, após a primeira cristalização, a bixina apresentou grau de pureza de 94%. No processo de recristalização, a pureza da bixina (pico 9) aumentou para 98%, devido à eliminação dos compostos com tempo de retenção menor que a bixina (picos de 1 a 6), e redução da intensidade dos picos 7 e 8. A Figura 3 apresenta os espectros no UV-visível dos picos referentes à Figura 2.

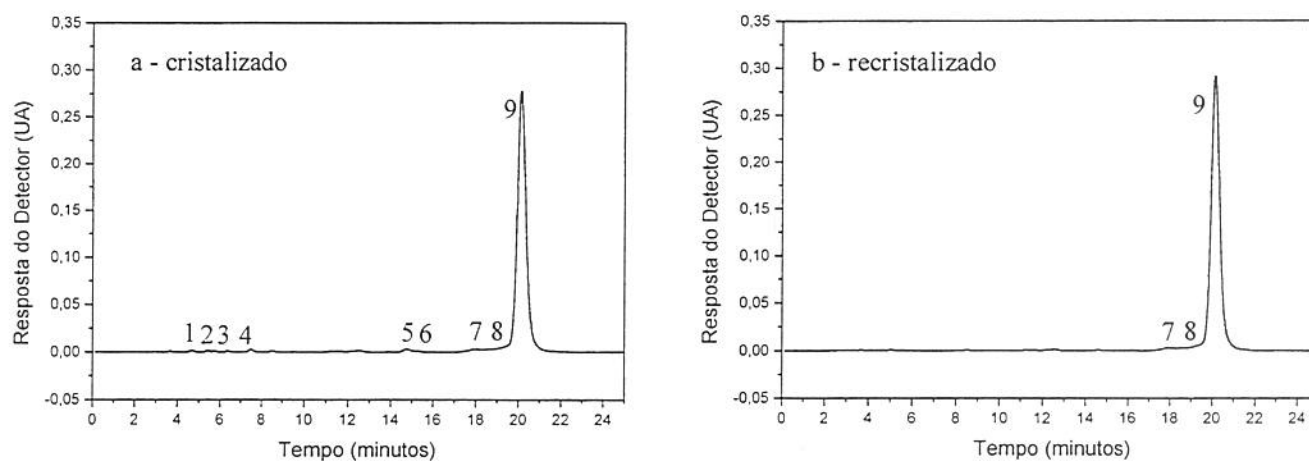


Figura 2. Cromatogramas, obtidos por CLAE, de cristais de bixina. a – cristalizada e b – recristalizada. Condições cromatográficas: coluna Spherisorb ODS-2 e como fase móvel acetonitrila/ácido acético 2% (65:35), com fluxo de 1 mL/min e temperatura da coluna mantida a 29°C. Características dos picos: vide Tabela 1.

Tabela 1. Características espectrais e quantidade (%), obtidas por CLAE, dos compostos presentes na bixina cristalizada e recristalizada.

Pico ^a	Tempo de Retenção (min)	Área (%)		$\lambda_{\max}$ (nm) ^b	III/II (%)	A_B/A_{II} (%)
		Cristalizado	Recristalizado			
1	4,7	0,17	0,00	(424), 456, 482	0	0
2	5,4	0,17	0,00	(420), 461, 489	20	15
3	5,7	0,13	0,00	(424), 454, 481	11	33
4 (norbixina)	7,5	0,36	0,00	(435), 460, 489	36	4
5	14,8	0,74	0,00	(420), 448, 474	40	15
6	15,3	0,25	0,00	(412), 430, 452	10	22
7	17,9	1,88	1,05	(428), 455, 480	15	41
8 (9- <i>cis</i> -bixina)	19,5	2,34	0,85	(428), 454, 481	15	25
9 (bixina)	20,1	93,96	98,01	(433), 461, 489	39	5

^aNumerado de acordo com os cromatogramas da Figura 2.

^bSolvente: acetonitrila/ácido acético 2% (65:35).

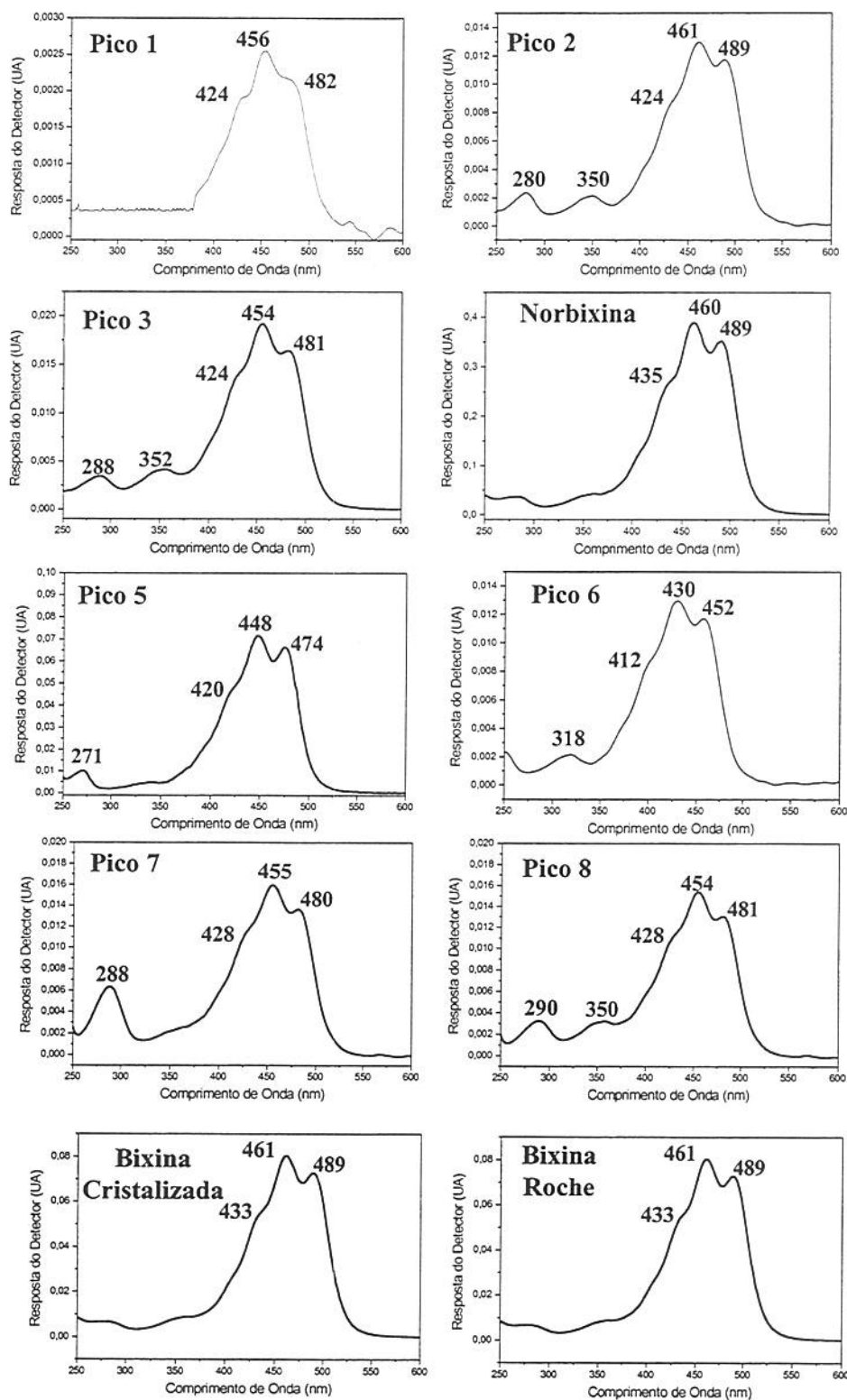


Figura 3. Espectros, obtidos através do DAD em acetonitrila/ácido acético 2% (65:35), dos carotenóides presentes nos cristais de bixina. Picos numerados de acordo com Figura 2.

Como esperado, para coluna de fase reversa, a norbixina (pico 4) que contém dois grupos ácidos, eluiu primeiramente que a bixina (pico 9) com um grupo ácido e outro éster. Além disso, o λ_{max} destes dois diapocarotenóides obtidos no presente trabalho foram iguais aos previamente relatados por Scotter et al.¹⁵, ou seja, de 460 a 461 nm para norbixina e bixina, respectivamente. Em outros solventes, λ_{max} diferentes foram relatados como 470 nm em clorofórmio¹⁵ e 456 nm em éter de petróleo para bixina² e para norbixina 453 nm em NaOH 0,1 M¹⁵.

Em relação aos espectros no UV-visível de carotenóides na forma *trans*, os espectros dos isômeros *cis* apresentam deslocamento hipsocrômico, menor grau de estrutura fina e aparecimento de uma nova banda de absorção conhecida como pico *cis*².

Considerando a ordem de eluição, os picos 1 e 3 foram caracterizados como isômeros da norbixina devido ao deslocamento hipsocrômico de 4 nm e 6 nm, perda e redução da estrutura fina respectivamente, e aparecimento do pico *cis* no composto 3. De forma análoga, os pico 7 e 8 foram tentativamente identificados como isômeros da bixina devido ao deslocamento hipsocrômico de 6 nm e 7 nm, redução da estrutura fina de 30% para 15% respectivamente, e surgimento do pico *cis* em ambos compostos.

Por comparação das características dos espectros do dimetil hidrogênio 9-*cis*, 9'-*cis*-6,6'-diapocaroteno-6,6'-dioato¹⁰, o pico 8 foi tentativamente identificado como metil hidrogênio 9-*cis*, 9'-*cis*-6,6'-diapocaroteno-6,6'-dioato (9-*cis*-bixina).

As micrografias obtidas por microscopia eletrônica dos cristais de bixina preparados no presente trabalho e do cristal cedido pela Roche Vitamins estão apresentadas na Figura 4.

Ambos cristais apresentaram formas geométricas irregulares, predominando as formas alongadas e prismáticas. Os cristais da Roche Vitamins mostraram-se maiores do que os cristais de bixina obtidos no presente estudo. Gutmann et al.⁶ também relataram que cristais de all-*trans*-metil bixina apresentaram formas geométricas semelhantes às descritas neste trabalho.

O tamanho e a forma dos cristais para o mesmo carotenóide pode variar dependendo do conjunto de solventes utilizados na cristalização. Outro fator importante é a temperatura, uma vez que durante o processo de cristalização uma redução lenta

da temperatura leva à formação de cristais de diferentes tamanhos, e um rápido resfriamento do extrato acelera o processo conduzindo à formação de cristais menores e uniformes³. Entretanto, esta comparação não pode ser feita pois não havia informação disponível sobre o processo de cristalização da bixina cedida pela Roche Vitamins.

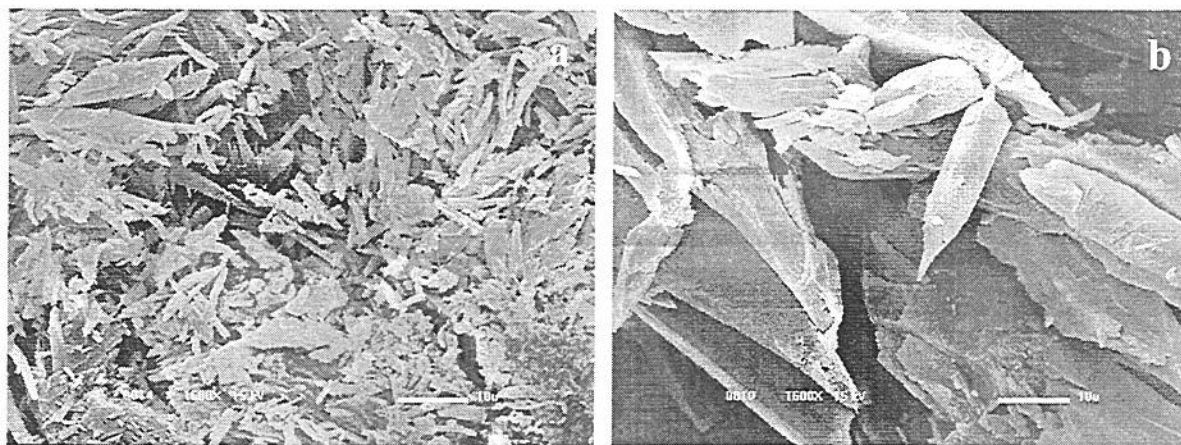


Figura 4. Micrografias, obtidas por microscopia eletrônica com aumento de 1.600 vezes, de cristais de bixina. **a** - preparado no presente trabalho e **b** - cedido pela Roche Vitamins.

2. Padrão de norbixina

O cromatograma, obtido por CLAE, do padrão de norbixina está apresentado na Figura 5. A norbixina (pico 4) apresentou pureza de 93% e presença de outros compostos, provavelmente isômeros (picos 1, 2 e 3) (Tabela 2).

O pico 3 foi tentativamente identificado como 9-*cis*, 9'-*cis*-6,6'-diapocaroteno-6,6'-dioato (9'-*cis*-norbixina) pois apresentou deslocamento hipsocrômico de 5-6 nm em relação à norbixina, diminuição da estrutura fina e aumento da intensidade do pico *cis* (Tabela 2), da mesma forma que a 9-*cis*-bixina em relação à bixina (Tabela 1).

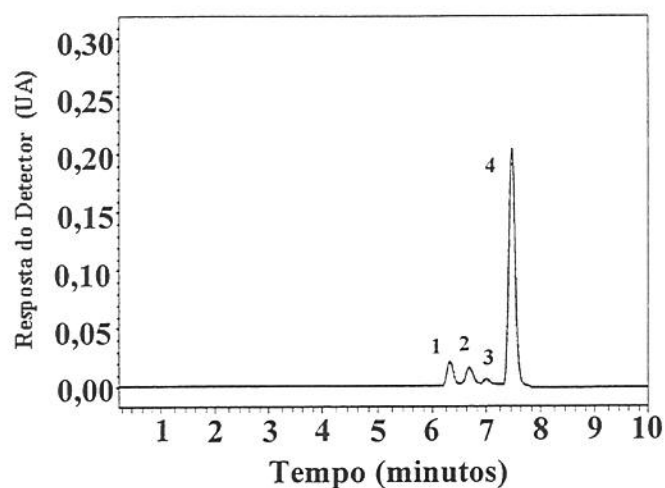


Figura 5. Cromatograma, obtido por CLAE, de padrão de norbixina. Condições cromatográficas: vide texto. Identidade dos picos: vide Tabela 2.

Tabela 2. Características espectrais, obtidas por CLAE, do padrão de norbixina.

Pico ^a	Área (%)	Tempo de Retenção (min)	λ_{max} (nm) ^b	III/II (%)	A _B /A _{II} (%)
1	2,98	6,2	(428), 455, 480	15	31
2	2,42	6,6	(424), 454, 481	11	33
3 (9'- <i>cis</i> -norbixina)	1,15	7,0	(428), 455, 482	14	24
4 (norbixina)	93,45	7,5	(435), 460, 489	36	4

^aNumerado de acordo com o cromatograma da Figura 5.

^bSolvente: acetonitrila/ácido acético 2% (65:35).

3. “Snacks” extrusados

3.1. Extração

Para extração foram estudados tipo e volume de solvente, número de extrações e tempo de cada extração através de um planejamento experimental fatorial 2^{4-1} (Tabela 3).

Tabela 3. Condições experimentais e resultados do planejamento fatorial fracionário para etapa de extração.

Ensaio	Fatores				Respostas		
	Solvente	Volume solvente (mL)	Número extrações	Tempo extração (min)	R1	R2	Média
1	EtOAc	25	3	10	3,52	3,38	3,45
2	CH ₂ Cl ₂	25	3	20	1,01	1,00	1,01
3	EtOAc	50	3	20	3,59	3,39	3,49
4	CH ₂ Cl ₂	50	3	10	1,54	1,57	1,56
5	EtOAc	25	6	20	5,21	5,48	5,35
6	CH ₂ Cl ₂	25	6	10	2,56	2,37	2,46
7	EtOAc	50	6	10	4,22	4,58	4,40
8	CH ₂ Cl ₂	50	6	20	1,80	1,88	1,84

Resposta: área do pico da norbixina

Os cromatogramas apresentados nas Figuras 6a e 6b foram obtidos, respectivamente, com 6 extrações com 50 mL de diclorometano por 20 minutos cada (ensaio 8) e 6 extrações com 50 mL de acetato de etila por 10 minutos cada (ensaio 7). Nestas condições, apesar do menor tempo de extração com acetato de etila, as respostas em área absoluta do pico de norbixina foram 1,84 e 4,40 para extração com diclorometano e acetato de etila, respectivamente. A maior quantidade de bixina extraída por acetato de etila (área de 5,35, ensaio 5) foi também verificada utilizando

um menor volume deste solvente, 25 mL em 6 extrações de 20 minutos (Figura 6c), em comparação com 50 mL de diclorometano (Figura 6a).

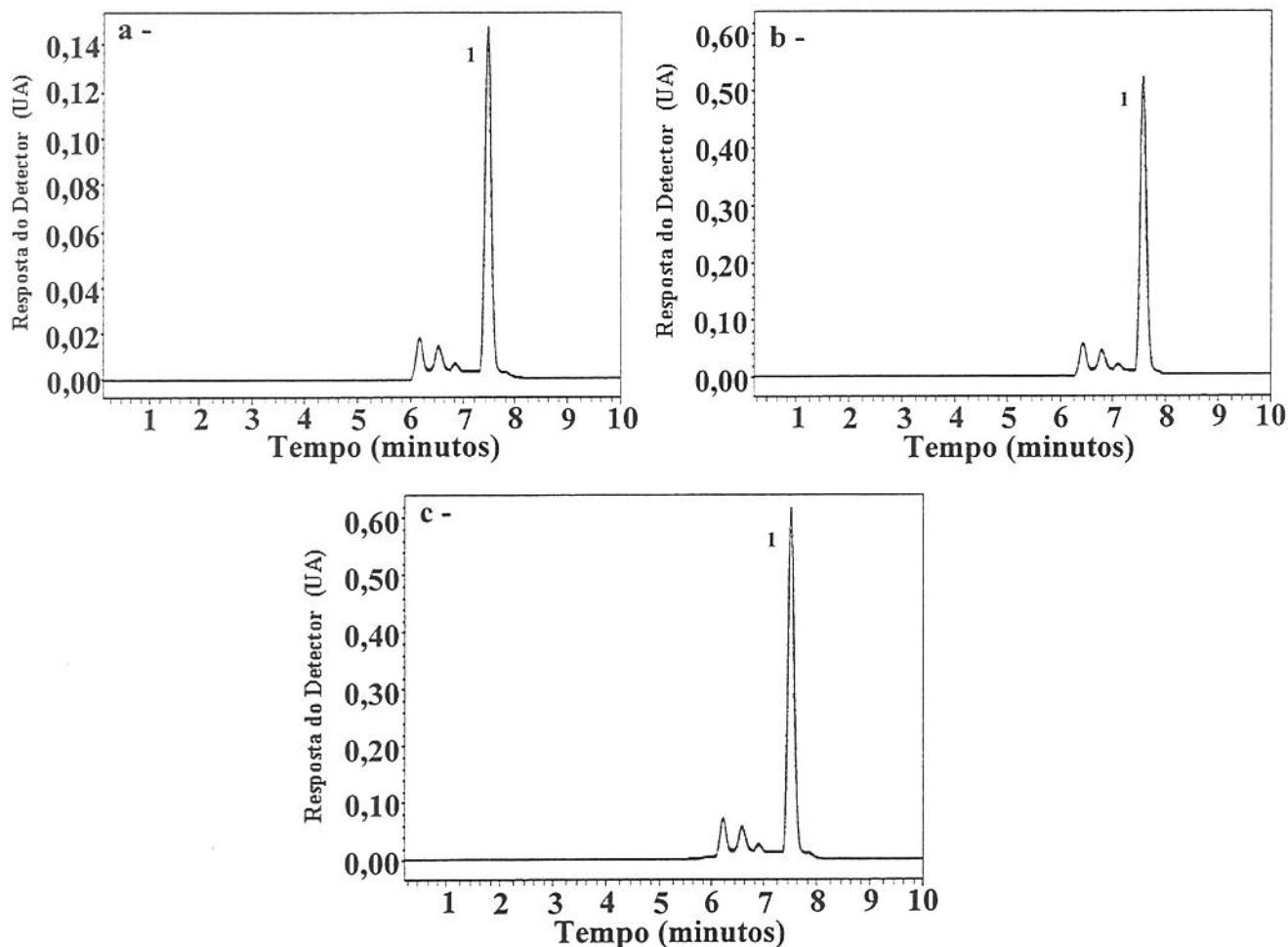


Figura 6. Cromatogramas, obtidos por CLAE, de extrato de carotenóides em “snacks” extrusados extraídos com: a – 50 mL de diclorometano, 6 extrações de 20 min cada, b – 50 mL de acetato de etila, 6 extrações de 10 min cada, c – 25 mL de acetato de etila, 6 extrações de 20 min cada, Condições cromatográficas: vide texto. Solvente de injeção: 1 mL de metanol/acetonitrila (1:1). Pico 1: norbixina.

As Figuras 7a e 7b demonstraram que volume de solvente e tempo de extração apresentaram pequeno efeito na quantidade de pigmento extraído, uma vez que obteve-se praticamente a mesma resposta em área (3,38 e 3,39) quando aumentou-se o volume de acetato de etila de 25 para 50 mL e tempo de extração de 10 para 20 minutos.

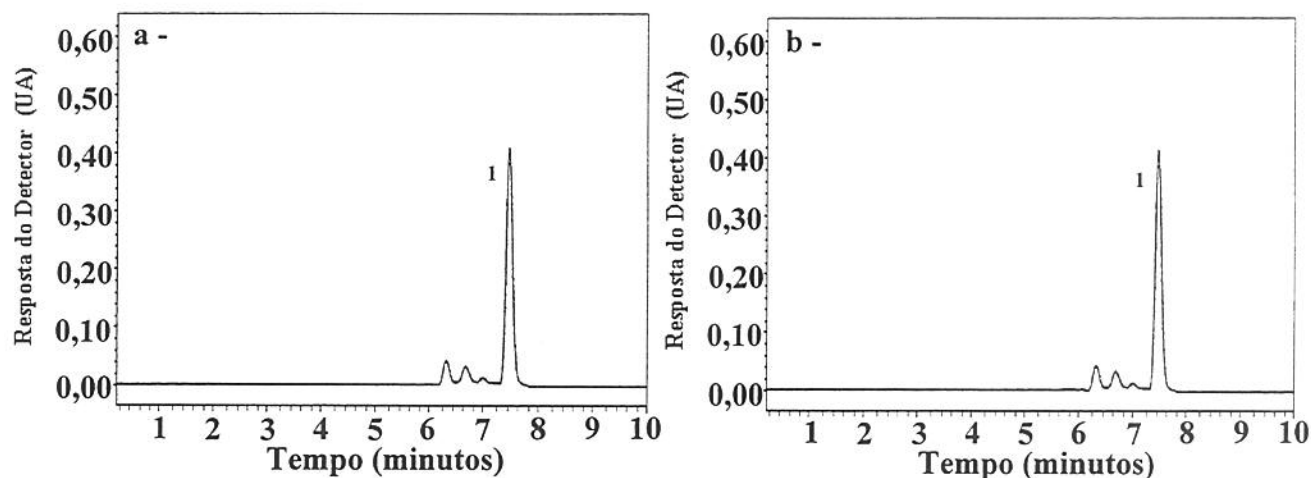


Figura 7. Cromatogramas, obtidos por CLAE, de extrato de carotenóides em “snacks” extrusados extraídos com: a – 25 mL de acetato de etila, 3 extrações de 10 min cada, b – 50 mL de acetato de etila, 3 extrações de 20 min cada. Condições cromatográficas: vide texto. Solvente de injeção: 1 mL de metanol/acetonitrila (1:1). Pico 1: norbixina.

Posteriormente, um planejamento experimental completo 2^3 foi conduzido para os fatores: acetato de etila como solvente, número de extrações e tempo de cada extração (Tabela 4).

Tabela 4. Condições experimentais e resultados do planejamento fatorial completo para etapa de extração.

Ensaio	Fatores			Respostas		
	Volume solvente (mL)	Número extrações	Tempo de extração (min)	R1	R2	Média
1	21	5	7	3,04	3,20	3,12
2	39	5	7	3,52	3,56	3,54
3	21	7	7	3,98	4,20	4,08
4	39	7	7	4,08	4,12	4,10
5	21	5	13	2,00	2,00	2,00
6	39	5	13	2,82	2,74	2,78
7	21	7	13	2,86	2,66	2,76
8	39	7	13	4,80	4,94	4,86
9	30	6	10	3,40	3,58	3,48
10	30	6	10	3,16	3,12	3,14
11	30	6	10	4,28	4,24	4,26
12	15	6	10	2,34	2,22	2,28
13	45	6	10	2,86	3,08	2,98
14	30	4	10	3,16	3,20	3,18
15	30	8	10	5,20	5,36	5,28
16	30	6	5	3,08	3,16	3,12
17	30	6	15	2,52	2,54	2,54

Resposta: área do pico da norbixina

Foi verificado que, aumentando-se o número de extrações maior quantidade de pigmento foi extraído, como mostram os cromatogramas das Figuras 8a e 8b, com áreas médias de norbixina de 3,14 com 6 extrações (ensaio 6) e de 5,28 para 8 extrações (ensaio 15), respectivamente. Através de extração exaustiva, foi verificada a não necessidade do aumento do número extrações.

As melhores condições para extração foram obtidas com 8 extrações por 10 minutos cada utilizando 30 mL de acetato de etila (ensaio 15) (Figura 8b).

Cabe ressaltar que os isômeros (picos menores nas Figuras 6 e 7) são provavelmente provenientes dos corantes comerciais utilizados pelas indústrias, aliado ao fato de que altas temperaturas são utilizadas durante o processo de extrusão dos “snacks”.

Scotter et al.¹⁴ também relataram a presença de isômeros de norbixina em amostras de corantes comerciais de bixina e norbixina. Estes isômeros estavam em quantidades diferentes em todos os corantes e os autores conectaram tal diferença aos métodos utilizados na sua obtenção.

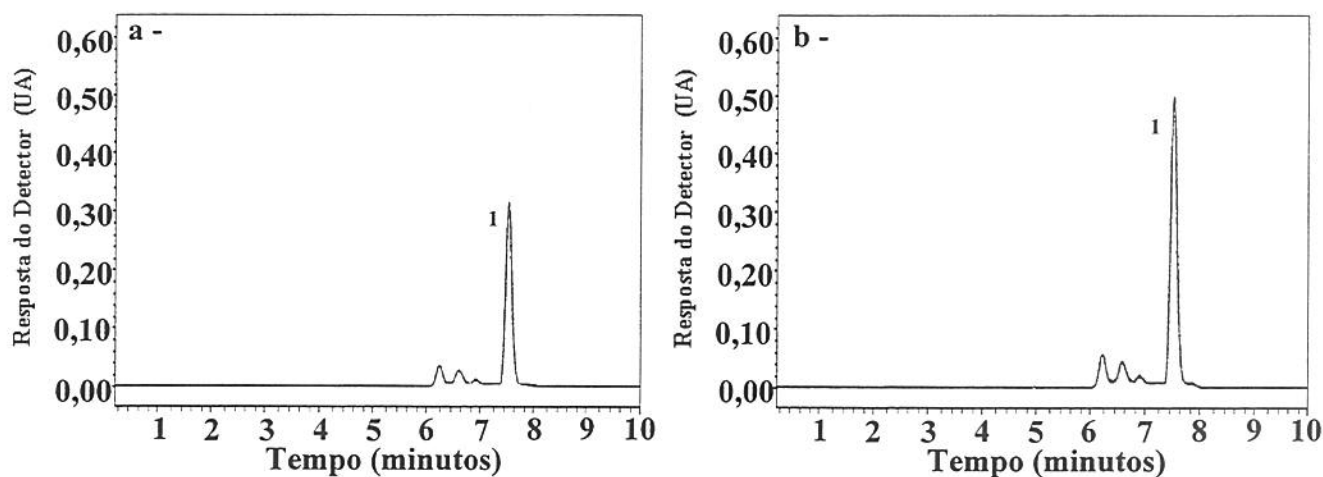


Figura 8. Cromatogramas, obtidos por CLAE, de extrato de carotenóides em “snacks” extrusados extraídos com: a – 30 mL de acetato de etila, 6 extrações de 10 min cada, b – 30 mL de acetato de etila, 8 extrações de 10 min cada. Condições cromatográficas: vide texto. Solvente de injeção: 2 mL de metanol/acetonitrila (1:1). Pico 1: norbixina.

3.2. Saponificação do extrato

A saponificação foi inicialmente estudada em temperatura ambiente onde foram avaliados tempo de reação, com ou sem agitação, presença ou ausência de nitrogênio e quantidade final de KOH na solução composta por 10 mL de KOH metanólico e 10 mL de extrato de carotenóides em acetato de etila através de um planejamento fatorial fracionário 2^{4-1} (Tabela 5). Também foi estudada, por um planejamento 2^{5-1} , a saponificação sob aquecimento, avaliando os mesmos fatores e níveis, porém reduzindo o tempo de saponificação (Tabela 6).

Tabela 5. Condições experimentais e resultados do planejamento fatorial fracionário para etapa de saponificação à temperatura ambiente.

Ensaio	Fatores				Respostas		
	KOH ^a (%)	Tempo (h)	Agitação	N ₂	R1	R2	Média
1	10	20	sem	sem	8,55	8,36	8,46
2	20	20	sem	com	22,32	20,83	21,58
3	10	24	sem	com	9,04	9,87	9,46
4	20	24	sem	sem	19,78	21,12	20,45
5	10	20	com	com	8,96	9,07	9,01
6	20	20	com	sem	20,90	19,51	20,21
7	10	24	com	sem	14,09	13,98	14,04
8	20	24	com	com	19,30	19,71	19,51

Resposta: porcentagem de área de norbixina em relação a área total de bixina.

^aPorcentagem final de KOH na solução contendo 10 mL de KOH metanólico e 10 mL de extrato de carotenóides em acetato de etila.

Tabela 6. Condições experimentais e resultados do planejamento fatorial fracionário para etapa de saponificação com aquecimento.

Ensaio	Fatores					Respostas		
	KOH (%) ^a	Tempo (min)	Agitação	Temp. (°C)	N ₂	R1	R2	Média
1	10	20	sem	50	com	8,00	8,34	8,17
2	20	20	sem	50	sem	18,42	18,93	18,68
3	10	40	sem	50	sem	8,21	8,93	8,57
4	20	40	sem	50	com	18,96	17,68	18,32
5	10	20	com	50	sem	8,59	8,92	8,76
6	20	20	com	50	com	20,36	21,37	20,87
7	10	40	com	50	com	8,42	8,29	8,36
8	20	40	com	50	sem	22,01	18,56	20,29
9	10	20	sem	70	sem	8,94	8,80	8,87
10	20	20	sem	70	com	17,63	18,62	18,13
11	10	40	sem	70	com	8,88	19,64	14,26
12	20	40	sem	70	sem	19,68	7,62	13,65
13	10	20	com	70	com	8,38	7,76	8,07
14	20	20	com	70	sem	17,06	16,91	16,99
15	10	40	com	70	sem	9,56	9,34	9,45
16	20	40	com	70	com	17,25	17,10	17,18

Resposta: porcentagem de área de norbixina em relação a área total de bixina.

^aPorcentagem final de KOH na solução contendo 10 mL de KOH metanólico e 10 mL de extrato de carotenóides em acetato de etila.

Inicialmente, foi utilizada concentração final de 10% KOH na solução contendo 10 mL de KOH metanólico e 10 mL de extrato de carotenóides em acetato de etila. Assim, a conversão de bixina para norbixina alcançada foi de aproximadamente 8%, tanto à temperatura ambiente por 24 horas como à 50°C por 20 minutos (Figuras 9a e

9b). Elevando a concentração final de KOH para 20% e mantendo as demais condições inalteradas, a conversão aumentou para 20% de norbixina (Figuras 9c e 9d).

Independente da concentração de KOH notou-se maior presença de isômeros quando a saponificação foi realizada por um longo período à temperatura ambiente (Figuras 9a e 9c), do que em um tempo curto com aquecimento (Figuras 9b e 9d). Desta forma, foi escolhido uso de temperatura para otimização desta etapa.

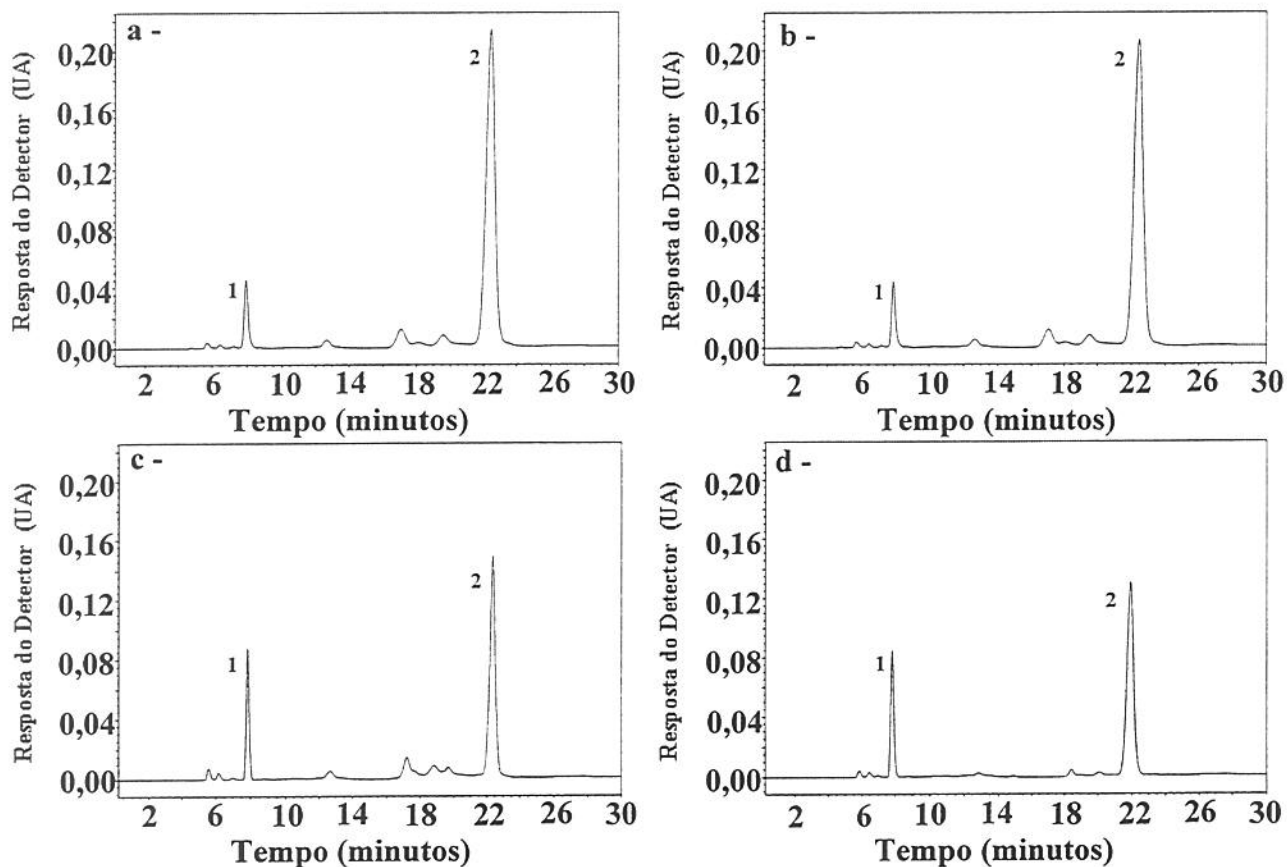


Figura 9. Cromatogramas, obtidos por CLAE, de extrato de carotenóides em “snacks” extrusados saponificados com: a – 10% de KOH metanólico, por 24 horas à temperatura ambiente, b – 10% de KOH metanólico, por 20 min a 50°C, c – 20% de KOH metanólico, por 24 horas à temperatura ambiente, d – 20% de KOH metanólico, por 20 min a 50°C. Condições cromatográficas: vide texto. Pico 1: norbixina, pico 2 : bixina.

Posteriormente o binômio concentração de KOH metanólico e temperatura foram estudados através de um planejamento experimental completo 2^2 (Tabela 7).

Tabela 7. Condições experimentais e resultados do planejamento fatorial completo para etapa de saponificação com aquecimento.

Ensaio	Fatores		Respostas		
	KOH (%) ^a	Temperatura (°C)	R1	R2	Média
1	20	50	17,82	17,52	17,67
2	30	50	53,42	49,37	51,40
3	20	70	19,43	21,00	20,22
4	30	70	40,25	46,92	43,59
5	25	60	29,68	29,12	29,40
6	25	60	29,08	30,10	29,59
7	25	60	29,54	29,45	29,50
8	18	60	14,67	16,60	15,64
9	25	74	31,22	32,48	31,85
10	32	60	44,64	44,88	44,76
11	25	46	28,28	27,65	27,97

Resposta: porcentagem de área de norbixina em relação a área total de bixina.

^aPorcentagem final de KOH na solução contendo 10 mL de KOH metanólico e 10 mL de extrato de carotenóides em acetato de etila.

Aumentando a concentração de KOH metanólico para 30% (10 mL de KOH metanólico e 10 mL de extrato de carotenóides em acetato de etila) e utilizando aquecimento, a conversão de bixina em norbixina foi de 51,40% a 50°C e de 43,59% a 70°C, valores estes que não diferiram significativamente entre si (Figuras 10a e 10b). Estes resultados mostraram que aumento de temperatura de 50°C para 70°C não aumentou a taxa de conversão de bixina para norbixina.

Um novo experimento foi realizado mantendo a temperatura de 50°C com tempo de 20 minutos e variando a concentração final de KOH metanólico de 45 a 70%. O uso de 55% de KOH foi suficiente para 100% de conversão de bixina sem haver formação de isômeros adicionais (Figura 10c).

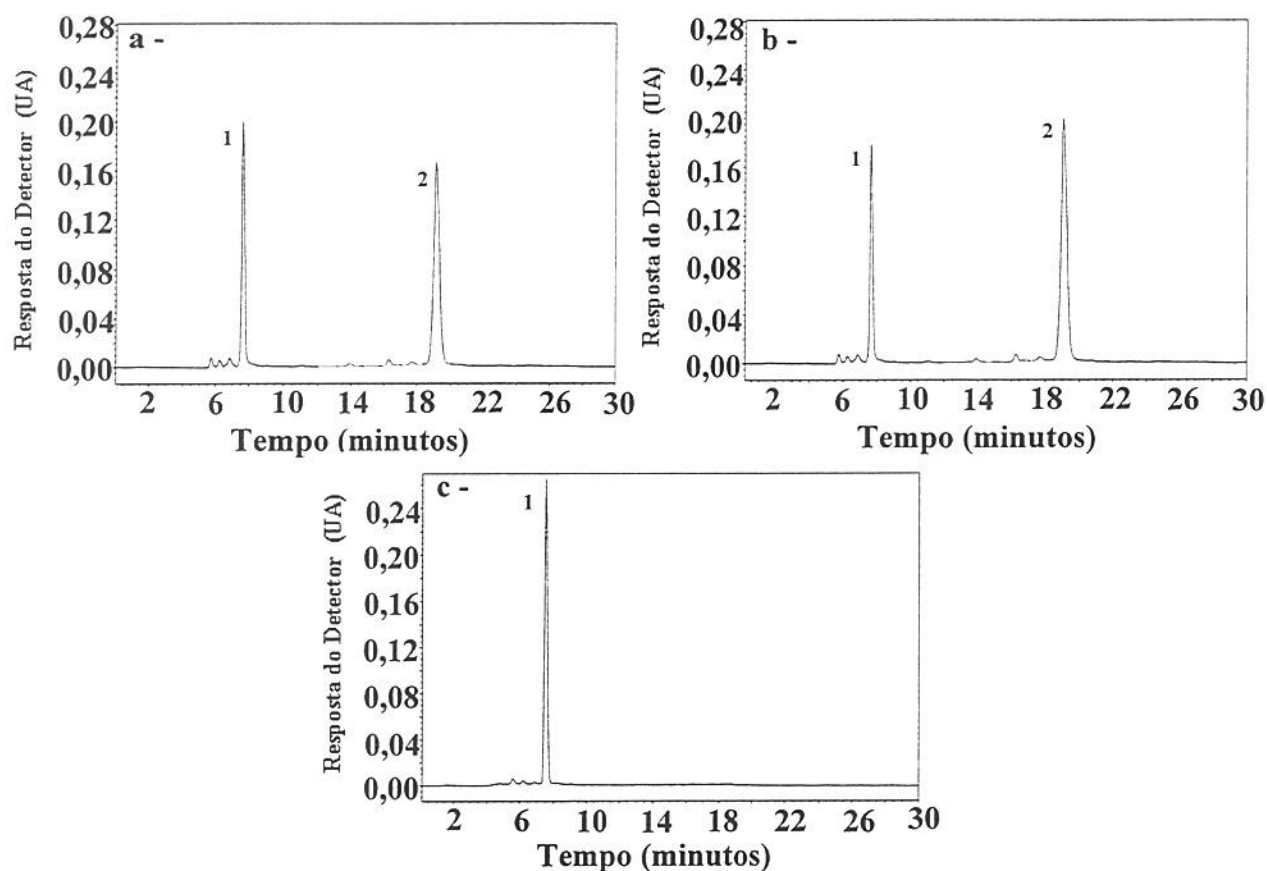


Figura 10. Cromatogramas, obtidos por CLAE, de extrato de carotenóides em “snacks” extrusados saponificados com: a – 30% de KOH metanólico, por 20 min a 50°C, b – 30% de KOH metanólico, por 20 min a 70°C, c – 55% de KOH metanólico, por 20 min a 50°C. Condições cromatográficas: vide texto. Pico 1: norbixina, pico 2: bixina.

Considerando que o teor de lipídeos pode variar consideravelmente entre as amostras analisadas, o uso de 35 mL de KOH 35% em metanol foi escolhido, correspondendo a concentração final de 62,5% como margem de segurança.

CONCLUSÃO

No presente estudo, foi obtido padrão de bixina com alto teor de pureza através de cristalização e os cristais formados apresentaram formas geométricas irregulares, alongadas e prismáticas. O método utilizado mostrou ser simples e de baixo custo.

O uso de CLAE possibilitou acompanhar a influência de importantes fatores durante a extração dos pigmentos da matriz alimentícia, demonstrando a eficiência do solvente acetato de etila e determinando o volume de solvente (30 mL), tempo (10 minutos) e número de extrações (8) necessário para otimização da metodologia desenvolvida. A conversão de bixina em norbixina, durante a saponificação, foi também acompanhada por CLAE e parâmetros para 100% de conversão foram determinados (35 mL de KOH 35% em metanol a 50°C por 20 minutos).

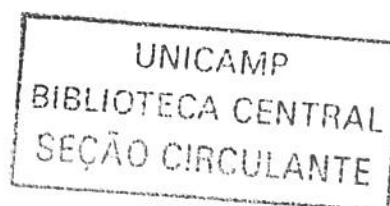
A CLAE também mostrou que em todas as etapas de análise não houve a formação de produtos de degradação com λ_{max} entre 250 e 600 nm.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a FAPESP e Roche Vitamins Ltd. (Suíça) pelo apoio financeiro, a CAPES pela bolsa do primeiro autor e a Itaciara Larroza Nunes pela realização da microscopia eletrônica.

REFERÊNCIAS

- ¹Barber, M. S. et al. Studies in nuclear resonance. Part IV. Stereochemistry of the bixins. **Proceedings of Chemical Society**, 61c: 1625-1630, 1961.
- ²Britton, G. **UV/visible Spectroscopy**. In: "Carotenoids, Vol 1B: Spectroscopy". G. Britton, S. Liaaen-Jensen and H. Pfander (Eds). Birkhauser, Basel. 1995. p. 13-62.
- ³Davies, B.H. **Carotenoids**. In: "Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments". T.W. Goodwin (Ed.), vol 2. Academic Press, London. 1976. p. 38-165.
- ⁴FAO/WHO. 1982. Food and Nutrition Paper 25. Rome. p. 22.
- ⁵Gouveia, J. P. G. de, et al. Determinação de algumas propriedades físicas das sementes de urucum. **Revista Brasileira de Corantes Naturais**, 4: 35-38, 2000.



- ⁶Gutmann, O. I. H. et al. Synthesen in der carotinoid-reihe. Anwendung der wittig-reaktion zur synthese von estern des bixins und crocetins. **Helvetica Chimica Acta**: 139: 1242-1249, 1957.
- ⁷Kelly, D. R. et al. NMR, MS and X-ray crystal structure determination of bixin family of apocarotenoids. **Journal of Chemical Research, Part M: Microfiche**, 10: 2637-2645, 1996.
- ⁸Lancaster, F. E.; Lawrence, J. F. Determination of annatto in high-fat dairy products, margarine and hard candy by solvent extraction followed by high-performance liquid chromatography. **Food Additives and Contaminants**, 12: 9-19, 1995.
- ⁹Mercadante, A. Z. **Composition of Carotenoids from Annatto**. In: "Chemistry and Physiology of Selected Food Colorants". J. M. Ames & T. F. Hofmann (eds.). ACS Symposium Series 775, Washington. 2001. p. 92-101.
- ¹⁰Mercadante, A. Z. et al. Isolation and structure elucidation of minor carotenoids from annatto (*Bixa orellana* L.) seeds. **Phytochemistry**, 46: 1379-1383, 1997.
- ¹¹Ministério da Saúde, Secção de legislação de alimentos. **Resolução 385, de 5 agosto, 1999**, [www.anvisa.gov.br]. 10 abril, 2003.
- ¹²Preston, H. D.; Rickard, M. D. Extraction and chemistry of annatto. **Food Chemistry**, 5: 47-56, 1980.
- ¹³Rios, A. de O; Mercadante, A. Z. Novel method for the determination of added annatto colour in extruded corn snack products. **Food Additives and Contaminants**, aceito, 2003.
- ¹⁴Scotter, M. J. et al. Analysis of annatto (*Bixa orellana*) food coloring formulations. 1. Determination of coloring components and colored thermal degradation products by high-performance liquid chromatography with photodiode array detection. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 46: 1031-1038, 1998.
- ¹⁵Scotter, M. J. et al. Characterization of the principal colouring components of annatto using high-performance liquid chromatography with photodiode-array detection. **Food Additives and Contaminants**, 11: 301-315, 1994.
- ¹⁶Scotter, M. J. et al. Method development and analysis of retail foods for annatto food colouring material. **Food Additives and Contaminants**, 19: 205-222, 2002.

-
- ¹⁷Silveira, M. Preparo de amostras biológicas para microscopia eletrônica de varredura. In: Souza, W. de, editor. **Técnicas básicas de microscopia eletrônica aplicadas às ciências biológicas**. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Microscopia, 1998. p.33-44.
- ¹⁸Tocchini, L.; Mercadante, A. Z. Extração e determinação, por CLAE, de bixina e norbixina em coloríficos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 21: 310-313, 2001.

CAPÍTULO 4

MODEL STUDIES ON THE PHOTSENSITIZED ISOMERIZATION OF BIXIN

**TRABALHO ACEITO PARA PUBLICAÇÃO NA REVISTA:
“JOURNAL OF AGRICULTURAL AND FOOD CHEMISTRY”**

JOURNAL OF AGRICULTURAL AND FOOD CHEMISTRY

Model Studies on the Photosensitized Isomerization of Bixin

MARIANA A. MONTENEGRO,[†] ALESSANDRODE O. RIOS,[‡]
ADRIANA Z. MERCADANTE,[‡] MÓNICA A. NAZARENO,[†] AND
CLAUDIO D. BORSARELLI^{*,†}

Instituto de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Santiago del Estero, Av. Belgrano (S) 1912,
4200, Santiago del Estero, Argentina and Departamento de Ciência de Alimentos, Faculdade de
Engenharia de Alimentos, UNICAMP, Cx. Postal 6121, 13083-970, Campinas, SP, Brasil

The photosensitized isomerization reaction of the natural *cis* carotenoid bixin (methyl hydrogen 9'-*cis*-6, 6'-diapocaratene-6, 6'-dioate) with rose bengal or methylene blue as the sensitizer in acetonitrile/methanol (1:1) solution was studied using UV-vis spectroscopy, high-performance liquid chromatography (HPLC), and time-resolved spectroscopic techniques, such as laser-flash photolysis and singlet oxygen phosphorescence detection. In both N₂- and air-saturated solutions, the main product formed was all-*trans*-bixin. The observed isomerization rate constants, *k*_{obs}, decreased in the presence of air or with increase in the bixin concentration, suggesting the participation of the excited triplet state of bixin, ³Bix*, as precursor of the *cis*→*trans* process. On the other hand, bixin solutions in the absence of sensitizer and/or light did not degrade, indicating that the ground state of bixin is stable to thermal isomerization at room temperature. Time-resolved spectroscopic experiments confirmed the formation of the excited triplet state of bixin and its deactivation by ground state bixin and molecular oxygen quenching processes. The primary isomerization products only degraded in the presence of air and under prolonged illumination conditions, probably due to the formation of oxidation products by reaction with singlet molecular oxygen. An energy-transfer mechanism was used to explain the observed results for the bixin transformations, and the consequences for food color are discussed.

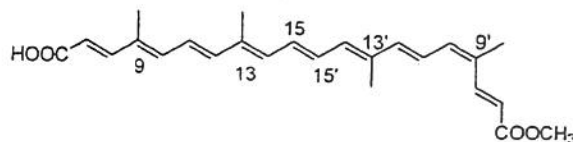
KEYWORDS: Bixin; photoisomerization; photosensitization; singlet oxygen and triplet states

INTRODUCTION

Bixin (methyl hydrogen 9'-*cis*-6, 6'-diapocaratene-6, 6'-dioate, Scheme 1) is the main carotenoid existing in the seed coat of the annatto tree (*Bixa orellana* L.), which is found in tropical regions of South and Central America, Africa, and Asia (1, 2). Annatto extracts are widely used in the food industry as natural coloring agents in cheese, ice cream, yoghurt, sausages, margarine, snacks, and dressings, and compared to natural colors, are relatively inexpensive, thus increasing their commercial relevance (1, 2).

The characterization of the coloring components of the annatto extracts (3–5), annatto seeds (6–9), and their degradation products (10, 11) has received much attention. In particular, the stability of bixin was evaluated under the effect of several factors, such as light, oxygen concentration, temperature, and solvent (12, 13). Bixin showed great stability in the dark, in the presence or absence of oxygen, but under direct illumination was degraded (12). The thermo- and photostability of the 9'-*cis* double bond in methyl bixin was reported as being so great that the molecule underwent a second *trans*→*cis* isomerization

Scheme 1. Chemical Structure of the Natural *cis*-Carotenoid Bixin



giving considerable amounts of the 9, 9'-di-*cis* isomer, but in the presence of iodine and light, 9'-*cis*→*trans* isomerization occurred (14). Therefore, it seems that the fade of bixin could be strongly dependent on the experimental conditions (e.g., direct illumination, heating, photosensitization, etc).

Most studies on bixin stability focused on thermal degradation (10, 11), direct illumination (12), and the water activity solvent effect (13). In the thermal degradation of bixin, the main products formed were all-*trans*-bixin, a C17 carotenoid (*trans*-monomethyl ester of 4,8-dimethyl tetradecahexaenedioic acid) and volatile compounds, especially xylene (5, 10).

However, to our knowledge, there is little or no information about the photosensitized degradation of bixin either in model systems or in foods. Moreover, light can dramatically reduce food stability due to the promotion of autooxidation and photosensitized oxidation, the latter being more common, because many natural sensitizers are commonly found in foods.

* To whom correspondence should be addressed. Fax: 54-385-4509585.
E-mail: cborsa@unse.edu.ar.

[†] Universidad Nacional de Santiago del Estero.

[‡] UNICAMP.

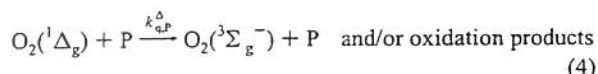
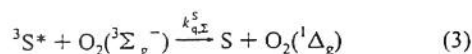
B

Montenegro et al.

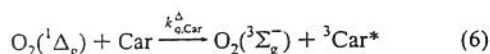
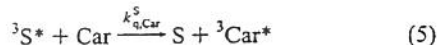
In photosensitized reactions, photons are absorbed by one type of molecule (known as a sensitizer, S), resulting in a long-lived energy-rich state(s) (typically triplet states) of the sensitizer, eq 1, which can undergo reactions producing chemical alteration of another molecule (substrate, P) in the system, eq 2 (15).



In its primary reactions, the excited sensitizer molecule can also react directly with some other molecule (frequently molecular oxygen $O_2({}^3\Sigma_g^-)$) in the reaction mixture, giving products (usually singlet molecular oxygen, $O_2({}^1\Delta_g)$) that in turn react with the substrate, eqs 3 and 4 (15, 16).



On the other hand, it is well-known that carotenoids are efficient quenchers of both excited triplet states and $O_2({}^1\Delta_g)$, principally by an energy-transfer mechanism producing the ground state of the precursor species and the carotenoid triplet state, as occurs in the photosynthetic organisms, eqns. 5 and 6 (17).



Once formed, the carotenoid triplet state returns harmlessly to the ground state with the liberation of heat. In general, the reactive quenching reaction between $O_2({}^1\Delta_g)$ and the carotenoids yielding oxidation products is several orders of magnitude smaller than the physical quenching process, eq 6. The bleaching of all-*trans*-carotenoids by $O_2({}^1\Delta_g)$ -mediated oxidation is commonly observed after prolonged photosensitization periods (18). However, for *cis* carotenoids, the photosensitized process produces the *trans* isomer (19, 20). Therefore, for bixin contained in foods and beverages, a similar photosensitized behavior can be expected, because in foods, several natural or artificial pigments (e.g., riboflavin, chlorophyll, and organic dyes) act as sensitizers (21).

The aim of this work was to present a kinetic study of the photosensitized transformation of bixin in an organic solvent mixture, using UV-vis spectroscopy, high-performance liquid chromatography (HPLC) and time-resolved spectroscopic techniques, such as laser-flash photolysis and $O_2({}^1\Delta_g)$ -phosphorescence detection.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Materials. Bixin (99% purity) was kindly donated by Dr. Werner Simon from Roche Vitamins (Basel, Switzerland). Rose bengal (RB) as its sodium salt and methylene blue (MB) were from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO) and used without further purification. 9, 10-Dimethylanthracene (DMA) from Aldrich (Milwaukee, WI) was recrystallized from ethanol before use. All the organic solvents used were HPLC grade from Mallinckrodt, and the distilled water was purified by the Milli-Q Plus system (Millipore).

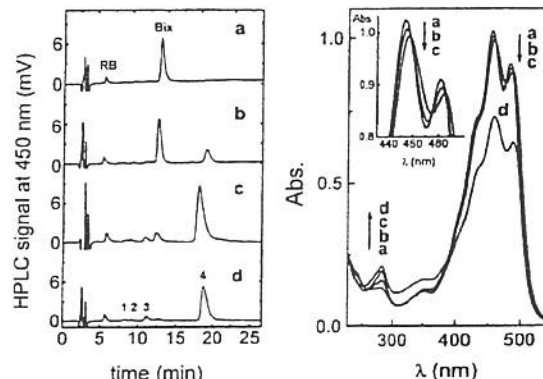


Figure 1. HPLC chromatograms obtained with the C₁₈-Vydac 218TP54 column and monitored at 450 nm (left) and UV-vis spectra (right) of 8 μ M bixin in air-saturated ACN/MeOH (1:1) solutions at 20 °C in the presence of 10 μ M Rose bengal after different times of illumination of the sensitizer: (a) 0 min, (b) 2 min, (c) 10 min, (d) 150 min.

Methods. Stationary UV-vis spectra were obtained either with a Hewlett-Packard 8453 diode array spectrophotometer or a Beckman DU-640 spectrophotometer. HPLC analysis was carried out using a Waters HPLC system equipped with a photodiode array detector (Waters, model 996). The equipment also included an on-line degasser, a Rheodyne injection valve with a 20- μ L loop and an external oven. Data acquisition and processing were performed using the Millennium Waters software. The carotenoids were separated on a C₁₈ Spherisorb ODS-2 column, 150 $\times$ 4.6 mm i.d. (3- μ m particle size), with acetonitrile/2% v/v acetic acid/dichloromethane (63:35:2) as mobile phase at a flow rate of 1 mL/min, with the column temperature being set at 25 °C. The chromatograms were processed at max plot (λ_{max}), and the spectra were recorded between 250 and 600 nm. The second HPLC system used was a Konik 500 A chromatograph coupled to a UV-vis detector Konik UV-vis 200, monitored at 450 nm. In this case, the column was a C₁₈ Vydac 218TP54 (5- μ m, 4.6 $\times$ 250-mm), and the mobile phase and flow conditions were identical to those described above. All samples and solvents were filtered before use, using 0.22 μ m and 0.45 μ m membranes, respectively.

The photosensitization experiments were performed in acetonitrile/methanol (1:1) solutions of bixin containing ca. 10 μ M RB or MB, illuminated with a 150 W filament lamp coupled to an orange cutoff filter to exclusively excite the band of the sensitizer above 520 nm. The reaction was monitored by HPLC at 5, 15, and 20 °C under N₂ (99.99% purity) and in air-saturated solutions.

Laser-flash photolysis (LFP) experiments and the transient spectra were obtained with a homemade system previously described by Borsarelli et al. (22), using a Q-switched Nd/YAG laser (Spectron SL400) operating at the frequency-doubled output (532 nm, 20 ns halfwidth) as excitation source. The transient spectra were performed in both N₂- and air-saturated solutions using fresh solution after a few laser shots.

Singlet molecular oxygen $O_2({}^1\Delta_g)$ sensitization in air-saturated solutions was measured using time-resolved detection of the phosphorescence of $O_2({}^1\Delta_g)$ at 1270 nm, using the same laser as excitation source, as described previously (18).

In all cases, the experiments were performed in duplicate.

RESULTS AND DISCUSSION

Figure 1 shows the HPLC chromatograms and the UV-vis spectra of 8 μ M bixin in air-saturated solutions at 20 °C, observed after different times of illumination of the sensitizer RB. It can be observed that whereas the bixin peak was almost completely consumed after 10 min of photosensitization, slight changes in the UV-vis spectra were produced (Figure 1). In addition, the consumption of bixin was accompanied by the simultaneous formation of new peaks (labeled as products 1, 2,

Photosensitized Isomerization of Bixin

C

Table 1. Retention Times t_R , Absorption Maximum Wavelengths λ_{Max} , and Band Ratios %III/II and %A₃/A_{II} Obtained from HPLC – Photodiode Array Analysis (PDA) during the Photosensitized Isomerization of Bixin in Aerated and Non-aerated ACN/MeOH (1:1) Solutions

peak label ^a	t_R^b (min)	t_R^c (min)	λ_{max}^d (nm)	% III/II	% A ₃ /A _{II}
1	8.0 ± 0.5	11.8 ± 0.2	290, 352, 420 (sh), 455, 482	10	12
2	9.3 ± 0.3	12.3 ± 0.2	285, 420 (sh), 457, 483	28	10
3	11.0 ± 0.9	13.1 ± 0.1	285, 354, 422 (sh), 459, 483	21	18
Bix	12.7 ± 1.0	13.3 ± 0.1	355, 425 (sh), 461, 489	39	5
4	19.2 ± 1.4	13.7 ± 0.2	285, 430 (sh), 466, 495	40	0

^a Labeled according to the chromatogram from Figure 1. ^b C₁₈–Vydac 218TP54 column (average value from 10 chromatographic runs). ^c C₁₈–Spherisorb ODS-2 column (average value from 60 chromatographic runs). ^d (sh) = shoulder.

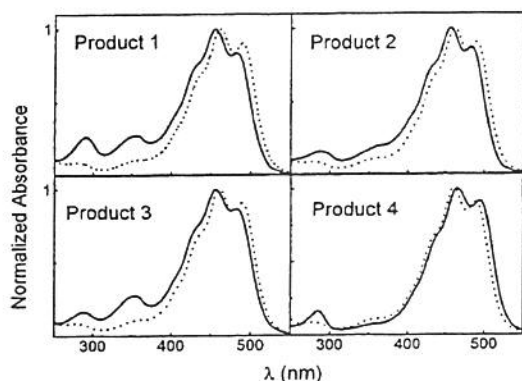


Figure 2. Normalized UV–vis spectra obtained from HPLC–PDA analysis of the photosensitized degradation products of bixin in ACN/MeOH (1:1) solutions. The dotted spectra correspond to the bixin spectrum.

3, and 4). The same HPLC pattern was observed in photosensitized experiments in N₂-saturated solutions and with higher bixin concentrations. In all cases, peak 4 was the main product formed, with a greater retention time (t_R) than bixin, whereas the minor products 1–3 presented shorter t_R values than bixin, Table 1.

In all experiments, the sensitizer RB was not degraded as confirmed by HPLC (Figure 1) and/or UV–vis spectra (data not shown). Moreover, no consumption of bixin was observed under dark conditions in the absence or presence of the sensitizer, indicating that bixin did not form products from the thermal degradation of the carotenoid and/or from direct reaction with the sensitizer.

Figure 2 shows the normalized UV–vis absorption spectra of products 1–4 obtained from the photodiode array detection (PDA) of the HPLC peaks, and compared to that of bixin (dotted line spectrum). Table 1 presents the %III/II ratio, calculated as the values of the height ratio between the longest and middle wavelength absorption bands (designated as III and II, respectively) by taking as the baseline the valley between both bands and of the relative intensity of the cis band (%A₃/A_{II}), calculated as the ratio between the height of the cis band (ca. 360 nm for bixin) and the band II. These are known to be useful parameters for the spectral characterization of carotenoids (23).

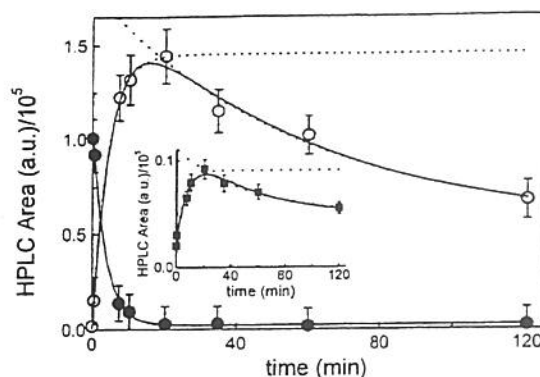


Figure 3. Kinetic curves obtained from the HPLC peak analysis of 8 μ M bixin in air-saturated ACN/MeOH (1:1) solutions in the presence of 10 μ M Rose bengal: (●) Bixin, (○) all-*trans*-bixin, and (■) isomer 3. The solid and dotted lines represent the exponential fitting of the experimental data (see text for details).

Table 2. Observed Rate Constant k_{obs} and Activation Parameters $\Delta H^\ddagger$ and $\Delta S^\ddagger$ for the Photosensitized Isomerization of Bixin in ACN/MeOH (1:1) Solutions

system	temp (deg C)	[Bix] (μ M)	$k_{\text{obs}} \times 10^4$ (s ⁻¹)	$\Delta H^\ddagger$ (kcal/mol)	$\Delta S^\ddagger$ (cal/mol · K)
air saturated	5	76	2.3	5 ± 1	-59 ± 11
	15	76	3.0		
	20	76	3.7		
	20	8	42		
N ₂ saturated	5	76	21	6 ± 2	-50 ± 30
	15	76	26		
	20	76	40		

As compared with data from the literature, the observed spectral features strongly suggested that products 1–4 were geometrical isomers of bixin. For instance, the slight blue shift of the λ_{max} , together with the increase in %A₃/A_{II} and decrease in %III/II for the minor products 1–3 indicated the formation of different *cis*-isomers of bixin (23). Although the UV–vis absorption spectra parameters reported in Table 1 are very useful for structure characterization, they are not conclusive evidence for the assignment of the position of the *cis* double bonds in products 1–3. However, this is not the case for the major product 4, because the bathochromic shift, together with the total disappearance of the *cis*-band absorption and increased spectral fine structure, indicated the quantitative *cis*→*trans* conversion at the 9'-*cis* double bond of bixin, producing the all-*trans* form (14, 23). In addition, the λ_{max} values of product 4 were similar to those reported for all-*trans*-norbixin in a similar solvent mixture (3) supporting, in this case, the assignment of product 4 to all-*trans*-bixin, with the present UV–vis data. By comparison of the HPLC peak areas, it can be concluded that bixin is almost completely transformed to all-*trans*-bixin (> 90%) and to a much less extension to the *cis*-isomers 1–3.

Figure 3 shows the kinetic curves, obtained from the HPLC analysis, of bixin and products 3 and 4 (all-*trans*-bixin) as a function of the photosensitization time. In all cases, the disappearance of bixin followed an irreversible 1st-order kinetic law, with a similar observed rate constant k_{obs} to those for the formation of the product isomers 3 and 4 (Table 2). However, the formation of both bixin isomers was followed by slower 1st-order consumption only in air-saturated solutions. The solid lines in Figure 3 represent the 1st-order fits for the decay of bixin, and the 1st-order growth and decay of the isomers 3 and

D

Montenegro et al.

Table 3. Rate Constant Values for the Deactivation Processes Indicated in Scheme 2

process	rate constant
$^3S^* \rightarrow S$	$k_{d,o}^S = (1.7 \times 10^4 \text{ s}^{-1})^a; (2.9 \times 10^4 \text{ s}^{-1})^b$
$^3S^* + \text{Bix} \rightarrow S + ^3\text{Bix}^*$	$k_{q,\text{Bix}}^S = (8 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1})^a; (7 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1})^b$
$^3S^* + \Sigma \rightarrow S + \Delta$	$k_{q,\Sigma}^S = (1 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1})^a; (2 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1})^b$
$\Delta \rightarrow \Sigma$	$k_{d,o}^\Delta = 6.7 \times 10^4 \text{ s}^{-1}$
$\Delta + \text{Bix} \rightarrow \Sigma + ^3\text{Bix}^*$	$k_{q,\text{Bix}}^\Delta = 1.3 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$
$^3\text{Bix}^* \rightarrow \text{Bix}$	$k_{d,o}^{3\text{Bix}^*} = 4.2 \times 10^4 \text{ s}^{-1}$
$^3\text{Bix}^* + \text{Bix} \rightarrow 2\text{Bix}$	$k_{q,\text{Bix}}^{3\text{Bix}^*} = 1.5 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$
$^3\text{Bix}^* + \Sigma \rightarrow \text{Bix} + \Sigma$	$k_{q,\Sigma}^{3\text{Bix}^*} = 7.0 \times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$
$\Delta + \text{Isomer products} \rightarrow \text{Oxidation products}$	$k_r^\Delta = 1.0 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$

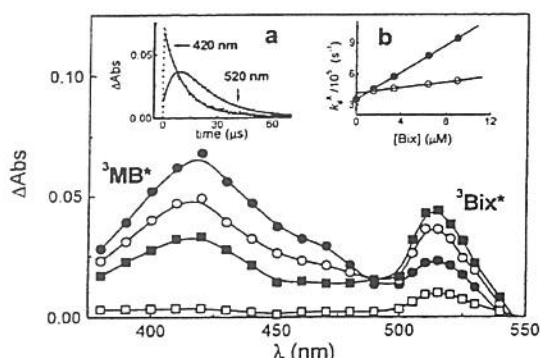
^a S = RB. ^b S = MB; $\Sigma = \text{O}_2(^3\Sigma_g^-)$; $\Delta = \text{O}_2(^1\Delta_g)$.

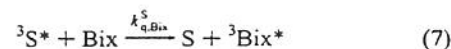
Figure 4. Transient absorption spectra of 10 μM methylene blue (MB) in the presence of 9 μM bixin in N_2 saturated ACN/MeOH (1:1) solutions observed at different times after the 532 nm laser pulse: (●) 1 μs , (○) 4 μs , (■) 8 μs , and (□) 40 μs . Insets: (a) Decay traces at 420 and 520 nm, with the exponential and biexponential fittings (solid lines); (b) Dependence of the observed decay constant k_d^X for $^3\text{MB}^*$ (●) and $^3\text{Bix}^*$ (○), with the bixin concentration, eq 9.

4, fitted with a biexponential function derived from the sum of two consecutive 1st-order processes (dotted lines). Table 2 also shows that the k_{obs} decreased with increase in bixin concentration and in the presence of air.

The temperature effect on k_{obs} was also evaluated according to the activated complex theory (24), allowing for the calculation of the activation parameters $\Delta H^\ddagger$ and $\Delta S^\ddagger$, Table 2. The activation parameters were very similar in both N_2 - and air-saturated solutions, suggesting that the same degradation mechanism operated under both conditions.

To explore the participation of transient excited species in the photosensitized isomerization of bixin, laser-flash photolysis experiments were performed, using laser pulsed excitation at 532 nm. Figure 4 shows the transient absorption spectra observed after laser excitation of the sensitizer MB in N_2 -saturated solutions in the presence of 9 μM bixin. The transient absorption due to the excited triplet state of the sensitizer, $^3\text{MB}^*$, with a maximum at 420 nm (25) decayed with the simultaneous build-up of an absorption band at ca. 520 nm, as confirmed by the kinetic curves in the inset a of Figure 4. After 40 μs of the laser pulse, almost 95% of the $^3\text{MB}^*$ state was depleted, and the residual transient spectrum was similar to those observed for the triplet state of carotenoids such as β -carotene or zeaxanthin (26, 27). The 1st-order kinetic analysis (solid lines in the inset a) of the decay at 420 nm and the growth at 520 nm, afforded similar rate constant values as a function of the bixin concentration, confirming that the decay of the sensitizer

(MB) triplet state $^3\text{S}^*$ was kinetically associated with the formation of the $^3\text{Bix}^*$, via a bimolecular energy-transfer quenching pathway (17, 19), eq 7



where $k_{q,\text{Bix}}^S$ is the energy-transfer quenching rate constant of $^3\text{S}^*$ by bixin. In addition, the decay portion of the transient curve at 520 nm represents the actual decay of $^3\text{Bix}^*$, which is also dependent on the bixin concentration. Because no laser intensity effect was observed, the triplet-triplet annihilation process was ruled out. On the basis of this fact, the shortening of the decay time of $^3\text{Bix}^*$ with increases in the carotenoid concentration was due to a self-quenching process (28) with a rate constant $k_{q,\text{Bix}}^{3\text{Bix}^*}$, eq 8.



The dependence of the unimolecular decay rate constants k_d^X of the species X (with $X = ^3\text{S}^*$ or $^3\text{Bix}^*$) showed a linear relationship with the concentration of the carotenoid, eq 9, as shown in inset b of Figure 4.

$$k_d^X = k_{d,o}^X + k_{q,\text{Bix}}^X [\text{Bix}] \quad (9)$$

where $k_{d,o}^X$ represents the unimolecular decay rate constant of the species X in the absence of bixin. The quenching rate constants of $^3\text{S}^*$ and $^3\text{Bix}^*$ by bixin, $k_{q,\text{Bix}}^S$ and $k_{q,\text{Bix}}^{3\text{Bix}^*}$, respectively, are reported in Table 3. These values are equivalent to those of quenching processes almost controlled by diffusion. The natural lifetime of $^3\text{Bix}^*$, $(k_{d,o}^{3\text{Bix}^*})^{-1} = 24 \mu\text{s}$ was calculated from the intercept value of the plot for the self-quenching process, with the value being in good agreement with recently reported data for several carotenoids with different numbers of conjugated double bonds (28).

On the other hand, in air-saturated solutions, the $^3\text{S}^*$ was efficiently quenched by ground-state molecular oxygen $\text{O}_2(^3\Sigma_g^-)$, eq 3, with $k_{q,\Sigma}^S \approx 2 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (Table 3). At 20 $^\circ\text{C}$, the concentration of dissolved molecular oxygen in air-saturated methanol or acetonitrile was ca. 2 mM (25). Therefore, under these conditions, $^3\text{S}^*$ was efficiently quenched by $\text{O}_2(^3\Sigma_g^-)$ producing $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ and the ground state of the sensitizer, eq 3.

The formation of $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ was followed by monitoring the phosphorescence decay of $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ at 1270 nm (Figure 5). The tail part of the $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ decays was fitted with an exponential function extrapolating to the same initial intensity value, due to the signal distortion by the residual luminescence of the

Photosensitized Isomerization of Bixin

E

Scheme 2. Reaction Mechanism Proposed for the Photosensitized Isomerization of Bixin in Both Nonaerated and Aerated Solutions

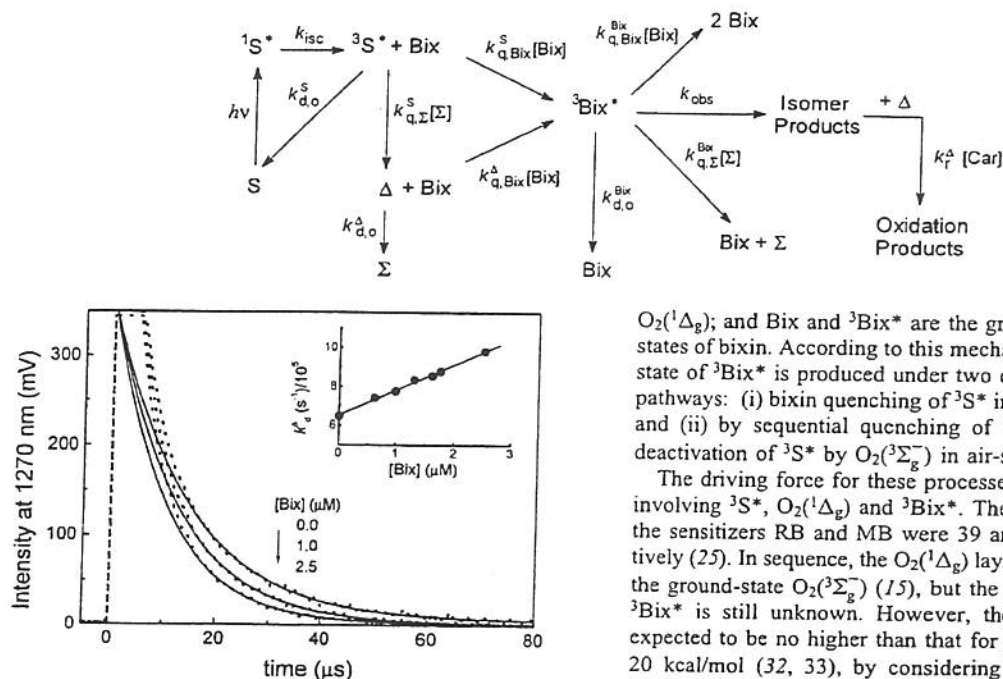
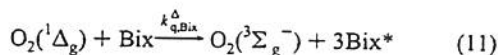


Figure 5. Effect of the bixin concentration on the phosphorescence decay of singlet molecular oxygen $O_2(^1\Delta_g)$. Inset: Dependence of the observed decay constant k_d^Δ with the bixin concentration, eq 10.

sensitizer and the rise time of the signal response of the germanium detector ($<5 \mu s$). In the absence of bixin, $O_2(^1\Delta_g)$ decayed with a lifetime of $15 \mu s$, in good agreement with the lifetime expected for binary mixtures of similar polar organic solvents (16, 29). The addition of bixin reduced the observed decay rate constant of $O_2(^1\Delta_g)$, k_d^Δ , following eq 10.

$$k_d^\Delta = k_{d,o}^\Delta + k_{q,Bix}^\Delta [Bix] \quad (10)$$

A quenching rate constant of $k_{q,Bix}^\Delta = 1.3 \times 10^{10} M^{-1}s^{-1}$ was obtained, Table 3, in good agreement with data obtained for bixin in other solvent systems (18, 30). It is well-known that the quenching process is more physical than chemical for carotenoids with ≥ 9 conjugated double bonds, because the chemical quenching rate constant k_r^Δ is several orders of magnitude smaller than the physical one, k_q^Δ (16, 18, 28, 29). Moreover, the HPLC analysis between 250 and 600 nm did not show the presence of extra peaks other than the reported products 1–4 during the consumption of bixin, confirming that the $O_2(^1\Delta_g)$ quenching by bixin was totally physical, eq 11.



The formation of $^3Bix^*$ during the reaction shown in eq 11 was also confirmed by the detection of the transient absorption spectra of $^3Bix^*$ in air-saturated solutions (data not shown).

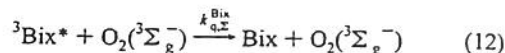
Therefore, all the above results support the participation of $^3Bix^*$ in the isomerization reaction of bixin, according to the energy-transfer-based mechanism (19, 26, 31) proposed in Scheme 2. In this mechanism S, $^1S^*$, and $^3S^*$ symbolize the ground, singlet, and triplet excited states of the sensitizer molecules (RB or MB), respectively; Σ and Δ are $O_2(^3\Sigma_g^-)$ and

$O_2(^1\Delta_g)$; and Bix and $^3Bix^*$ are the ground and triplet excited states of bixin. According to this mechanism, the excited triplet state of $^3Bix^*$ is produced under two different energy-transfer pathways: (i) bixin quenching of $^3S^*$ in N_2 -saturated solutions, and (ii) by sequential quenching of $O_2(^1\Delta_g)$ by bixin, after deactivation of $^3S^*$ by $O_2(^3\Sigma_g^-)$ in air-saturated conditions.

The driving force for these processes is the energy cascade involving $^3S^*$, $O_2(^1\Delta_g)$ and $^3Bix^*$. The triplet energies E_T for the sensitizers RB and MB were 39 and 33 kcal/mol, respectively (25). In sequence, the $O_2(^1\Delta_g)$ lays at 22.5 kcal/mol above the ground-state $O_2(^3\Sigma_g^-)$ (15), but the precise energy level of $^3Bix^*$ is still unknown. However, the E_T of $^3Bix^*$ can be expected to be no higher than that for β -carotene, reported as 20 kcal/mol (32, 33), by considering the similar k_q^Δ values observed for both carotenoids in the same solvent system (18). Thus, the $^3Bix^*$ was the final long-lived excited state produced in the degradation energy cascade.

Therefore, the unimolecular cis→trans isomerization reaction of the 9'-double bond was occurring starting with $^3Bix^*$, explaining the 1st-order kinetic behavior of the consumption of bixin and the formation of the isomerization products. According to this mechanism, the same activation parameters, in the absence and presence of air can be expected, as was experimentally found (Table 2).

On the other hand, the smaller values for k_{obs} observed by increasing the bixin or molecular oxygen concentrations, are explained by the competitive deactivation of the $^3Bix^*$ by the bimolecular self-quenching of bixin, eq 8, or by an enhanced intersystem crossing quenching by $O_2(^3\Sigma_g^-)$, eq 12.



The rate constant quenching $k_{q,\Sigma}^{Bix}$ was expected to be much smaller than the solvent diffusion limit (ca. $2 \times 10^{10} M^{-1}s^{-1}$), because energy-transfer quenching to yield $O_2(^1\Delta_g)$ is endergonic (see above) (34). According to the quenching rate constants reported in Table 3, the quenching efficiencies of $^3S^*$ or $O_2(^1\Delta_g)$ by $76 \mu M$ bixin were almost in unity. Because both energy-transfer pathways yield $^3Bix^*$ as common isomerization precursor, the amount of carotenoid triplet state formed per absorbed photon by the sensitizer was almost the same either in N_2 - or air-saturated solutions. Thus, an estimation of the $k_{q,\Sigma}^{Bix}$ can be obtained by using the k_{obs} values for the isomerization reaction in the absence and presence of air according to eq 13, because the quenching processes by $O_2(^3\Sigma_g^-)$ competes with the unimolecular isomerization pathway.

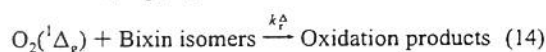
$$k_{q,\Sigma}^{Bix} = \frac{(k_{obs}^{N_2}/k_{obs}^{Air}) - 1}{\tau_{d,Bix}[O_2]} \quad (13)$$

F

Montenegro et al.

In eq 13, $\tau_{d,Bix} (= 1/k_d^{Bix}) = 6.5 \mu s$ was obtained as the actual lifetime of $^3Bix^*$, considering the self-quenching of bixin at $[Bix] = 76 \mu M$, eq 9. Using the data reported in Table 3, the calculation in eq 13 yielded $k_{q,\Sigma}^{Bix} = (7 \pm 2) \times 10^8 M^{-1}s^{-1}$, this magnitude being in agreement with the previous assumption (34).

Finally, as shown in Figure 3, both all-*trans*-bixin and isomer 3 only degraded in aerated solutions, indicating a possibly slower reaction with $O_2(^1\Delta_g)$, eq 14.



This reaction is associated with the UV-vis spectral changes observed after prolonged photosensitization periods (e.g., spectrum d in Figure 1). A chemical quenching rate constant $k_{q,f}^A = 1 \times 10^6 M^{-1}s^{-1}$ was calculated by comparing, under identical experimental conditions, the observed 1st-order rate constants ($2.8 \times 10^{-4} s^{-1}$) for the degradation of the bixin isomers, with that observed for the reaction of the reference compound 9,10-dimethylanthracene (DMA) with $O_2(^1\Delta_g)$, in which the bimolecular reaction rate constant $k_{r,DMA}^A = 5 \times 10^7 M^{-1}s^{-1}$ (16). Current research activities are being focused on the isolation and identification of the $O_2(^1\Delta_g)$ -mediated final oxidation products of the bixin isomers.

In summary, this study showed that in photosensitized processes, bixin isomerizes mainly to all-*trans*-bixin, independent of the presence of oxygen, via an energy-transfer based mechanism, giving the triplet state of bixin, $^3Bix^*$, as the isomerization precursor. Therefore, the isomerization rate is dependent on several factors that compete for the deactivation of $^3Bix^*$, such as self-quenching and $O_2(^3\Sigma_g^-)$ quenching processes. In the presence of $O_2(^1\Delta_g)$ the isomerization products are slowly degraded, resulting in small color changes in the solution.

These results are important, considering that despite the solvent used in the model-system, this study showed that carotenoids with *cis* conformation are able to retain their color during photosensitized oxidation reactions, because the main product formed is the correspondent *trans*-carotenoid, which shows a bathochromic shift of 2–5 nm. This is not the case for *trans*-carotenoids, such as all-*trans*- β -carotene, which formed oxidation products with shorter conjugated double bonds (35), therefore presenting a softer color. Therefore, under the same photosensitized conditions, the color of the bixin system can be maintained, whereas that of β -carotene would fade.

ABBREVIATIONS

RB, Rose Bengal; MB, Methylene Blue; DMA, 9,10-dimethylanthracene; $O_2(^3\Sigma_g^-)$, ground-state molecular oxygen; $O_2(^1\Delta_g)$, singlet molecular oxygen; $^3Bix^*$, bixin triplet excited state; HPLC, high performance liquid chromatography; PDA, photodiode array detection; LFP, laser-flash photolysis; TRPD, time-resolved phosphorescence detection.

LITERATURE CITED

- (1) Mercadante, A. Z.; Pfander, H. Carotenoids from annatto: a review. *Recent Res. Dev. Agric. Food Chem.* 1998, 2, 79–91.
- (2) Preston, H. D.; Rickard, M. D. Extraction and chemistry of annatto. *Food Chem.* 1980, 5, 47–56.
- (3) Scotter, M. J.; Wilson, L. A.; Appleton, G. P.; Castle, L. Analysis of Annatto (*Bixa orellana*) food coloring formulations. 1. Determination of coloring components and colored thermal degradation products by high-performance liquid chromatography with photodiode array detection. *J. Agric. Food Chem.* 1998, 46, 1031–1038.
- (4) Mercadante, A. Z. Composition of Carotenoids from Annatto. In *Chemistry and Physiology of Selected Food Colorants*; Ames, J. M., Hofmann, T. F., Eds.; ACS Symposium Series 775: Washington, DC, 2001. pp 92–101.
- (5) McKeown, G. G. Composition of oil-soluble annatto food colors. III. Structure of the yellow pigment formed by the thermal degradation of bixin. *J. AOAC* 1965, 48, 835–837.
- (6) Mercadante, A. Z.; Steck, A.; Pfander, H. Isolation and structure elucidation of minor carotenoids from annatto (*Bixa orellana* L.) seeds. *Phytochemistry* 1997, 46, 1379–1383.
- (7) Mercadante, A. Z.; Steck, A.; Pfander, H. Three minor carotenoids from annatto (*Bixa orellana*) seeds. *Phytochemistry* 1999, 52, 135–139.
- (8) Jondiko, I. J. O.; Pattenden, G. Terpenoids and an apocarotenoid from seeds of *Bixa orellana*. *Phytochemistry* 1989, 28, 3159–3162.
- (9) Mercadante, A. Z.; Steck, A.; Pfander, H. Isolation and identification of new apocarotenoids from annatto (*Bixa orellana* L.) seeds. *J. Agric. Food Chem.* 1997, 45, 1050–1054.
- (10) Scotter, M. J. Characterisation of the coloured thermal degradation products of bixin from annatto and a revised mechanism for their formation. *Food Chem.* 1995, 53, 177–185.
- (11) Scotter, M. J.; Wilson, L. A.; Appleton, G. P.; Castle, L. Analysis of Annatto (*Bixa orellana*) food coloring formulations. 2. Determination of aromatic hydrocarbon thermal degradation products by gas chromatography. *J. Agric. Food Chem.* 2000, 48, 484–488.
- (12) Najar, S. V.; Bobbio, F. O.; Bobbio, P. A. Effect of light, air, anti-oxidants and pro-oxidants on annatto extracts (*Bixa orellana*). *Food Chem.* 1988, 29, 283–289.
- (13) Gloria, M. B. A.; Vale, S. R.; Bobbio, P. A. Effect of water activity on the stability of bixin in an annatto extract-microcrystalline cellulose model system. *Food Chem.* 1995, 52, 389–391.
- (14) Zechmeister, L.; Escue, R. B. A stereochemical study of methylbixin. *J. Am. Chem. Soc.* 1944, 66, 322–330.
- (15) Spikes, J. D. Photosensitization. In *The Science of Photobiology*, 2nd ed.; Smith, K. C., Ed.; Plenum Press: New York, 1989. pp 79–110.
- (16) Wilkinson, F.; Brummer, J. G. Rate constants for the decay and reactions of the lowest electronically excited singlet state of molecular oxygen in solution. *J. Phys. Chem. Ref. Data* 1981, 10, 809–999.
- (17) Gust, D.; Moore, T. A.; Moore, A. L.; Jori, G.; Reddi, E. The photochemistry of carotenoids. Some photosynthetic and photochemical aspects. *Ann. NY Acad. Sci.* 1993, 691, 32–46.
- (18) Montenegro, M. A.; Nazareno, M. A.; Durantini, E. N.; Borsarelli, C. D. Singlet molecular oxygen quenching ability of carotenoids in a reverse-micelle membrane mimetic system. *Photochem. Photobiol.* 2002, 75, 353–361.
- (19) Foote, C. S.; Chang, Y. C.; Denny, R. W. Chemistry of Singlet Oxygen. XI. *Cis-trans* isomerization of carotenoids by singlet oxygen and a probable quenching mechanism. *J. Am. Chem. Soc.* 1970, 92, 5218–5219.
- (20) Manitto, P.; Speranza, G.; Monti, D.; Gramatica, P. Singlet oxygen reactions in aqueous solution. Physical and chemical quenching rate constants of crocin and related carotenoids. *Tetrahedron Lett.* 1987, 28, 4221–4224.
- (21) Redmond, R. W.; Gamlin, J. N. A compilation of singlet oxygen yields from biologically relevant molecules. *Photochem. Photobiol.* 1999, 70, 391–475.
- (22) Borsarelli, C. D.; Bertolotti, S. G.; Previtali, C. M. Thermodynamic changes in the photoinduced proton-transfer reaction of the triplet state of safranin-T. *Photochem. Photobiol. Sci.* 2002, 1, 574–580.
- (23) Britton, G. UV/visible spectroscopy. In *Carotenoids Vol. 1B: Spectroscopy*; Britton, G., Liaaen-Jensen, S., Pfander, H., Eds.; Birkhäuser Verlag: Basel, Switzerland, 1995, 13–62.
- (24) Wilkinson, F. Theory of elementary reactions. In *Chemical Kinetics and Reaction Mechanisms*; Van Nostrand Reinhold Company: New York, 1980; pp 95–136.

- (25) Murov, S. L.; Carmichael, I.; Hug, G. L. In *Handbook of Photochemistry*, 2nd ed.; Marcel Dekker: New York, 1993; pp 289–291.
- (26) Rodgers, M. A. J.; Bates, A. L. Kinetic and spectroscopic features of some carotenoid triplet states: sensitization by singlet oxygen. *Photochem. Photobiol.* 1980, 31, 533–537.
- (27) Nielsen, B. R.; Mortensen, A.; Jørgensen, K.; Skibsted, L. H. Singlet versus triplet reactivity in photodegradation of C₄₀ carotenoids. *J. Agric. Food Chem.* 1996, 44, 2106–2113.
- (28) Burke, M. B.; Land, E. J.; McGarvey, D. J.; Truscott, T. G. Carotenoid triplet state lifetimes. *J. Photochem. Photobiol., B* 2000, 59, 132–138.
- (29) Bilski, P.; Holt, R. N.; Chignell, C. F. Properties of singlet molecular oxygen O₂(¹Δ_g) in binary solvent mixtures of different polarity and proticity. *J. Photochem. Photobiol., A* 1997, 109, 243–249.
- (30) Speranza, G.; Manitto, P.; Monti, D. Interaction between singlet oxygen and biologically active compounds in aqueous solution III. Physical and chemical ¹O₂-quenching rate constants of 6, 6'-diapocarotenoids. *J. Photochem. Photobiol., B* 1990, 8, 51–61.
- (31) Chen, B. H.; Liu, M. H. Relationship between chlorophyll a and β-carotene in a lipid-containing model system during illumination. *Food Chem.* 1998, 63, 207–213.
- (32) Haley, J. L.; Fitch, A. N.; Goyal, R.; Lambert, C.; Truscott, T. G. The S₁ and T₁ energy levels of all-trans-β-carotene. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1992, 17, 1175–1176.
- (33) Lambert, C.; Redmond, R. W. Triplet energy level of β-carotene. *Chem. Phys. Lett.* 1994, 228, 495–498.
- (34) Wilkinson, F. Quenching of electronically excited states by molecular oxygen in fluid solution. *Pure Appl. Chem.* 1997, 69, 851–856.
- (35) Stratton, S. P.; Schaefer, W. H.; Liebler, D. C. Isolation and identification of singlet oxygen oxidation products of β-carotene. *Chem. Res. Toxicol.* 1993, 6, 542–547.

Received for review August 7, 2003. Revised manuscript received November 12, 2003. Accepted November 16, 2003. Financial support provided by the Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas de la Argentina (CONICET), Secretaría de Ciencia y Técnica de la Universidad Nacional de Santiago del Estero, Fundación Antorchas (Argentina), and the Brazilian Funding Agencies (FAPESP, CAPES, and CNPq).

JF0349026

CAPÍTULO 5

DEGRADAÇÃO DE BIXINA POR FOTO- SENSITIZAÇÃO E AQUECIMENTO EM SISTEMAS-MODELO AQUOSO

**MANUSCRITO EM PREPARAÇÃO PARA SER ENVIADO À REVISTA
“FOOD CHEMISTRY”**

Introdução

A bixina (metil hidrogênio 9'-*cis*-6,6'-diapocaroteno-6,6'-dioato, $C_{25}H_{30}O_4$, Figura 1) é o principal carotenóide presente nas sementes de urucum (*Bixa orellana* L.) (Preston & Rickard, 1980; Mercadante & Pfander, 1998). Este pigmento é um dos poucos carotenóides naturais com configuração geométrica *cis* e acredita-se que sua formação ocorre por um mecanismo de degradação oxidativa de carotenóides com 40 carbonos (Mercadante, Steck & Pfander, 1997; Britton, 1998). Pequenas quantidades de norbixina (9'-*cis*-6,6'-diapocaroteno-6,6'-dioato, $C_{24}H_{28}O_4$, Figura 1) também são encontradas nas sementes.

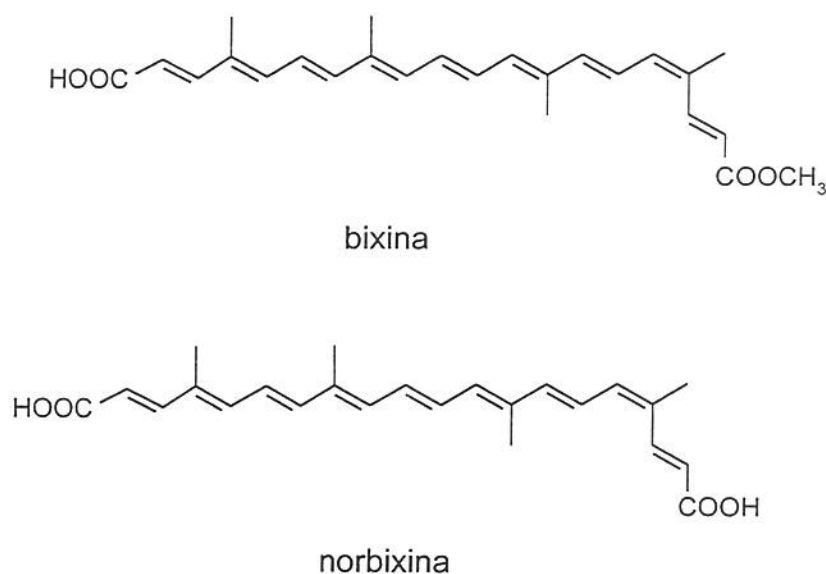


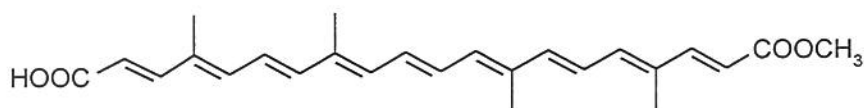
Figura 1. Estruturas da bixina e norbixina.

Preparações comerciais de urucum apresentam tonalidades que variam do amarelo ao vermelho e podem ser utilizadas em uma grande variedade de produtos. Estas preparações podem apresentar-se nas formas solúvel em óleo ou em pó, contendo como principal pigmento a bixina, dispersível em água que contém norbixina como principal corante, e emulsões as quais contém uma combinação de bixina e norbixina ou somente de norbixina (Mercadante, 2001). A principal aplicação de urucum é na indústria de alimentos, sendo utilizado para colorir produtos como salsichas, margarinas, “snacks” e queijos.

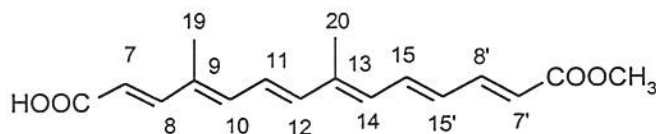
Um dos processos de produção do extrato de urucum utiliza óleo comestível e aplica altas temperaturas, as quais podem atingir 125°C sob vácuo (Preston & Rickard, 1980). Nessas condições, os principais carotenóides encontrados foram *all-trans*-bixina (Figura 2), *cis*-bixina e um produto de degradação térmica amarelo (Mckeown & Mark, 1962; Mckeown, 1963; Preston & Rickard, 1980). A estrutura deste produto amarelo foi proposta por Mckeown (1963, 1965) e confirmada por Scotter (1995) como sendo ácido monometil ester 4,8,dimetil tetradecahexanodióico (C17) (Figura 2). Compostos voláteis, especialmente xileno, também foram formados pelo aquecimento de bixina (Mckeown, 1963; Scotter, Castle & Appleton, 2001).

Scotter *et al.* (2001) avaliaram a estabilidade térmica de bixina em diferentes sistemas-modelo alcoólicos com pontos de ebulição de 65, 78 e 97°C. Um di-*cis*-isômero foi formado rapidamente enquanto que *all-trans*-bixina e C17 foram formados em menor velocidade em todas as temperaturas. Os autores propuseram um mecanismo para a formação de produtos de degradação térmica da bixina.

Recentemente foi relatado que a bixina, em solução de metanol/acetonitrila e na presença de sensibilizador e de luz, foi facilmente transformada à temperatura ambiente em *all-trans*-bixina através de um mecanismo baseado na transferência de energia envolvendo o estado triplete excitado da bixina, $^3\text{Bix}^*$, como precursor da etapa de isomerização (Montenegro, Rios, Mercadante, Nazareno & Borsarelli, 2003).



all-trans-bixina



C17

Figura 2. Estruturas dos compostos de degradação.

Como há pouca informação sobre a cinética e parâmetros de ativação para degradação térmica e foto-sensitizada de bixina em sistemas mais similares aos alimentos, o principal objetivo do presente estudo foi avaliar a degradação de bixina por foto-sensitização e aquecimento, utilizando sistema-modelo de água/etanol (8:2), e separar os compostos formados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

Material e Métodos

Material

Padrão de bixina com 99% de pureza foi gentilmente cedido pelo Dr. Simon Werner da Roche Vitamins Ltd. (Basileia, Suíça). Rosa de bengala na forma de sais de sódio foram adquiridos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, USA) e utilizados sem purificação.

Todos os solventes orgânicos utilizados foram grau cromatográfico adquiridos da Mallinckrodt e água destilada foi purificada pelo sistema Milli-Q Plus (Millipore).

Métodos

Os experimentos de foto-sensitização foram conduzidos utilizando uma lâmpada de 24V x 150 W (36.500 lux), acoplada a um filtro laranja com 100% de transmitância para $\lambda > 520$ nm. O sistema-modelo foi composto por bixina (30 $\mu\text{g/mL}$) e pelo sensibilizador rosa de bengala (5 μM) em água/etanol (8:2) nas temperaturas de 5, 15 e 20°C sob atmosfera saturada com ar ou N_2 (99,99% de pureza).

A bixina (76 μM) foi também solubilizada em água/etanol (8:2) sob atmosfera saturada com ar e submetida a aquecimento no escuro nas temperaturas de 63, 70, 77, 81, 84, 92, 98 e 125°C.

Os sistemas foram monitorados por um cromatógrafo líquido de alta eficiência (Waters) constituído de sistema quaternário de bombeamento de solventes (Waters), injetor "Rheodyne" (loop de 20 μL), forno externo com controle de temperatura, desgaseificador "on line", detector de arranjo de diodos (Waters, modelo 996) e sistema de aquisição e processamento de dados Millenium (Waters). Os carotenóides foram separados em coluna de C_{18} Spherisorb ODS-2 (150 x 4,6 mm), com 3 μm de diâmetro

de partícula, mantida em forno a 29°C. Foi utilizada como fase móvel, ao fluxo de 1mL/min, acetonitrila/ácido acético 2% (65:35) para os experimentos de degradação térmica e acetonitrila/ácido acético 2%/diclorometano (63:35:2) para foto-sensitização. Os espectros foram adquiridos entre 250 e 600 nm e os cromatogramas processados no comprimento de onda de máximo ($\lambda_{\max}$).

Os compostos formados foram caracterizados através das informações provenientes da ordem de eluição na coluna de fase reversa e dos espectros de absorção no UV-visível. Foram calculados a estrutura fina (%III/II) traçando uma linha reta no valor mínimo entre os picos de maior comprimento de onda (III) e o pico anterior designado $\lambda_{\max}$ (II), e após a medição da altura destes picos realizou-se o cálculo em porcentagem de altura pico III sobre altura do pico II. A intensidade do pico *cis* (% A_B/A_{II}) foi calculada a partir da linha de base do espectro medindo a altura de $\lambda_{\max}$ (II) e a altura da banda de absorção conhecida como pico *cis* (normalmente numa posição cerca de 142 nm abaixo do maior comprimento de absorção) e calculando a porcentagem de altura do pico *cis* (A_B) sobre pico II (A_{II}) (Britton, 1995).

Os sistemas com aquecimento a 63, 81 e 92°C foram monitorados por espectrofotometria UV-visível com detector de arranjo de diodos (Hewlett-Packard 8453).

Resultados e Discussão

Degradação térmica

A Figura 3 mostra os cromatogramas obtidos durante aquecimento de bixina nas temperaturas de 70, 98 e 125°C. Vários produtos de degradação foram formados em 1 hora de aquecimento em temperaturas maiores que 98°C, contudo, para temperaturas mais baixas os mesmos produtos foram formados somente após 24 horas.

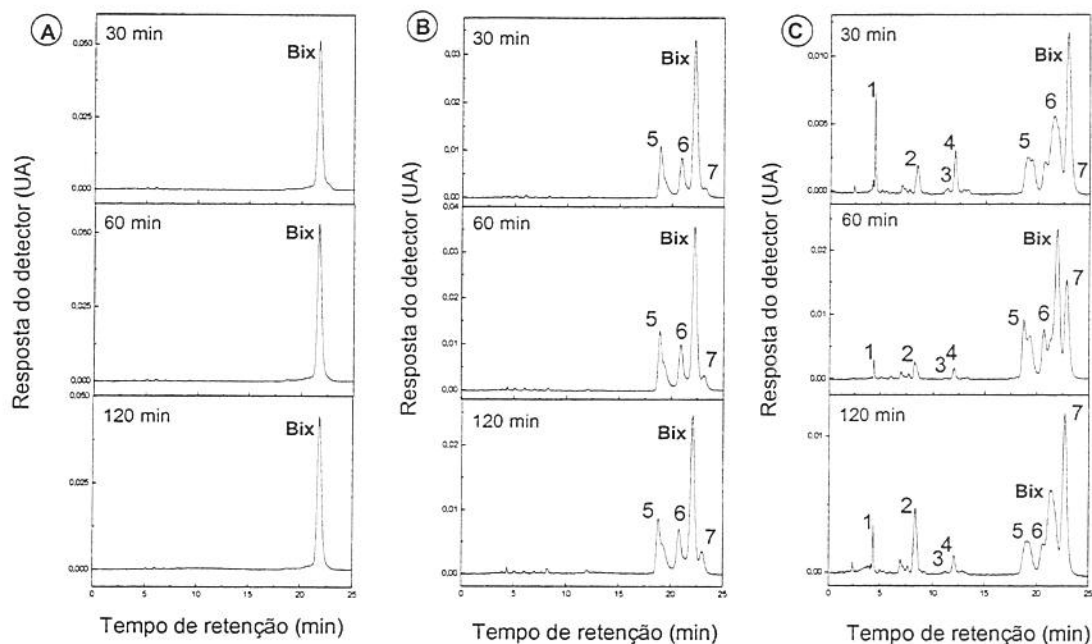


Figura 3. Cromatogramas do monitoramento da degradação térmica de bixina em sistema-modelo de água/etanol (8:2) em diferentes tempos de aquecimento: a) 70°C, b) 98°C e c) 125°C. Condições cromatográficas: ver texto. A caracterização dos picos encontra-se na Tabela 1.

De todos os compostos formados, um deles apresentou tempo de retenção (t_R) maior que o da bixina enquanto que todos os demais apresentaram t_R menores que o da bixina. A Figura 4 mostra os espectros de absorção no UV-visível, e as características dos principais produtos (1-7) e da bixina encontram-se na Tabela 1.

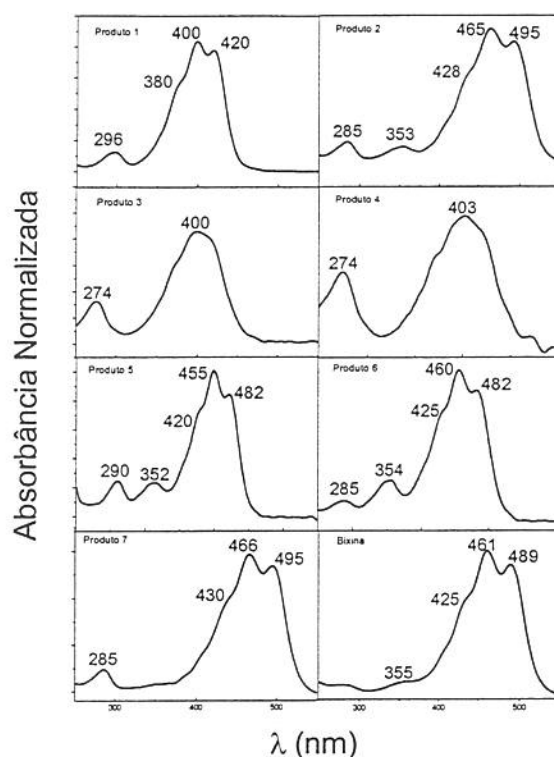


Figura 4: Espectros no UV-visível normalizados, obtidos por CLAE-DAD, de bixina e dos produtos de degradação térmica em sistema-modelo de água/etanol.

Tabela 1. Características, obtidas por CLAE, dos produtos de degradação térmica da bixina.

Pico ^a	Carotenóide	t _R (min) ^c	λ _{max} (nm) ^d	%III/II	%A _B /A _{II}
1	<i>all-trans</i> -C17 ^b	4,3 - 4,5	296, 380, 400, 420	39	10
2	<i>all-trans</i> -norbixina ^b	8,1 – 8,3	285, 353, 428, 465, 495	20	15
3	não identificado (<i>cis</i>)	11,8 – 12,2	274, 400, (420)	0	0
4	não identificado (<i>trans</i>)	12,5 – 12,8	274, 403, (420)	0	0
5	isômero <i>cis</i> de bixina ^b	18,6 – 18,9	290, 352, 420, 455, 482	10	15
6	isômero <i>cis</i> de bixina ^b	20,6 – 20,8	285, 354, 425, 460, 482	11	23
	Bixina (bix)	21,5 – 22,0	355, 425, 461, 489	39	5
7	<i>all-trans</i> -bixina ^b	22,7 – 23,2	285, 430, 466, 495	40	0

^aNumerado de acordo com cromatograma da Figura 3.

^bTentativa de identificação.

^cFaixa de 40 corridas.

^dSolvente: acetonitrila/ácido acético 2% (65:35).

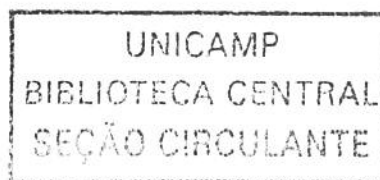
As características dos espectros e tempos de retenção próximos ao t_R da bixina dos compostos 5, 6 e 7 sugerem que estes produtos são isômeros geométricos da bixina. O espectro do produto 7 mostrou um efeito batocrômico, um aumento do grau da estrutura fina e um total desaparecimento da banda de absorção *cis* indicando uma conversão da ligação dupla 9'-*cis* da bixina para a forma *all-trans* (Britton, 1995). Além disso, o valor do $\lambda_{\max}$ do produto 7 foi similar àquele relatado para *all-trans*-norbixina em uma mistura similar de solvente (Scotter, Wilson, Appleton & Castle, 1998) corroborando com a atribuição do produto 7 como *all-trans*-bixina. Por outro lado, os espectros dos compostos 5 e 6 apresentaram efeito hipsocrômico, diminuição do grau de estrutura fina e aumento da intensidade do pico *cis*, sugerindo que estes produtos minoritários são diferentes isômeros *cis* da bixina.

O valor do $\lambda_{\max}$ a 400 nm no espectro do produto 1 sugere que sua estrutura apresenta um cromóforo mais curto que o da bixina, e como este composto eluiu mais rapidamente em coluna de fase reversa indica, assim, que este possui um menor peso molecular que a norbixina e que também é mais polar e menor que a bixina. Uma vez que o espectro característico do produto 1 foi idêntico àquele relatado por Scotter (1995) para o *trans*-C17, o produto 1 foi identificado como tal composto.

Embora os parâmetros espectrais relatados na Tabela 1 sejam úteis na caracterização dos compostos formados, a espectroscopia de ressonância magnética nuclear é a única técnica capaz de identificar a exata posição das ligações *cis* nos produtos 2, 3, 4, 5 e 6.

Os resultados demonstraram que durante aquecimento da bixina a 125°C, esta degradou rapidamente em compostos de menor peso molecular (produtos 1, 3 e 4) e em um composto mais polar (produto 2).

Outros experimentos para temperaturas menores que o ponto de ebulição da mistura água/etanol (8:2) (86°C) foram conduzidos com maior período de aquecimento para confirmar a formação dos mesmos produtos que em elevadas temperaturas. A 77°C foi verificada a formação do produto C17 após 24 horas de aquecimento e de *all-trans*-bixina após 47 horas, enquanto que a 84°C o composto C17 e o isômero *all-trans*-bixina foram formados respectivamente após 7 e 22 horas de aquecimento.



Estes resultados foram similares aos relatados por Scotter *et al.* (2001) que avaliaram por CLAE a estabilidade térmica de bixina, na temperatura de ebulição de diferentes sistemas-modelo alcoólicos e verificaram rápida formação de um di-*cis*-isômero, contudo tanto all-*trans*-bixina quanto o composto de degradação C17 foram formados em menor velocidade nesta temperatura.

Durante o aquecimento, em todas as temperaturas estudadas, a degradação da bixina seguiu uma função bi-exponencial, especialmente em altas temperaturas. A Figura 5 mostra que a função mono-exponencial de primeira ordem, não se ajustou perfeitamente aos dados experimentais.

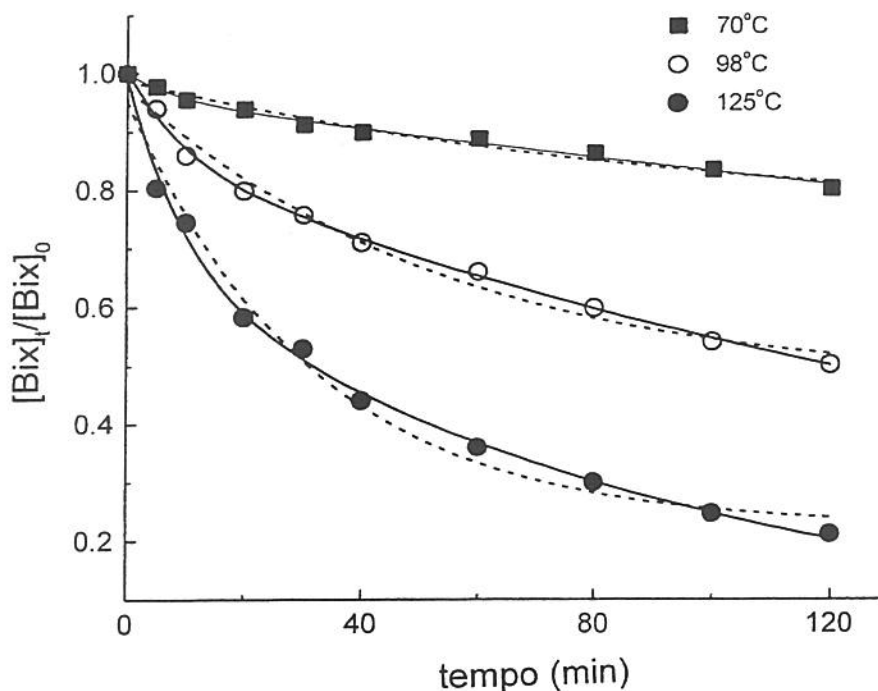


Figura 5. Gráfico da cinética de primeira ordem de degradação térmica de bixina em sistema-modelo de água/etanol (8:2).

Scotter *et al.* (2001) calcularam os parâmetros cinéticos de degradação térmica de bixina considerando uma cinética de primeira ordem. Entretanto, os autores comentaram que após 2 horas de aquecimento os resultados experimentais não se ajustaram perfeitamente ao modelo de primeira ordem.

As constantes de reação (k_{obs}) para bixina durante o aquecimento estão apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2. Constantes de reação de degradação (k_{obs}) para bixina durante aquecimento em sistema-modelo de água/etanol (8:2).

Temperatura (°C)	k_{obs} (min ⁻¹)
63	$8,0 \times 10^{-4}$
70	$2,0 \times 10^{-3}$
77	$2,3 \times 10^{-3}$
81	$3,5 \times 10^{-3}$
84	$1,3 \times 10^{-2}$
92	$1,4 \times 10^{-2}$
98	$1,8 \times 10^{-2}$
125	$2,3 \times 10^{-2}$

É importante ressaltar o aumento de uma ordem de magnitude da constante de reação no aquecimento às temperaturas maiores que o ponto de ebulição do sistema, de 88°C medido experimentalmente e de 86°C (ponto de ebulição da mistura água/etanol a 1 atm tabelado por Liley & Gambell (1973)).

Por outro lado, Scotter *et al.* (2001) relataram k_{obs} na ordem de 10^{-3} para bixina em sistemas alcoólicos na temperatura de ebulição, porém em temperaturas mais elevadas a k_{obs} não foi determinada.

Este efeito da temperatura foi também evidenciado utilizando a equação de Arrhenius (Figura 6). Uma drástica redução da energia de ativação (E_a) acima dos 86°C foi observada nos experimentos de aquecimento. Para temperaturas elevadas (>86°C) a E_a foi de 6,2 kcal/mol e para temperaturas menores que 86°C a E_a foi de 41 kcal/mol. Esta mudança na E_a pode ser associada com uma mudança no mecanismo de degradação ou um aumento da população com níveis de energia vibracionais mais altos que o estado fundamental das moléculas.

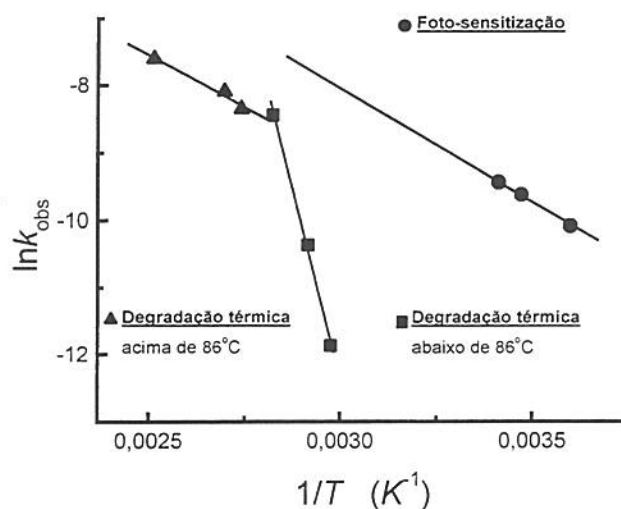


Figura 6. Gráfico de Arrhenius para degradação térmica e foto-sensitivizada de bixina.

Scotter *et al.* (2001) calcularam a E_a para bixina quando sob aquecimento no ponto de ebulição de solventes alcoólicos e relataram um valor de 8,6 kcal/mol. Henry, Catignani & Schwartz (1998) estudando a degradação térmica de carotenóides em óleo na temperatura máxima de 95°C, portanto abaixo do ponto de ebulição do sistema, relataram valores mais elevados de E_a , sendo esta de 26,2 kcal/mol para all-*trans*- β -caroteno, 25,1 kcal/mol para 9-*cis*- β -caroteno, 24,9 kcal/mol para luteína e 19,8 kcal/mol para licopeno.

Alterações por foto-sensitização

Os cromatogramas obtidos por CLAE para o sistema de foto-sensitização a 20°C, selecionados em diferentes tempos são mostrados na Figura 7.

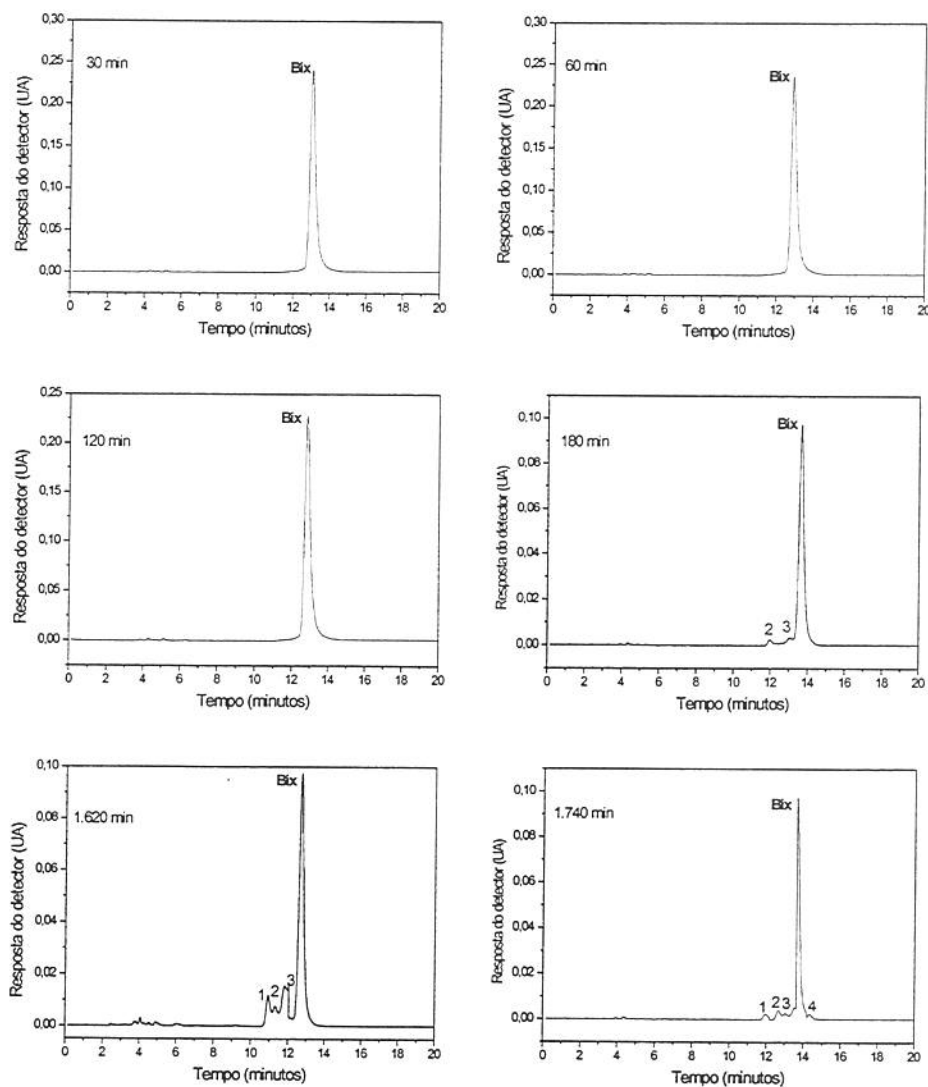


Figura 7. Cromatogramas do monitoramento da foto-sensitização de bixina a 20°C em sistema-modelo de água/etanol (8:2) em diferentes tempos de reação. Condições cromatográficas: ver texto.

Diferentemente do aquecimento, não foram formados compostos de degradação coloridos durante reação de foto-sensitização da bixina por até 72 horas. De acordo com os valores de t_R e características espectrais no UV-visível os produtos 2, 3 e 4 da

Figura 7 são idênticos aos compostos 4, 5 e 7 formados durante aquecimento. Estes isômeros também foram encontrados na reação foto-sensitizada de bixina em solução de acetonitrila/metanol (Montenegro *et al.*, 2003).

A degradação da bixina durante a reação foto-sensitizada em solução aquosa seguiu uma cinética de primeira ordem (Figura 8), em concordância com os resultados em sistema orgânico (Montenegro *et al.*, 2003).

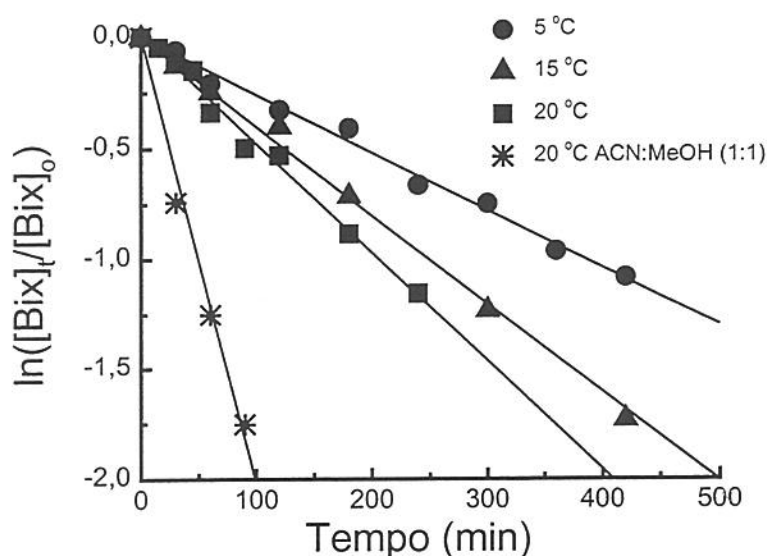


Figura 8. Gráfico da cinética de primeira ordem de degradação de bixina durante foto-sensitização em sistema-modelo de água/etanol (8:2).

Utilizando o modelo de primeira ordem, os parâmetros cinéticos da reação foto-sensitizada da bixina estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Porcentagem de degradação, constante cinética e energia de ativação da bixina durante a foto-sensitização em sistema-modelo de água/etanol (8:2), em atmosfera saturada com ar ou N₂.

Temperatura	Atmosfera com ar			Atmosfera com N ₂		
	Degradação	k (min ⁻¹)	E_a kcal/mol	Degradação	k (min ⁻¹)	E_a kcal/mol
5°C	7%	$2,7 \times 10^{-3}$	7,0	45%	$2,6 \times 10^{-2}$	4,1
15°C	9%	$4,0 \times 10^{-3}$		54%	$3,0 \times 10^{-2}$	
20°C	32%	$5,0 \times 10^{-3}$		59%	$3,8 \times 10^{-2}$	

A velocidade de degradação da bixina foi cerca de 10 vezes menor em água/etanol que a relatada anteriormente em acetonitrila/metanol nas mesmas temperaturas (Montenegro *et al.*, 2003). Este fato pode ser relacionado com o menor tempo de vida do oxigênio singlete molecular ($O_2(^1\Delta_g)$), em meio aquoso, de 4 μ s em água e de 15 μ s em acetonitrila/metanol (Wilkinson & Brummer, 1981; Bilski, Holt & Chignell, 1997).

Os resultados acima confirmaram que a isomerização da bixina envolveu seu estado triplete ($^3Bix^*$) como relatado previamente em solução orgânica (Montenegro *et al.*, 2003). A maior velocidade de degradação, cerca de uma ordem de magnitude, em atmosfera inerte indicou que a $^3Bix^*$ foi formada a partir do sensibilizador no estado excitado ($^3S^*$). Em outras palavras, para formação de $^3Bix^*$ em atmosfera livre de oxigênio, a transferência de energia envolveu uma etapa de transferência de energia do $^3S^*$ para a bixina, enquanto que na presença de oxigênio, $O_2(^3\Sigma_g^-)$, a transferência de energia ocorreu por duas vias (do $^3S^*$ para $O_2(^3\Sigma_g^-)$ e do $O_2(^1\Delta_g)$ para bixina).

O efeito da temperatura na constante de reação foto-sensitizada foi avaliado de acordo com a teoria do complexo ativado, sendo obtido valor de E_a de 7,0 kcal/mol e de 4,1 kcal/mol nos sistemas com atmosfera saturada com ar e N₂, respectivamente. Em sistema-modelo metanol/acetonitrila a E_a para bixina foi de 5 kcal/mol na presença de ar e de 6 kcal/mol sob N₂ (Montenegro *et al.*, 2003).

Barreira energética

O seguinte diagrama de energia (Figura 9) pode explicar os resultados observados nos processos de foto-sensitização e degradação térmica de bixina em água/etanol.

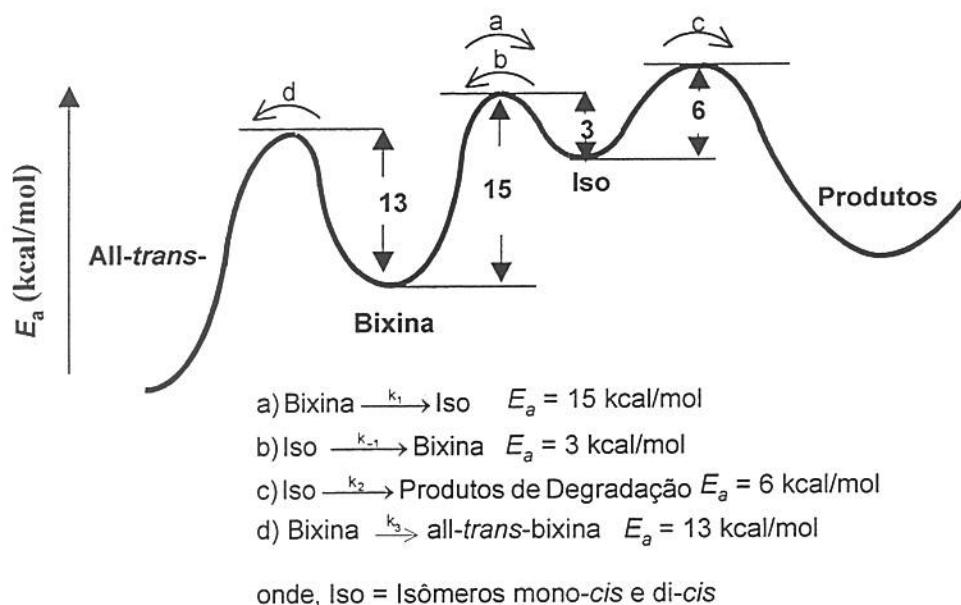


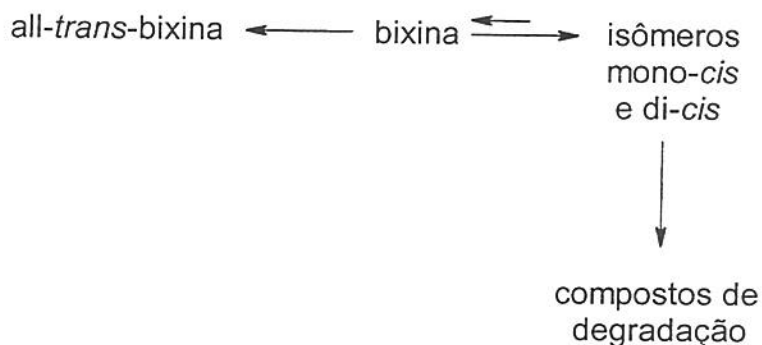
Figura 9. Diagrama dos níveis de energia das etapas de isomerização e degradação de bixina.

Como observado nos cromatogramas (Figuras 3 e 7), durante a degradação térmica de bixina em sistema aquoso, inicialmente ocorreu a formação de isômeros mono-*cis* e di-*cis*, seguido da formação do isômero all-*trans* e também do produto de degradação C17 durante o aquecimento. Estes resultados indicaram que os precursores dos compostos de degradação foram os isômeros da bixina.

Para a formação reversível de isômeros mono-*cis* e di-*cis* (produtos 5 e 6) foi calculada uma barreira energética de 15 kcal/mol e para a formação de produtos a partir dos isômeros a E_a foi menor, 6 kcal/mol, o que resultou na degradação destes isômeros quando iniciou-se a formação de tais produtos (produtos 1 e 2). Embora a E_a para a formação irreversível do isômero all-*trans* tenha sido menor que a dos isômeros mono-

cis e *di-cis* (13 kcal/mol) surpreendentemente esta só ocorreu em temperaturas elevadas (98°C e 125°C).

Estes resultados indicam o seguinte mecanismo de degradação térmica da bixina, que é semelhante ao proposto por Scotter *et al.* (2001):



No processo de foto-sensitização, a bixina desativou o oxigênio singlete em atmosfera saturada com ar ou o sensibilizador em atmosfera de N₂, passando para a forma ³Bix* e formando preferencialmente isômeros.

O estado excitado da bixina (³Bix*) possui uma menor barreira a ser rompida para formação de isômeros (7 kcal/mol) quando comparado com seu estado fundamental (15 kcal/mol). Durante a degradação térmica, verificou-se que em menores temperaturas a formação de isômeros foi favorecida (etapa a da Figura 9), contudo sob altas temperaturas (125°C) ocorreu a formação de vários produtos de degradação uma vez que foi fornecido maior quantidade de energia ao sistema, podendo atingir 21 kcal/mol necessárias para degradação (etapa a + c da Figura 9) e do *all-trans* (13 kcal/mol, etapa d da Figura 9).

Referências

- BILSKI, P.; HOLT, R.N.; CHIGNELL, C.F. (1997). Properties of singlet molecular oxygen $O_2 (^1\Delta_g)$ in binary solvent mixtures of different polarity and proticity. **J. Photochem. Photobiol., A** 109: 243-249.
- BRITTON, G. UV/visible Spectroscopy. In: *Carotenoids, Vol 1B: Spectroscopy*. Britton, G.; Liaaen-Jensen, S.; Pfander, H., Eds. Birkhauser: Basel. 1995. p. 13-62.
- BRITTON, G. Overview of carotenoid biosynthesis. In: *Carotenoids*, vol. 3: Biosynthesis and metabolism. 1998. p. 13-147.
- HENRY, L.K.; CATIGNANI, G. L.; SCHWARTZ, S. J. (1998). Oxidative degradation kinetics of lycopene, lutein and 9-*cis* and all-*trans* β -carotene. **J. Amer. Oil Chem. Soc.**, 75: 823-829.
- LILEY, P. E.; GAMBELL, W. R. Physical and chemical data. Section 3. In: "Chemical Engineers' Handbook. Perry, H. and Chilton, C. H. (Eds). McGraw-Hill Kogakusha. 1973. p. 1-250.
- MCKEOWN, G. G.; MARK, E. (1962). The composition of oil-soluble annatto food colors. **J. Assoc. Off. Agric. Chem.**, 45: 761-766.
- MCKEOWN, G. G. (1963). Composition of oil-soluble annatto food colors.2. Thermal degradation of bixin. **J. Assoc. Off. Agric. Chem.**, 46: 790-796.
- MCKEOWN, G. G. (1965). Composition of oil-soluble annatto food colors.3. Structure of the yellow pigment formed by the thermal degradation of bixin. **J. Assoc. Off. Agric. Chem.**, 48: 835-857.
- MERCADANTE, A. Z.; STECK, A.; PFANDER, H. (1997). Isolation and structure elucidation of minor carotenoids from annatto (*Bixa orellana* L.) seeds. **Phytochem.**, 46: 1379-1383.
- MERCADANTE, A. Z. Composition of Carotenoids from Annatto. In: *Chemistry and Physiology of Selected Food Colorants*. Ames, J. M.; Hofmann, T. F., Eds. ACS Symposium Series 775: Washington, DC 2001. p. 92-101.
- MERCADANTE, A.Z.; PFANDER, H. (1998). Carotenoids from annatto: a review. **Recent Res. Dev. Agric. Food Chem.**, 2: 79-91.

- MONTENEGRO, M. A.; RIOS, A. DE O.; MERCADANTE, A. Z.; NAZARENO, M. A.; BORSARELLI, C. D. (2003). Model studies on the photosensitized isomerization of bixin. **J. Agric. Food Chem.**, aceito.
- PRESTON, H. D.; RICKARD, M. D. (1980). Extraction and chemistry of annatto. **Food Chem.**, 5: 47-56.
- SCOTTER, M. J.; CASTLE, L.; APPLETON, G. P. (2001). Kinetics and yields for the formation of coloured and aromatic thermal degradation products of annatto in foods. **Food Chem.**, 74: 365-375.
- SCOTTER, M. J.; WILSON, L. A.; APPLETON, G. P.; CASTLE, L. (1998). Analysis of annatto (*Bixa orellana*) food coloring formulations. 1. Determination of coloring components and colored thermal degradation products by high – performance liquid chromatography with photodiode array detection. **J. Agric. Food Chem.**, 46: 1031-1038.
- SCOTTER, M. J. (1995). Characterization of the coloured thermal degradation products of bixin from annatto and a revised mechanism for their formation. **Food Chem.**, 53: 177-185.
- WILKINSON, F.; BRUMMER, J.G. (1981). Rate constants for the decay and reactions of the lowest electronically excited singlet state of molecular oxygen in solution. **J. Phys. Chem. Ref. Data.**, 10, 809-999.

CONCLUSÃO GERAL

Utilizando a metodologia de superfície de resposta foi desenvolvido um novo método, otimizando as condições para extração, saponificação e quantificação de corante natural de urucum em “snacks” extrusados. O uso de CLAE possibilitou acompanhar a influência de importantes fatores durante a extração dos pigmentos da matriz alimentícia, demonstrando a eficiência do solvente acetato de etila e determinando o volume de solvente (30 mL), tempo (10 minutos) e número de extrações (8) necessário para otimização da metodologia desenvolvida. A conversão de bixina em norbixina, durante a saponificação, foi também acompanhada por CLAE e parâmetros para 100% de conversão foram determinados (35 mL de KOH 35% em metanol a 50°C por 20 minutos).

Aplicando o método desenvolvido, foram avaliadas 13 amostras comerciais de “snacks” extrusados. As quantidades de corante adicionada nas amostras analisadas estavam abaixo do nível máximo permitido pela legislação brasileira para alimentos a base de cereais (25 mg/kg).

Através de procedimento simples e de baixo custo foi obtido padrão de bixina com alto teor de pureza (98%), utilizando cristalização. Padrão de norbixina foi purificado por coluna de sílica-gel com pureza de 93%.

A foto-sensitização de bixina, em solução orgânica e em meio aquoso, seguiu um modelo cinético de primeira ordem, formando isômeros geométricos, principalmente o *all-trans*-bixina, tendo como precursor o estado triplete excitado da bixina ($^3\text{Bix}^*$). A bixina na ausência de sensibilizador e/ou luz não degradou, indicando que o estado fundamental deste composto foi estável à temperatura ambiente. Comprovou-se que a formação do $^3\text{Bix}^*$ foi devido a um mecanismo de transferência de energia através da desativação do oxigênio singleto ou do estado excitado do sensibilizador.

Durante a degradação térmica da bixina verificou-se a formação de vários produtos de degradação à temperatura de 125°C, contudo em temperaturas mais baixas os mesmos produtos foram formados somente após 24 horas de aquecimento.

ANEXOS

Anexo 1. Efeito dos fatores no planejamento fatorial fracionário para etapa de extração.

Fatores	Efeito	p	Lim. conf.	Lim. conf.
			-95%	+95%
Tipo de solvente	-2,46*	0,00	-2,61	-2,30
Volume de solvente (mL)	-0,25*	0,01	-0,40	-0,09
Número de extrações	1,14*	0,00	0,98	1,30
Tempo de extração (min)	-0,05	0,51	-0,21	0,11

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

Anexo 2. Efeito dos fatores no planejamento fatorial completo para etapa de extração.

Fatores	Efeito	p	Lim. conf.	Lim. conf.
			-95%	+95%
Volume de solvente (mL)	0,65*	0,00	0,43	0,88
Número de extrações	1,16*	0,00	0,93	1,38
Tempo de extração (min)	-0,50*	0,00	-0,72	-0,28
Volume x Número	0,23	0,11	-0,59	0,52
Volume x Tempo	0,61*	0,00	0,32	0,90
Número x Tempo	0,33*	0,03	0,04	0,62

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

Anexo 3. ANOVA do planejamento fatorial completo para etapa de extração.

Fonte de variação	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	Teste F
Regressão	15,99	6	2,66	7,6
Resíduo	9,43	27	0,35	
Falta de ajuste	7,98	8		
Erro puro	1,45	19		
Total	25,42	33		

$F_{\text{tabelado}}_{0,95;6,27} = 2,46$

Anexo 4. Efeito dos fatores do planejamento fatorial fracionário para etapa de saponificação a temperatura ambiente.

Fatores	Efeito	p	Lim. Conf.	Lim. Conf.
			-95%	+95%
KOH (%)	10,19*	0,00	8,16	12,23
Tempo (horas)	1,05	0,28	-0,99	3,08
Agitação	0,71	0,46	-1,33	2,74
Nitrogênio	-0,90	0,35	-2,93	1,14

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

Anexo 5. Efeito dos fatores do planejamento fatorial fracionário para etapa de saponificação com aquecimento.

Fatores	Efeito	p	Lim. Conf.	Lim. Conf.
			-95%	+95%
KOH (%)	8,70*	0,00	6,42	10,97
Tempo (minutos)	0,19	0,86	-2,08	2,47
Agitação	0,16	0,88	-2,11	2,44
Temperatura (°C)	-0,68	0,55	-2,95	1,60
Nitrogênio	1,01	0,37	-1,26	3,29

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

Anexo 6. Efeito dos fatores do planejamento fatorial completo para etapa de saponificação com aquecimento.

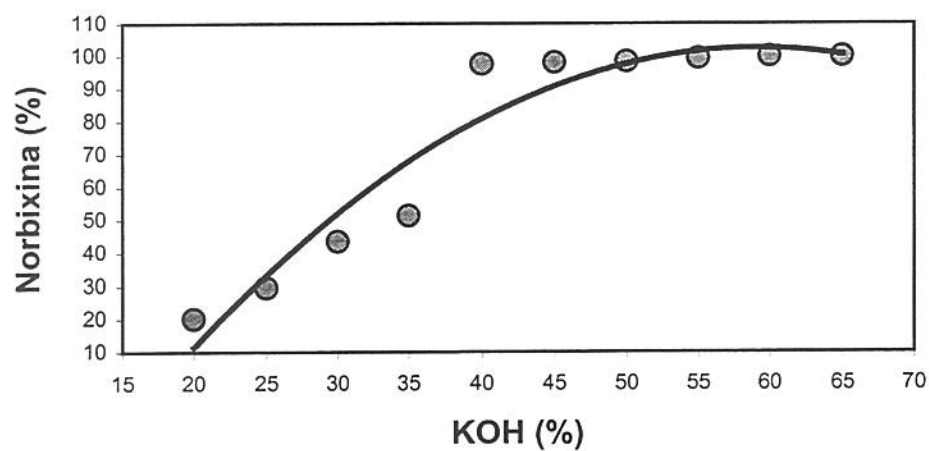
Fatores	Efeito	P	Lim. Conf.	Lim. Conf.
			-95%	+95%
KOH (%)	24,64*	0,00	21,23	28,00
Temperatura (°C)	0,05	0,97	-3,33	3,44
KOH x Temperatura	-5,18*	0,03	-9,96	-0,40

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

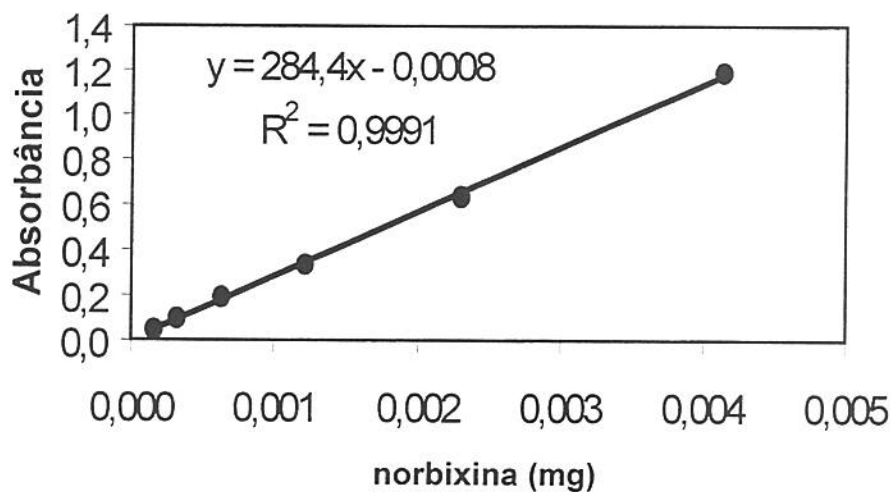
Anexo 7. ANOVA do planejamento fatorial completo para etapa de saponificação de com aquecimento.

Fonte de variação	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	Teste F
Regressão	2469,71	2	1234,86	125,75
Resíduo	186,54	19	9,82	
Falta de ajuste	151,22	6		
Erro puro	35,32	13		
Total	2656,25	21		

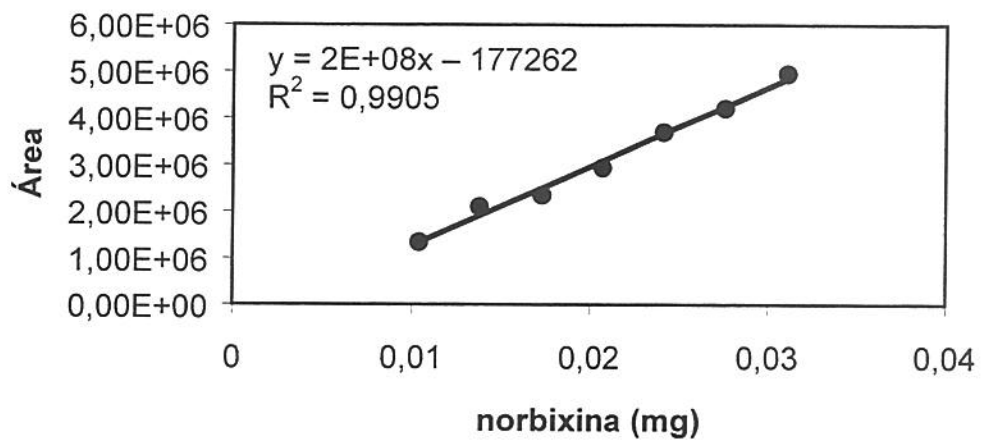
$$F_{\text{tabelado}_{0,95;2,19}} = 3,52$$



Anexo 8. Gráfico da otimização da etapa de saponificação com aquecimento.



Anexo 9. Curva padrão, obtida por espectrofotômetro, de norbixina.



Anexo 10. Curva padrão, obtida por CLAE, de norbixina.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

