



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

WALKÍRIA CRISTINA VILELA RIBEIRO

**IDENTIFICAÇÃO E CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DE
COMPOSTOS DE DEGRADAÇÃO DE CAROTENOIDES**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO APRESENTADA À
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS DA
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS PARA A
OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM CIÊNCIA
DE ALIMENTOS.

PROF. Dra. ADRIANA ZERLOTTI MERCADANTE

Este exemplar corresponde à versão final da dissertação defendida por Walkíria Cristina Vilela Ribeiro aprovada pela comissão julgadora em 23/09/2011 e orientada pela Prof. Dra. Adriana Zerlotti Mercadante

Assinatura do Orientador

Campinas, 2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
CLAUDIA AP. ROMANO DE SOUZA – CRB8/5816 - BIBLIOTECA DA FACULDADE DE
ENGENHARIA DE ALIMENTOS – UNICAMP

R354i Ribeiro, Walkíria Cristina Vilela, 1985-
Identificação e capacidade antioxidante de compostos
de degradação de carotenoides / Walkíria Cristina Vilela
Ribeiro. -- Campinas, SP: [s.n], 2011.

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

1. Carotenoides. 2. Degradação. 3.
Identificação. 4. HPLC. 5. Capacidade Antioxidante.
I. Mercadante, Adriana Zerlotti. II. Universidade
Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de
Alimentos. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Identification and antioxidant capacity of degradation products
of carotenoids

Palavras-chave em inglês (Keywords):

Carotenoids

Degradation

Identification

HPLC

Antioxidant Capacity

Área de concentração: Ciência de Alimentos

Titulação: Mestre em Ciência de Alimentos

Banca examinadora:

Adriana Zerlotti Mercadante

Adélia Ferreira de Faria Machado

Lílian Regina Barros Mariutti

Data da defesa: 23/09/11

Programa de Pós Graduação: Ciência de Alimentos

BANCA EXAMINADORA

Este exemplar corresponde à redação final da dissertação defendida por Walkíria Cristina Vilela Ribeiro, aprovada pela comissão julgadora em 23 de setembro de 2011.

Prof. Dra. Adriana Zerlotti Mercadante (Orientadora)
DCA / FEA / UNICAMP

Dra. Adélia Ferreira de Faria Machado
CTAA / EMBRAPA

Dra. Lilian Regina Barros Mariutti
DCA / FEA / UNICAMP

Prof. Dr. Severino Matias de Alencar
LAN / ESALQ / USP

Prof. Dra. Helena Teixeira Godoy
DCA / FEA / UNICAMP

Dedico este trabalho a toda comunidade científica da área de Ciência de Alimentos, que seja de grande contribuição para enriquecer o conhecimento.

AGRADECIMENTOS

À Deus pela concessão da vida e por ter os meus caminhos sob sua eterna guia e proteção.

Ao meu noivo, e em breve marido, Felipe, pelo amor e por apoiar qualquer que fosse minha decisão.

Aos meus pais, Elizabete e Ronaldo, por minha educação, pelo amor incondicional, pelo incentivo e orgulho por esta conquista.

Aos meus irmãos, Ronaldinho e Ana Caroline, meus tios, Edivaldo e Nancy, meus primos Fernanda e Vitor, e minha avó Teodora, por fazerem parte da minha pequena família e pelo amor e apoio.

À Prof. Dra. Adriana Zerlotti Mercadante, pela oportunidade, pela excelente orientação e pelos incontáveis ensinamentos que contribuíram para minha formação acadêmica e para a execução deste trabalho.

À Dra. Adélia, Dra. Lílian, Prof. Dr. Severino e Prof. Dra. Helena, por comporem a banca examinadora, propiciando as correções e relevantes sugestões para o aperfeiçoamento deste trabalho.

Aos amigos e colegas de trabalho do Laboratório de Química de Alimentos, Aline, Ana Augusta, Bruno, Elaine, Elisângela, Eliseu, Fernanda, Gislaine, Lizziane, Marcella, Poliana, Renan, Renata e Viviane, pela ajuda e amizade e por tornarem o ambiente de trabalho extremamente agradável.

Às grandes e queridas amigas Cíntia, Juliana, Merenice, Raquel, Simoni, Viviane e Zilda, pelas pessoas que são e por me darem a oportunidade de entender o verdadeiro significado da amizade.

A todos que, seja da maneira que for, contribuíram para a realização deste trabalho.

Por fim, agradeço ao CNPq e à FAPESP, pelo apoio financeiro.

EPÍGRAFE

*“... e diante da honra vai a humildade.”
Provérbios de Salomão, 18:12*

ÍNDICE

ÍNDICE.....	vii
ÍNDICE DE TABELAS E QUADROS.....	ix
ÍNDICE DE FIGURAS.....	x
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS.....	xii
RESUMO.....	xiv
SUMMARY.....	xvi
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. SÍNTESE BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1. Propriedades, funções e ações dos carotenoides.....	3
2.2. Capacidade antioxidante e pró-oxidante de carotenoides.....	5
2.3. Métodos de avaliação da capacidade antioxidante.....	9
2.4. Produtos de degradação de carotenoides.....	14
3. OBJETIVOS.....	20
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	21
4.1. Materiais.....	21
4.2 Sistema simulador de suco.....	21
4.3. Reação de epoxidação do β -caroteno com MCPBA.....	23
4.4. Identificação dos compostos de degradação por HPLC-DAD-MS/MS.....	24
4.5. Quantificação dos carotenoides por HPLC-DAD.....	25
4.6. Determinação da capacidade antioxidante.....	25
4.6.1. Método antirradical livre frente ao radical ABTS ^{•+}	25
4.6.2. Método de desativação do radical peroxila (ROO [•]).....	26
4.7. Análise estatística.....	27

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	28
5.1. Degradação térmica da β -criptoxantina.....	28
5.1.1. Identificação dos compostos de degradação não voláteis.....	28
5.1.2. Efeito do aquecimento no perfil de degradação e formação de carotenoides.....	32
5.2. Epóxidos do β -caroteno.....	38
5.2.1. Produção e identificação dos compostos formados pela reação de epoxidação.....	38
5.2.2. Perfil de formação dos compostos de epoxidação.....	42
5.2.3. Influência da composição de epóxidos na capacidade antioxidante.....	46
6. CONCLUSÕES.....	54
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	55
8. ANEXO.....	61

ÍNDICE DE TABELAS E QUADROS

Tabela 1. Valores médios da capacidade antirradical livre de diferentes carotenoides.....	12
Tabela 2. Características dos espectros UV-Vis e de massas obtidas por HPLC-DAD-MS dos produtos formados pela reação de epoxidação do β -caroteno.....	19
Tabela 3. Características cromatográficas e dos espectros UV-Vis e de massas, obtidas por HPLC-DAD-MS/MS, dos compostos formados no aquecimento da β -criptoxantina em sistema simulador de suco.....	29
Tabela 4. Características cromatográficas e dos espectros UV-Vis e de massas, obtidas por HPLC-DAD-MS/MS, dos compostos formados pela reação de epoxidação do β -caroteno.....	40
Tabela 5. Porcentagem dos diferentes epóxidos derivados do β -caroteno.....	42
Quadro 1. Características estruturais de diferentes carotenoides.....	14
Quadro 2. Condições utilizadas na epoxidação do β -caroteno.....	24
Quadro 3. Valores da razão <i>trans/cis</i> nos diferentes tempos de aquecimento de β -criptoxantina em sistema simulador de suco.....	33
Quadro 4. Valores de TEAC, ORAC e proporção dos grupos de epóxidos presentes nas diferentes condições estudadas.....	47
Quadro 5. Características estruturais dos epóxidos formados pela reação do β -caroteno com MCPBA.....	48

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Estrutura molecular do β -caroteno e da β -criptoxantina.....	3
Figura 2.	Atuação simplificada dos antioxidantes na diminuição do risco de doenças crônicas.....	5
Figura 3.	Formação do radical peroxila de β -caroteno.....	7
Figura 4.	Mecanismo de desativação do radical ROO \cdot pelo método ORAC.....	10
Figura 5.	Formação e desativação do cátion radical ABTS $^{+\cdot}$	11
Figura 6.	Mudanças estruturais dos carotenoides ocorridas devido ao tratamento térmico	15
Figura 7.	Indicação do cálculo da estrutura fina e da intensidade do pico <i>cis</i>	16
Figura 8.	Sequência de formação de epóxi-carotenoides de β -caroteno com MCPBA, proposta por Rodriguez & Rodriguez-Amaya (2007).....	19
Figura 9.	Procedimento para avaliar a degradação térmica de β -criptoxantina em sistema simulador de suco.....	22
Figura 10.	Esquema simplificado da reação de epoxidação do β -caroteno com MCPBA.....	23
Figura 11.	Perfil cromatográfico, obtido por HPLC-DAD, após 0, 45 e 300 minutos de aquecimento do sistema simulador de suco.....	28
Figura 12.	Distribuição, em porcentagem (%), dos grupos de compostos formados ao longo do aquecimento da β -criptoxantina em sistema simulador de suco.....	33
Figura 13.	Distribuição, em porcentagem (%), dos isômeros mono- <i>cis</i> de β -criptoxantina formados ao longo do aquecimento no sistema simulador de suco.....	34
Figura 14.	Degradação da all- <i>trans</i> - β -criptoxantina e formação de isômeros <i>cis</i> (soma dos mono- e di- <i>cis</i>) durante aquecimento em sistema simulador de suco.....	35
Figura 15.	Formação dos isômeros mono- <i>cis</i> e di- <i>cis</i> durante aquecimento da all- <i>trans</i> - β -criptoxantina em sistema simulador de suco.....	35

Figura 16. Mecanismo proposto para a degradação térmica da β -criptoxantina em sistema simulador de suco.....	37
Figura 17. Mecanismo de epoxidação induzido pelo MCPBA.....	38
Figura 18. Mecanismo proposto para o rearranjo epóxido-furanoide de carotenoides.....	39
Figura 19. Perfil cromatográfico, obtido por HPLC-DAD, dos produtos formados na reação de epoxidação do β -caroteno com MCPBA.....	39
Figura 20. Perfil cromatográfico, obtido por HPLC-DAD, dos produtos formados na reação de epoxidação do β -caroteno com MCPBA em diferentes condições.....	43
Figura 21. Proporção dos epóxidos formados na presença e ausência de NaHCO_3 , nos ensaios de 0 min (acima) e 30 min (abaixo).....	45
Figura 22. Porcentagem de inibição do radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$ em função da concentração (μM) de trolox (a) e <i>all-trans</i> - β -caroteno (b).....	46
Figura 23. Capacidade antioxidante equivalente a trolox (TEAC) para as quatro condições da reação de β -caroteno com MCPBA.....	50
Figura 24. Cinética de decaimento da fluorescência do β -caroteno, medida durante o método ORAC.....	51
Figura 25. Curva de calibração de trolox para o teste ORAC.....	52
Figura 26. Capacidade de desativação do radical peroxila (ORAC) para as quatro condições da reação de β -caroteno com MCPBA.....	52

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AAPH	2,2'-azobis-(2-amidinopropano)di-idrocloroeto
Abs	absorbância
ABTS	2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato)
APCI	ionização química a pressão atmosférica
DAD	detector de arranjo de diodo
DNA	ácido desoxirribonucleico
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazila
EtOAc	acetato de etila
EtOH	etanol
FD	fator de diluição
FRAP	poder antioxidante de redução do ferro
HPLC	cromatografia líquida de alta eficiência
IDR	ingestão diária recomendada
K ₂ SO ₅	persulfato de potássio
I.d.c.	ligação dupla conjugada
MCPBA	ácido <i>meta</i> -cloroperbenzoico
MeOH	metanol
MS	espectrometria de massas
MTBE	éter metil <i>terc</i> -butílico
Na ₂ S ₂ O ₃	tiosulfato de sódio
Na ₂ SO ₄	sulfato de sódio
NaHCO ₃	bicarbonato de sódio
NMR	ressonância magnética nuclear
ORAC	capacidade de absorção de radicais de oxigênio
RE	equivalente de retinol
RMCD	β-ciclodextrina randomicamente metilada
RNS	espécies reativas de nitrogênio
ROS	espécies reativas de oxigênio

TEA	triethylamina
TEAC	capacidade antioxidante equivalente a trolox
t_R	tempo de retenção
Trolox	ácido 6-hidróxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico
UV	ultra-violeta
UV-Vis	UV-Visível
% A_B/A_{II}	intensidade de pico <i>cis</i>
% III/II	estrutura fina espectral
$[M + H]^+$	molécula protonada
1O_2	oxigênio molecular no estado singleto
3O_2	oxigênio molecular no estado fundamental tripleto
CAR	carotenoide
$E_{1cm}^{1\%}$	coeficiente de absorvidade
H_2O_2	peróxido de hidrogênio
HO^\bullet	radical hidroxila
$HO_2^{\bullet-}$	radical hidroperoxila
m/z	massa/carga
$O_2^{\bullet-}$	ânion superóxido
OH^\bullet	radical hidroxila
R^2	coeficiente de correlação
RO^\bullet	radical alcoxila
ROO^\bullet	radical peroxila
S	sensibilizador
S^*	sensibilizador excitado
$\lambda_{emissão}$	comprimento de onda de emissão
$\lambda_{excitação}$	comprimento de onda de excitação
λ_{max}	comprimento de onda de máxima absorção

RESUMO

Os alimentos com propriedades funcionais vêm recebendo grande destaque nos últimos anos, especialmente em relação aos compostos bioativos aos quais estas propriedades estão relacionadas, incluindo os pigmentos naturais, como os carotenoides. Muitos métodos de processamento de alimentos ou a estocagem inadequada induzem modificações nas estruturas desses pigmentos, sendo ainda pouco discutido o impacto que tais alterações conferem em algumas destas propriedades benéficas, como a capacidade antioxidante. Considerando estes fatos, este estudo teve dois grandes objetivos. O primeiro foi identificar os compostos de degradação formados pelo aquecimento da β -criptoxantina, verificando o perfil de degradação e formação dos produtos, e o segundo, identificar os produtos de epoxidação derivados do β -caroteno e avaliar a sua influência na capacidade antioxidante. Para atender ao primeiro objetivo, o aquecimento da β -criptoxantina foi realizado em sistema simulador de suco, e os produtos formados foram separados, identificados e quantificados por cromatografia líquida de alta eficiência-detector de arranjo de diodos-espectrometria de massas (HPLC-DAD-MS/MS). Para o segundo objetivo, os produtos de epoxidação foram obtidos através da reação do β -caroteno com MCPBA, na presença e ausência de NaHCO_3 , em dois diferentes tempos de agitação (0 e 30 minutos), utilizando HPLC-DAD-MS/MS para separação, identificação e quantificação. Estes extratos foram utilizados para as análises da capacidade de desativação do radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$ e da capacidade de absorção de radicais de oxigênio (ORAC). O aquecimento da β -criptoxantina proporcionou a formação de treze compostos de oxidação e isomerização, sendo cinco isômeros mono-*cis* (9-*cis*, 9'-*cis*, 13-*cis*, 13'-*cis* e 15-*cis*), quatro di-*cis*, dois apocarotenoides (12'-apo- β -carotenal e 10'-apo- β -carotenal) e um monoepóxido (5',6'-epóxido). Após 300 minutos de aquecimento, ocorreu redução de 55 % no teor de all-*trans*- β -criptoxantina, dos quais aproximadamente 75 % foram convertidos em compostos voláteis. Entre os produtos não voláteis, a reação de isomerização foi a que ocorreu preferencialmente, sendo os isômeros 13- e 13'-*cis* os majoritários, seguidos pelos 9- e 9'-*cis* e por último o 15-*cis*. A razão *trans/cis* passou de 98:2 para 73:27, pertencendo aos mono-*cis* a maior representatividade (24 %). Os produtos de oxidação representaram menos de 1 % em todos os tempos de aquecimento. Com relação à epoxidação do β -caroteno, foram identificados os seguintes derivados epóxidos: 5,6,5',6'-diepóxido, 5,6,5',8'-diepóxido, 9-*cis*-5,6,5',6'-diepóxido, 5,6-epóxido e 5,8-epóxido. Após a reação com MCPBA, a proporção de all-*trans*- β -caroteno ficou menor que 15 %, sendo os diepóxidos maioria em todas as condições, exceto no tempo 0 minutos com NaHCO_3 . A diferença nas proporções entre os diepóxidos e monoepóxidos

foram de 10 % e 18 % para os tempos de 0 minutos e de 54 % e 73 % para os de 30 minutos, com e sem NaHCO₃, respectivamente. Os valores de TEAC variaram de 0,46 a 0,70 entre os extratos com produtos de oxidação, cerca de cinco vezes menor ao encontrado para o all-*trans*-β-caroteno. Observou-se maior valor de TEAC nos ensaios com reação de 30 minutos, nos quais a diferença entre a proporção de mono e diepóxidos foi superior a 50 %. Já para o teste ORAC, os valores variaram de 0,15 a 0,83, superiores ao do all-*trans*-β-caroteno, que apresentou valor próximo a zero. A maior proporção de diepóxidos favoreceu a desativação tanto do radical ABTS^{•+} quanto do ROO[•], embora quando comparados ao all-*trans*-β-caroteno, os produtos formados pela epoxidação foram mais eficientes em desativar o radical ROO[•] que o radical ABTS^{•+}.

Palavras-chave: identificação, LC-MS, degradação, β-criptoxantina, epóxi-carotenoides, capacidade antioxidante.

SUMMARY

Foods with functional properties have received great attention in recent years, especially regarding the bioactive compounds to which these properties are related, including natural pigments such as carotenoids. Many methods of food processing or inadequate storage conditions induce changes in the structures of these pigments and the impact of such changes on some of these beneficial properties, like antioxidant capacity, is still poorly studied. Considering these facts, this study had two main objectives. The first one was related to the identification of the degradation compounds formed by heating of β -cryptoxanthin, verifying the degradation behavior and formation of products. The second one was related to the identification of the products derived from epoxidation of β -carotene and evaluator of the influence of these compounds on the antioxidant capacity. To achieve the first objective, the heating was conducted in a simulated juice system, and the products formed were separated, identified and quantified by high performance liquid chromatography coupled to diode array and mass spectrometer detectors (HPLC-DAD-MS/MS). For the second objective, the epoxides were obtained by the reaction of β -carotene with MCPBA in the presence and absence of NaHCO_3 under two different stirring times (0 and 30 minutes), using HPLC-DAD-MS/MS for separation, identification and quantification. These extracts were used for evaluation the scavenging capacity of $\text{ABTS}^{\bullet+}$ and peroxy (ORAC) radicals. Heating of β -cryptoxanthin resulted in the formation of thirteen oxidation and isomerization products, including five mono-*cis* isomers (9-*cis*, 9'-*cis*, 13-*cis*, 13'-*cis* and 15-*cis*), four di-*cis*, two apocarotenals (β -apo-10'-carotenal and β -apo-12'-carotenal) and one monoepoxide (5',6'-epoxide). After 300 minutes of heating, the content of all-*trans*- β -cryptoxanthin reduced almost 55 % of the initial content, being 75 % converted into volatile compounds. The isomerization reaction preferably occurred among the non-volatile compounds, being the isomers 13- and 13'-*cis* the major ones, followed by the 9- and 9'-*cis* and finally the 15-*cis*. The *trans/cis* ratio changed from 98:2 to 73:27, being the mono-*cis* isomers the major ones (24 %). The oxidation products represented less than 1 % at all heating times. In relation to the epoxidation reaction of β -carotene, the following epoxides were identified: β -carotene-5,6,5',6'-diepoxide, β -carotene-5,6,5',8'-diepoxide, 9-*cis*- β -carotene-5,6,5',6'-diepoxide, β -carotene-5,6-epoxide and β -carotene-5,8-epoxide. After the reaction with MCPBA, the proportion of all-*trans*- β -carotene was less than 15 % and the diepoxides were the most abundant in all conditions, except at 0 minutes with NaHCO_3 . The differences between the proportion of diepoxides and monoepoxides were 10 % and 18 % at 0 minutes and 54 % and 73 % at 30 minutes, with and without NaHCO_3 , respectively. The TEAC values ranged from 0.46 to 0.70 among the

extracts with oxidation products, almost five times lower than the value found for all-*trans*- β -carotene. Among the extracts with epoxides, the highest TEAC value was observed at 30 minutes of reaction, in which the difference between the amounts of mono and diepoxides was higher than 50 %. The ORAC values ranged from 0.15 to 0.83, higher than that found for all-*trans*- β -carotene, which was close to zero. The highest amount of diepoxides increased the scavenging capacity of ABTS^{•+} and ROO[•] radicals, although when compared to all-*trans*- β -carotene, the epoxidation products were more effective to scavenge the radical ROO[•] than the radical ABTS^{•+}.

Keywords: identification, LC-MS, degradation, β -cryptoxanthin, epoxy-carotenoids, antioxidant capacity.

1. INTRODUÇÃO

Com o aumento da expectativa de vida da população, associado à busca por hábitos saudáveis, as propriedades funcionais que os alimentos oferecem têm sido muito procuradas pelos consumidores, especialmente aquelas relacionadas à prevenção de doenças crônicas e do envelhecimento precoce. Até mesmo os guias alimentares têm recomendado um aumento no consumo de frutas e vegetais, uma vez que são boas fontes de compostos bioativos, dentre eles, os carotenoides. Contudo, ainda que um alimento apresente propriedades benéficas à saúde, ele só terá aceitação junto ao consumidor se as características sensoriais, tais como a cor, o sabor e o odor, forem atrativas.

Os carotenoides são pigmentos naturais lipossolúveis responsáveis pela coloração que varia do amarelo ao laranja e vermelho e estão presentes em frutas, hortaliças, gema de ovo, raízes, aves, flores, peixes, crustáceos e micro-organismos. Mais de 650 carotenoides diferentes já foram caracterizados a partir de fontes naturais (Ötles & Çagindi, 2008), mas destes, somente cerca de 60 têm sido detectados em componentes da dieta humana e por volta de 20 encontrados no sangue e nos tecidos (During, 2008), sendo os principais o β -caroteno, a β -criptoxantina, o α -caroteno, a luteína, a zeaxantina e o licopeno. Embora sejam micronutrientes, ou seja, mesmo estando presentes na proporção de microgramas por grama de alimento, os carotenoides estão entre os componentes alimentícios mais importantes.

Além da atividade já comprovada de alguns carotenoides como precursores de vitamina A, outras atividades biológicas têm sido relacionadas, tais como a ação imunomoduladora, a diminuição do risco de doenças crônicas, como câncer e doenças cardiovasculares, a prevenção da formação de catarata e a redução do risco da degeneração macular relacionada à idade (Krinsky, 1993; Krinsky & Johnson, 2005). Todas estas propriedades têm sido relacionadas à capacidade antioxidante que estes compostos apresentam, atuando principalmente na prevenção de reações de oxidação durante o estresse oxidativo.

Além das funções ligadas à saúde humana, os alimentos também podem se beneficiar deste potencial antioxidante, através principalmente do retardo da oxidação lipídica em produtos processados e matérias-primas alimentares, como por exemplo, emulsões (Kiokias, Dimakou & Oreopoulou, 2009), embutido cárneo (Mercadante et al., 2010) e hambúrguer de frango (Castro, Mariutti & Bragagnolo, 2011), estendendo a vida de prateleira desses alimentos. Na indústria, o uso destes pigmentos é predominantemente pela sua ação corante.

A capacidade antioxidante dos carotenoides está relacionada ao longo sistema de ligações duplas conjugadas inerentes à cadeia poliênica que compõe sua estrutura, atuando como desativadores tanto de radicais livres quanto do oxigênio singlete (Caris-Veyrat, 2008), principalmente em baixos níveis de oxigênio, como ocorre na maioria dos tecidos, o que torna estes compostos importantes como agentes antioxidantes *in vivo* (Barreiros, David & David, 2006). Entre os métodos *in vitro* mais usados para avaliar a capacidade antioxidante em alimentos, segundo Rodriguez-Amaya (2010), estão o método de desativação do radical cátion 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato) (ABTS^{•+}) e a capacidade de absorção do radical peroxila (ORAC), além dos métodos FRAP (poder antioxidante de redução do ferro) e DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila).

A maioria dos carotenoides apresenta-se na natureza na forma *all-trans*, que é a mais estável, e é nessa forma que as atividades biológicas e as propriedades de cor normalmente são avaliadas. Entretanto, devido ao mesmo longo sistema de ligações duplas conjugadas da molécula, estes compostos são muito susceptíveis à degradação sob determinadas condições, muitas das quais encontradas em alguns tipos de processamento e armazenamento de alimentos. Esta degradação leva tanto à formação de compostos de oxidação, como os epóxidos e os apocarotenoides e posteriormente a produtos de baixo peso molecular, quanto a reações de isomerização da forma *all-trans* para os isômeros *cis*, causando impacto na cor (Zepka et al., 2009) e provavelmente nas atividades biológicas.

A diminuição na atividade de vitamina A dos produtos de degradação dos carotenoides já é bem relatada na literatura. Entretanto, há algumas controvérsias com relação à ação sobre outras atividades biológicas. Tibaduiza et al. (2002) observaram que alguns produtos da clivagem do β -caroteno inibiram o crescimento de células do câncer de mama *in vitro*. Em contrapartida, produtos derivados da clivagem do β -caroteno induziram o estresse oxidativo *in vitro* (Augustin et al., 2002), além de apresentarem efeitos citotóxicos (Hurst et al., 2005; Kalariya et al., 2008) e genotóxicos (Alija et al., 2006; Kalariya et al., 2009), sendo que nenhum deles se refere aos derivados epóxidos.

Sendo assim, estudos que buscam identificar quais são os compostos formados durante a degradação de carotenoides são de extrema relevância para melhor compreensão das mudanças que ocorrem durante alguns tipos de processamento e/ou estocagem de alimentos. Ademais, poucos são os dados a respeito da capacidade antioxidante destes compostos de degradação, especialmente dos epóxidos, uma vez que são poucos os estudos que avaliam particularmente o impacto desses compostos sobre tais propriedades.

2. SÍNTESE BIBLIOGRÁFICA

2.1. Propriedades, funções e ações dos carotenoides

Os carotenoides presentes nos alimentos são, geralmente, tetraterpenoides de 40 carbonos, formados pela união de oito unidades isoprenoides de cinco carbonos, caracterizando uma molécula linear com simetria invertida na posição central. Esta estrutura básica é caracterizada por uma alternância de ligações duplas e simples que gera um sistema de elétrons π que se desloca sobre toda a cadeia poliênica, proporcionando a estas substâncias alta reatividade química e capacidade de absorção de luz na região do visível, caracterizando o cromóforo da molécula. O esqueleto básico desta família de moléculas pode ser modificado de muitas maneiras, tais como ciclização, hidrogenação, desidrogenação, introdução de grupos contendo oxigênio, rearranjos, encurtamento de cadeia ou combinações destas alterações.

Estes pigmentos podem ser classificados em dois grandes grupos: carotenos e xantofilas. O primeiro corresponde àqueles que são formados apenas por hidrocarbonetos, ou seja, possuem apenas carbono e hidrogênio em sua estrutura, como o β -caroteno (Figura 1). O segundo grupo agrega os compostos que possuem oxigênio na molécula, por exemplo, β -criptoxantina (Figura 1).

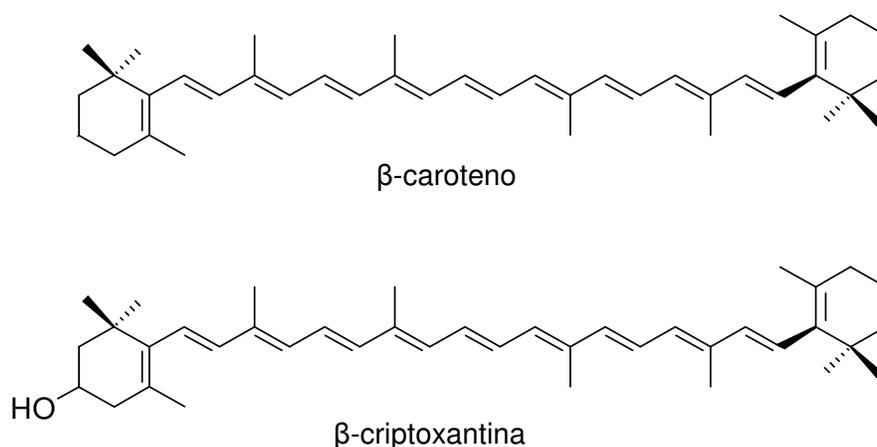


Figura 1. Estrutura molecular do β -caroteno e da β -criptoxantina.

Por serem compostos lipossolúveis, os carotenoides são absorvidos pelo organismo através dos quilomícrons do intestino, envolvendo alguns passos cruciais: (1) liberação da matriz alimentícia, (2) solubilização por ácidos biliares e enzimas digestivas culminando na formação de micelas lipídicas misturadas no lúmen, (3) absorção pelas células intestinais, (4) incorporação pelos quilomícrons e (5) secreção dos carotenoides e seus metabólitos associados aos quilomícrons no sistema linfático (During, 2008). Os carotenoides mais abundantes encontrados no plasma humano são β -caroteno, α -caroteno, licopeno, β -criptoxantina, luteína e zeaxantina (Krinsky & Johnson, 2005).

A atividade já comprovada de pró-vitamina A não se aplica a todos os carotenoides. Para que apresente esta atividade, o carotenoide deve possuir em sua estrutura o que corresponde à molécula de retinol (vitamina A), ou seja, deve possuir um anel- β não substituído, com uma cadeia poliênica de 11 carbonos. Basicamente, a estrutura do retinol é a metade da molécula do β -caroteno, com uma hidroxila adicionada no final da cadeia poliênica. Dessa forma, o β -caroteno é o carotenoide de maior potência vitamínica A e ao qual se atribui 100 % de atividade, ao passo que a luteína, zeaxantina e licopeno não possuem atividade. O Instituto de Medicina (2001) recomenda uma ingestão diária (IDR) de 700 e 900 μg de equivalente de atividade de retinol (RAE) para mulheres e homens adultos, respectivamente, e considera que 1 RAE equivale a 12 μg de β -caroteno e a 24 μg de outros carotenoides pró-vitamina A, como a β -criptoxantina. Já a ANVISA (2005) estabelece uma IDR de 600 μg de equivalente de retinol (RE), considerando que para obter 1 μg de RE são necessários 6 μg de β -caroteno ou 12 μg de outros carotenoides pró-vitamina A.

A ação dos carotenoides na diminuição do risco de doenças crônicas, como o câncer e doenças cardiovasculares, tem sido atribuída à sua capacidade antioxidante principalmente em condição de estresse oxidativo, situação na qual existe um desequilíbrio entre moléculas antioxidantes e pró-oxidantes (Halliwell & Gutteridge, 2007). Entre as moléculas pró-oxidantes estão as espécies reativas de oxigênio (ROS) e de nitrogênio (RNS), as quais podem ser geradas no organismo através da atividade metabólica normal, ou ainda por fatores externos, como exposição à radiação UV e maus hábitos alimentares. Quando em excesso, essas espécies reativas reagem com biomoléculas celulares, como lipídeos, DNA e proteínas, iniciando eventos que levam ao aumento no risco do desenvolvimento de doenças crônico-degenerativas. Os antioxidantes exógenos, ingeridos com a dieta, são capazes de retardar ou prevenir o processo oxidativo através da desativação dessas espécies reativas (Figura 2).

Outros mecanismos de ação dos carotenoides na diminuição do risco do desenvolvimento de doenças crônicas também foram relatados, entre eles a estimulação

da comunicação celular das junções *gap* pelo aumento na expressão do gene conexina 43, a regulação do crescimento celular, a modulação da expressão genética, a indução de enzimas detoxificantes, a melhoria no sistema imune e a filtração da luz azul que causa danos aos receptores oculares (Stahl & Sies, 2002; Krinsky and Johnson, 2005).

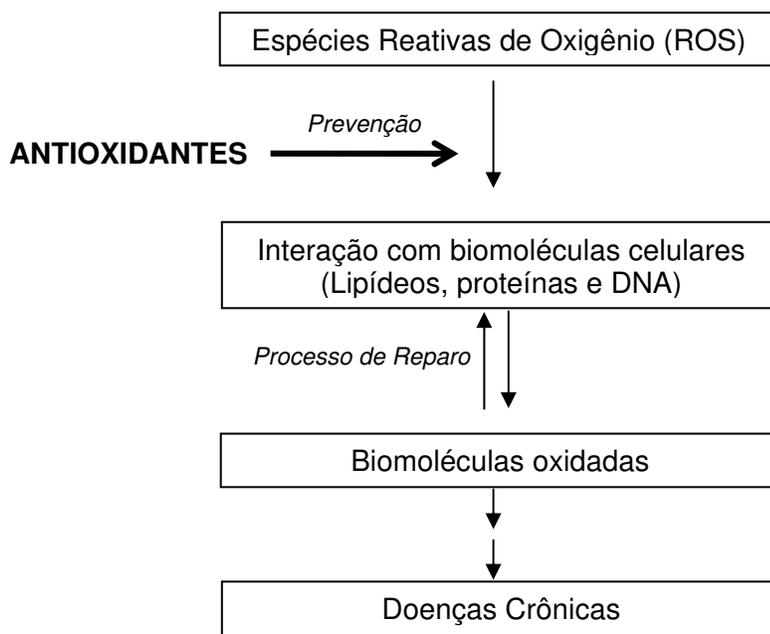


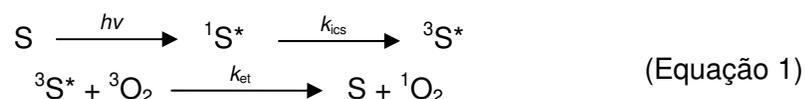
Figura 2. Atuação simplificada dos antioxidantes na diminuição do risco de doenças crônicas. Adaptado de Rao & Rao (2007).

2.2. Capacidade antioxidante e pró-oxidante de carotenoides

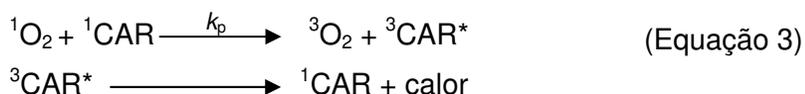
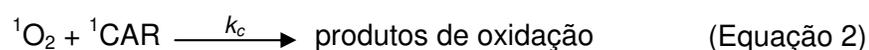
Um antioxidante é definido como “qualquer substância que, quando presente em baixas concentrações comparadas àquelas do substrato oxidável, retarda ou previne significativamente a oxidação” (Halliwell & Gutteridge, 2007). Huang, Ou & Prior (2005) apresentaram a definição de antioxidante como “qualquer substância, natural ou sintética, adicionada ao produto para prevenir ou atrasar sua deterioração pela ação do oxigênio do ar”, os quais sugerem que esta seja uma definição biologicamente relevante. O Instituto de Medicina, também citado por Huang, Ou & Prior (2005), define antioxidante, no âmbito da ciência de alimentos, como “uma substância presente em alimentos que diminui significativamente os efeitos adversos de espécies reativas, como espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, em funções fisiológicas normais em humanos”.

Entre as ROS, incluem-se espécies radicalares (radical peroxila (ROO^\bullet), ânion superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), radical hidroxila (HO^\bullet), radical hidroperoxila (HO_2^\bullet), radical alcóxila (RO^\bullet) e também espécies não radicalares, como o oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Os carotenoides estão envolvidos mais efetivamente no sequestro de duas ROS, o oxigênio singlete e os radicais peroxila (Stahl & Sies, 2002), sendo a longa cadeia de ligações duplas conjugadas a responsável por esta habilidade. Licopeno, β -caroteno, α -caroteno, β -criptoxantina e zeaxantina pertencem ao grupo dos carotenoides que apresentam maior capacidade de desativação de oxigênio singlete (Di Mascio, Kaiser & Sies, 1989).

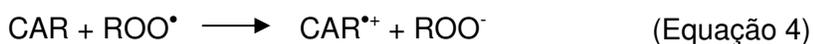
O oxigênio no estado singlete ($^1\text{O}_2$), uma forma de oxigênio altamente reativa, pode ser gerado por processos físicos, químicos e fotoquímicos. Um destes processos, chamado de fotossensibilização, ocorre através de um mecanismo de transferência de energia a partir do estado eletrônico tripleto excitado de uma molécula orgânica ou inorgânica, conhecida como sensibilizador (S), para o oxigênio molecular no estado eletrônico fundamental tripleto ($^3\text{O}_2$) (Equação 1), em que k_{ics} é a constante de intercruzamento de sistemas e k_{et} é a constante de transferência de energia.



Na presença de um antioxidante, como os carotenoides, o $^1\text{O}_2$ gerado pode ser desativado via processo químico (*quenching* químico), com formação de produtos de oxidação (Equação 2), ou mediante um processo físico (*quenching* físico) (Equação 3), envolvendo a transferência de energia de excitação do $^1\text{O}_2$ para o carotenoide, retornando o oxigênio ao seu estado fundamental ($^3\text{O}_2$) e levando o carotenoide ao estado tripleto excitado ($^3\text{CAR}^*$). A energia extra do carotenoide excitado é dissipada para o meio na forma de calor, permanecendo intacto, podendo ser utilizado novamente para inativar outro oxigênio singlete (Di Mascio, Kaiser & Sies, 1989; Stahl & Sies, 1993). As constantes de desativação química e de supressão física de oxigênio singlete estão representadas por k_c e k_p , respectivamente.



Os carotenoides também atuam como desativadores de radicais livres, e podem interagir com estas espécies de três maneiras, segundo as Equações 4-6 (Young, Phillip & Lowe, 2004; Cantrell & Truscott, 2004). A Equação 4 mostra a produção de um radical cátion carotenoide, como por exemplo, um β -carotenil a partir do β -caroteno, formado através de transferência de elétrons. A partir da abstração de hidrogênio, normalmente de uma posição alílica, tem origem um radical carotenoide neutro (Equação 5). Já o radical aduto de carotenoide é formado pela adição de espécies radicalares às ligações duplas (Equação 6).



O mecanismo e a taxa de desativação de radicais livres pelos carotenoides em solução são fortemente dependentes da natureza da ROS, sendo este fator mais importante que a estrutura do carotenoide. O β -caroteno, por exemplo, é muito reativo com radicais peroxila, mas muito menos com hidroxila e ânion superóxido, interagindo preferencialmente através da formação de aduto (Figura 3) (Young, Phillip & Lowe, 2004).

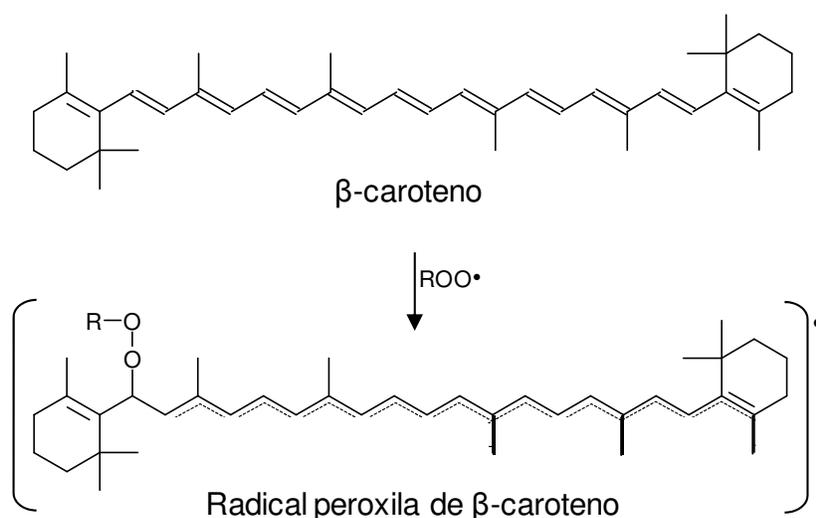


Figura 3. Formação do radical peroxila de β -caroteno

Porém, a estrutura do carotenoide também é relevante, e a natureza e a posição dos grupos substituintes podem afetar diretamente a capacidade antioxidante, uma vez que alteram a reatividade química do carotenoide e modificam o perfil de densidade eletrônica, além de influenciarem diretamente na sua localização e orientação na estrutura da bicamada lipídica e sua tendência em formar agregados sob condições polares. O licopeno, por exemplo, devido à sua estrutura aberta, apresenta maior capacidade de formar um radical catiônico que o β -caroteno (Young, Phillip & Lowe, 2004).

Outro fator que também interfere na interação dos carotenoides com os radicais livres é o ambiente celular, isto é, se estão em região lipídica ou aquosa (Young, Phillip & Lowe, 2004). Carotenos, como licopeno e β -caroteno, são extremamente hidrofóbicos e, por consequência, são encontrados predominantemente em regiões lipofílicas. Se o carotenoide estiver incorporado ao longo da membrana, a reação de transferência de elétrons (Equação 4) não será eficiente porque o ambiente apolar não permite a separação de cargas. Este mecanismo é mais viável para xantofilas, como a zeaxantina, que, por apresentarem grupos substituintes polares, se estendem pela membrana, tornando possível interceptar radicais da região aquosa na superfície da membrana celular (Cantrell & Truscott, 2004).

Por outro lado, alguns estudos apontam a capacidade dos carotenoides em atuar como pró-oxidante sob determinadas situações. Um estudo epidemiológico amplamente citado na literatura associou a suplementação de β -caroteno ao aumento da taxa de desenvolvimento de câncer de pulmão em indivíduos com maior propensão ao desenvolvimento da doença (fumantes e trabalhadores expostos ao amianto) (Omenn, Goodman & Thornquist, 1996). Entretanto, alguns questionamentos são relevantes com relação a este estudo, visto as doses oferecidas de 20 a 30 mg por dia serem altas (a recomendação em estudos epidemiológicos é de 4 mg ao dia), os trabalhadores eram fumantes excessivos e estavam continuamente expostos ao amianto, um conhecido cancerígeno.

Outros autores também verificaram uma ação pró-oxidante, dependente da concentração do carotenoide e do nível de oxigênio presente. Em alta pressão parcial de oxigênio (acima de 150 mm Hg), o β -caroteno atua como pró-oxidante devido à sua auto-oxidação, propagando a cadeia de oxidação lipídica, fato que é mais pronunciado em maiores concentrações do carotenoide. Em baixos níveis de oxigênio, como ocorre na maioria dos tecidos em condições fisiológicas, o β -caroteno age como antioxidante consumindo os radicais peroxila, interrompendo a reação em cadeia (Burton & Ingold, 1984; Young, Phillip & Lowe, 2004).

Além disso, Palozza et al. (2003) relataram que a concentração de 10 μM de β -caroteno aumentou a produção de ROS e os níveis de glutathiona celular oxidada, *in vitro*, em linhagens de células de adenocarcinomas de leucemia e cólon.

Considerando que na maioria dos tecidos biológicos o nível de oxigênio é baixo (5 a 15 mm Hg, 40 mm Hg e 100 mm Hg para tecidos, sangue venoso e pulmão, respectivamente), os carotenoides adquirem importância como agentes antioxidantes *in vivo* (Barreiros, David & David, 2006). Entretanto, algumas condições podem alterar os níveis normais de oxigênio nos tecidos, como, por exemplo, a presença de tumores. Ainda assim, os carotenoides podem agir diferentemente de acordo com a parte do organismo, como por exemplo, ser menos efetivo no pulmão, o que não significa que eles agiriam ali como pró-oxidantes (Young & Lowe, 2001).

2.3. Métodos de avaliação da capacidade antioxidante

Com base nas reações químicas envolvidas, os ensaios de capacidade antioxidante podem ser classificados segundo o mecanismo antioxidante, isto é, aqueles baseados na transferência de átomo de hidrogênio, como o método da capacidade de absorção de radicais de oxigênio (ORAC), e aqueles baseados na transferência de elétrons, como a capacidade antioxidante equivalente de Trolox (TEAC) (Huang, Ou & Prior, 2005). Vários métodos têm sido utilizados em alimentos, inclusive estes citados.

Para realização do ensaio que avalia a capacidade de desativação do radical peroxila (ORAC), são necessários três componentes: a) um gerador de radical, normalmente um composto azo, como o 2,2'-azobis(2-amidinopropano)di-hidroclorato (AAPH); b) uma sonda ou *probe*, que é um composto fluorescente usado para monitorar o progresso da reação; c) amostra cuja capacidade antioxidante será avaliada (Huang, Ou & Prior, 2005).

Ou, Hampsch-Woodill & Prior (2001) substituíram a *probe* utilizada no método original (β -ficoeritrina) pela fluoresceína (3',6'-diidroxí-espiro[isobenzofurano-1[3H],9'[9H]-xanten-3-ona), que não apresenta as mesmas limitações da β -ficoeritrina. Este novo método fornece uma medida direta da capacidade antioxidante de quebra de cadeia contra os radicais peroxila por compostos hidrofílicos e lipofílicos (Huang, Ou & Prior, 2005). O radical ROO^{\bullet} é gerado por decomposição térmica do AAPH, a 37 °C, e oxida a fluoresceína, dando origem a produtos não fluorescentes, de forma que a fluorescência diminui rapidamente. Na presença de um composto que tenha capacidade de desativar

esse radical, como os carotenoides, o decaimento da fluorescência ocorrerá numa taxa menor, já que eles competirão com a *probe* pelo radical e sofrerão oxidação concomitantemente (Figura 4). Desta forma, quanto maior a capacidade de um composto em desativar o radical ROO^\bullet , mais lento ocorrerá o decaimento da fluorescência.

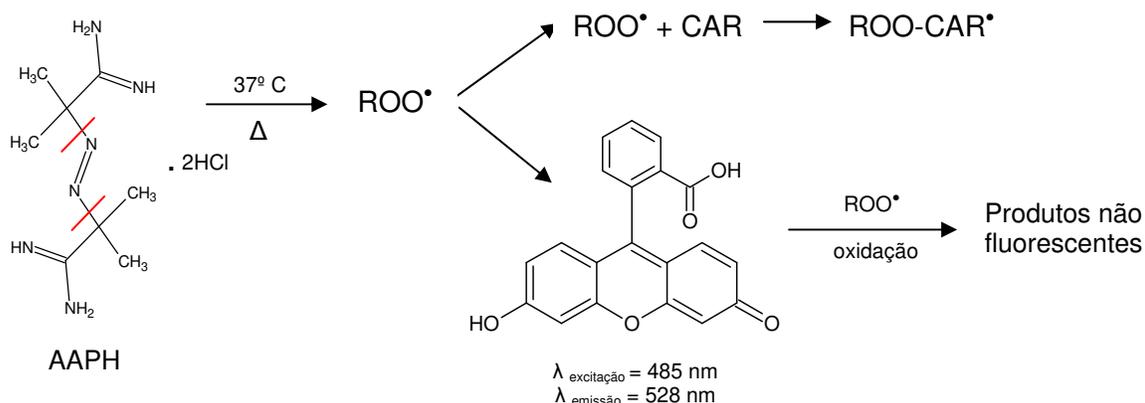


Figura 4. Mecanismo de desativação do radical ROO^\bullet pelo método ORAC.

O método descrito por Re et al. (1999) é considerado um método indireto, pois o valor da capacidade antioxidante equivalente de trolox (TEAC) caracteriza a capacidade da amostra avaliada em reagir com o radical 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato) ($\text{ABTS}^{\bullet+}$) e não de inibir diretamente o processo oxidativo (Roginsky & Lissi, 2005). Dois componentes são utilizados para realização deste ensaio: o antioxidante, composto ou amostra a serem avaliados, e o oxidante ($\text{ABTS}^{\bullet+}$), que abstrai um elétron do antioxidante, sofrendo modificação na sua cor. O grau de mudança na cor é proporcional à concentração do antioxidante (Huang, Ou & Prior, 2005).

O ensaio com radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$ constitui uma técnica que mede a descoloração de um radical estável ($\text{ABTS}^{\bullet+}$), gerado antes da reação na presença do composto a ser avaliado. A adição do antioxidante reduz o $\text{ABTS}^{\bullet+}$ tornando-o incolor e, por consequência, diminui a absorvância, em uma extensão e escala de tempo dependente da atividade e concentração do composto antioxidante, bem como da duração da reação. A extensão dessa descoloração é determinada como porcentagem de inibição em função da concentração ou tempo, calculada em relação à reatividade do trolox, como um antioxidante de referência, nas mesmas condições (Re et al., 1999). A formação do radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$ pelo persulfato de potássio e sua estabilização por um antioxidante, que o

reduz novamente à ABTS promovendo a supressão da cor, são representadas na Figura 5.

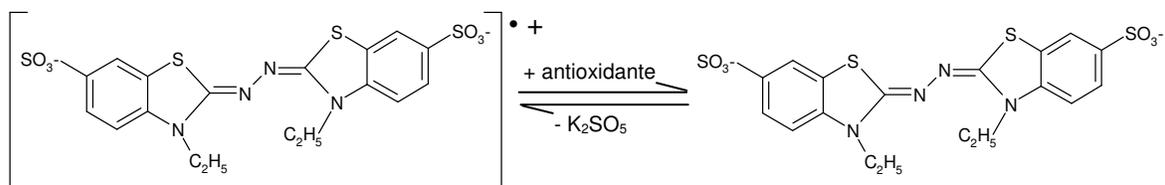


Figura 5. Formação e desativação do cátion radical ABTS^{•+}. Adaptado de Huang, Ou & Prior (2005).

O TEAC é um método muito popular por ser operacionalmente simples, podendo ser utilizado como uma triagem, mas este radical não é encontrado em sistemas biológicos, o que vem gerando muita discussão sobre o seu uso. Em contrapartida, o método ORAC é considerado relevante para sistemas biológicos porque está relacionado ao mais abundante dos radicais livres, o radical peroxila (ROO[•]) (Rodríguez-Amaya, 2010). A Tabela 1 agrega os valores de TEAC e ORAC apresentados para diversos carotenoides obtidos por diferentes autores.

Miller et al. (1996) compararam a capacidade antioxidante de diferentes carotenos e xantofilas em sistemas homogêneos através da sua capacidade em desativar o radical ABTS^{•+}. Os resultados mostraram que esta capacidade dos carotenos aumenta com a extensão do cromóforo e diminui na presença de anéis terminais. Outro fator que modula a capacidade em reduzir o ABTS^{•+} é a presença de grupos funcionais polares, ocasionando um efeito supressor pelas carbonilas e, aparentemente, nenhum efeito pela inserção de um grupo hidroxila. Em resumo, a sequência para a capacidade de desativação do radical foi licopeno > β-caroteno ~ β-criptoxantina > luteína ~ zeaxantina > α-caroteno > cantaxantina = astaxantina.

Re et al. (1999) desenvolveram uma técnica mais apropriada para o ensaio com o radical ABTS^{•+}. Nesta nova proposta, como já citado anteriormente, o radical é gerado diretamente em uma forma estável antes da reação com o antioxidante a ser avaliado através de uma reação com permanganato de potássio, diferentemente do dióxido de manganês utilizado por Miller et al. (1996). Segundo os autores, esta é uma técnica que pode ser utilizada para compostos hidrofílicos e lipofílicos, sendo avaliados em seus ensaios dois carotenoides, o licopeno e o β-caroteno, cujos valores de TEAC se encontram na Tabela 1.

Tabela 1. Valores médios da capacidade antirradical livre de diferentes carotenoides.

Referência	Carotenoide	TEAC	ORAC
Miller et al. (1996)	Licopeno	2,9	n.d. ¹
	β-criptoxantina	2,0	n.d.
	β-caroteno	1,9	n.d.
	Luteína	1,5	n.d.
	Zeaxantina	1,4	n.d.
	α-caroteno	1,3	n.d.
	Astaxantina	0,03	n.d.
	Cantaxantina	0,02	n.d.
Re et al. (1999)	Licopeno	3,08	n.d.
	β-caroteno	2,57	n.d.
Bohm et al. (2002)	<i>cis</i> -licopeno 1, 2 e 3	3,1	n.d.
	<i>cis</i> -licopeno 4	2,7	n.d.
	Licopeno	2,5	n.d.
	13'- <i>cis</i> -α-caroteno	1,9	n.d.
	9'- <i>cis</i> -α-caroteno	1,6	n.d.
	α-caroteno	1,5	n.d.
	β-caroteno	1,4	n.d.
	9- <i>cis</i> -β-caroteno	1,4	n.d.
	13- <i>cis</i> -zeaxantina	1,3	n.d.
	15- <i>cis</i> -β-caroteno	1,2	n.d.
	9- <i>cis</i> -α-caroteno	1,2	n.d.
	13- <i>cis</i> -α-caroteno	1,2	n.d.
	Zeaxantina	1,1	n.d.
	13- <i>cis</i> -β-caroteno	1,0	n.d.
9- <i>cis</i> -zeaxantina	0,5	n.d.	
Barreto (2008)	β-caroteno	1,80	n.d.
	Zeaxantina	1,63	n.d.
	β-criptoxantina	1,47	n.d.
	β-apo-8'-carotenal	1,25	n.d.
	Astaxantina	0,82	n.d.
	β-apo-12'-carotenal	0,36	n.d.
	β-apo-10'-carotenal	0,32	n.d.
Zulueta, Esteve & Frígola (2009)	β-caroteno	240 (μM TE ²)	582 (μM TE)
	Luteína	40 (μM TE)	1.247 (μM TE)
	Zeaxantina	31 (μM TE)	1.108 (μM TE)

¹ n.d. = não determinado² TE = equivalente a trolox

A capacidade de desativação do radical ABTS^{•+} de dezessete isômeros geométricos de carotenoides também foi investigada. Três isômeros *cis* de licopeno mostraram valores maiores de atividade antioxidante quando comparados à forma *trans* e, quando comparados ao *all-trans*-β-caroteno, esses isômeros apresentaram um valor de TEAC duas vezes maior. Por outro lado, todos os isômeros de β-caroteno (*all-trans*, *9-cis*, *13-cis* e *15-cis*) não apresentaram diferença estatística ($p < 0,05$) na capacidade antioxidante. O carotenoide que apresentou o menor valor de TEAC foi a *9-cis*-zeaxantina, sendo menor que a metade do valor do *all-trans*-β-caroteno (Bohm et al., 2002)

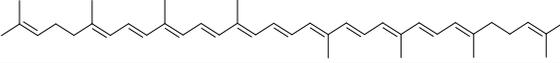
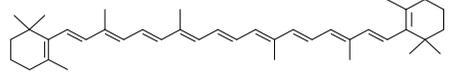
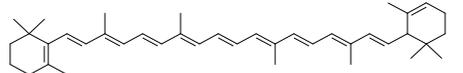
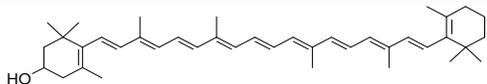
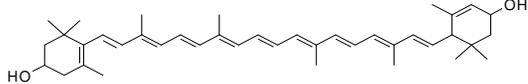
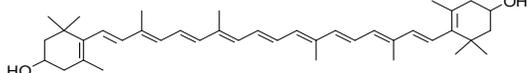
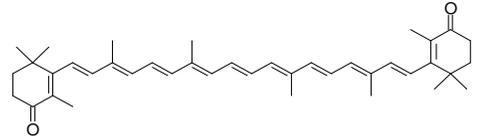
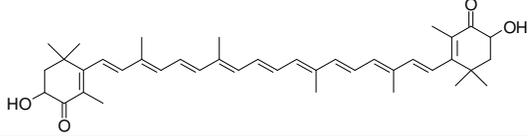
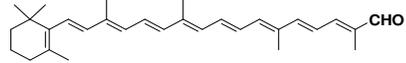
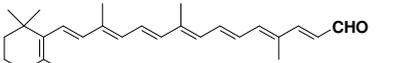
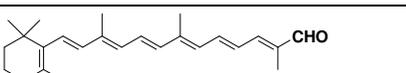
Barreto (2008) estudou a capacidade antirradical livre frente ao ABTS^{•+} de padrões de carotenoides. Os valores de TEAC variaram de 0,32 a 1,8, apresentando a seguinte ordem, a iniciar pelo maior: β-caroteno, zeaxantina, β-criptoxantina, β-apo-8'-carotenal, astaxantina, β-apo-12'-carotenal e β-apo-10'-carotenal. Os resultados mostraram que menor número de ligações duplas conjugadas e/ou a presença do grupo carbonila na molécula reduziram a capacidade de desativação do radical avaliado.

Zulueta, Esteve & Frígola (2009) mediram a capacidade antioxidante de três carotenoides (β-caroteno, luteína e zeaxantina) pelos métodos ORAC e TEAC. Utilizando a mesma concentração de carotenoide (0,001 mg/mL), o valor de TEAC foi maior para o β-caroteno, seguido pela luteína e por último a zeaxantina. Entretanto, com o método ORAC, as xantofilas apresentaram maiores valores que o caroteno, sendo o maior encontrado para a luteína, seguido pela zeaxantina. Este fato, segundo as autoras, pode ser devido à presença dos grupos hidroxila nos anéis terminais.

Nota-se uma grande diferença entre os valores obtidos por um dos autores citados. Esta diversidade é devida à diferença no modo como são realizados os cálculos e o próprio experimento, como por exemplo, a maneira como o radical ABTS^{•+} foi gerado e os solventes utilizados. Com relação aos cálculos de TEAC, Miller et al. (1996), Re et al. (1999), Bohm et al. (2002) e Barreto (2008), utilizaram os coeficientes angulares das curvas de absorvância em função de diferentes concentrações do composto avaliado e do padrão de referência, enquanto que Zulueta, Esteve & Frígola (2009) obtiveram os valores da capacidade antioxidante a partir da interpolação da porcentagem de inibição da amostra na curva de calibração do padrão de referência, utilizando uma concentração fixa de 0,001 mg/mL para cada composto.

O Quadro 1 apresenta as estruturas, ressaltando algumas de suas particularidades, dos carotenoides já estudados com relação à capacidade de desativação do radical ABTS^{•+}.

Quadro 1. Características estruturais de diferentes carotenoides.

Composto	Estrutura	Características Estruturais	
		Número l.d.c.	Grupos Terminais
Licopeno		11 l.d.c.	2 ψ -
β-caroteno		11 l.d.c.	2 anel β -
α-caroteno		10 l.d.c.	1 anel β 1 anel ε -
β-criptoxantina		11 l.d.c.	2 anel β 1 OH
Luteína		10 l.d.c.	1 anel β 1 anel ε 2 OH
Zeaxantina		11 l.d.c.	2 anel β 2 OH
Cantaxantina		11 l.d.c.	2 anel β 2 carb. ^a
Astaxantina		11 l.d.c.	2 anel β 2 OH 2 carb. ^a
8'-apo-β-carotenal		9 l.d.c.	1 anel β 1 ald. ^b
10'-apo-β-carotenal		8 l.d.c.	1 anel β 1 ald. ^b
12'-apo-β-carotenal		7 l.d.c.	1 anel β 1 ald. ^b

^acarb. = carbonila^bald. = aldeído

l.d.c. = ligações duplas conjugadas

2.4. Produtos de degradação de carotenoides

Devido ao extenso sistema de ligações duplas conjugadas, os carotenoides apresentam elevada instabilidade, deixando-os susceptíveis à degradação por altas temperaturas, baixo pH, presença de luz, enzimas lipoxigenases e ROS, podendo facilmente sofrer isomerização e oxidação, sendo que muitas dessas situações são inerentes a diversos tipos de processamento e estocagem de alimentos, como por exemplo o processamento térmico, o processamento mínimo e a exposição à luz

fluorescente em supermercados. Esta degradação leva à redução da quantidade total de carotenoides, além do fato de que os produtos de degradação formados podem conferir alterações na cor e nas propriedades biológicas. Os isômeros *cis*, por exemplo, são termodinamicamente mais instáveis que os seus correspondentes isômeros *trans*, e apresentam menor atividade de vitamina A, além de causarem a diminuição na cor (Mercadante, 2008a; Borsarelli & Mercadante, 2010). A Figura 6 demonstra um mecanismo simplificado das mudanças que são esperadas no processo de degradação térmica dos carotenoides.

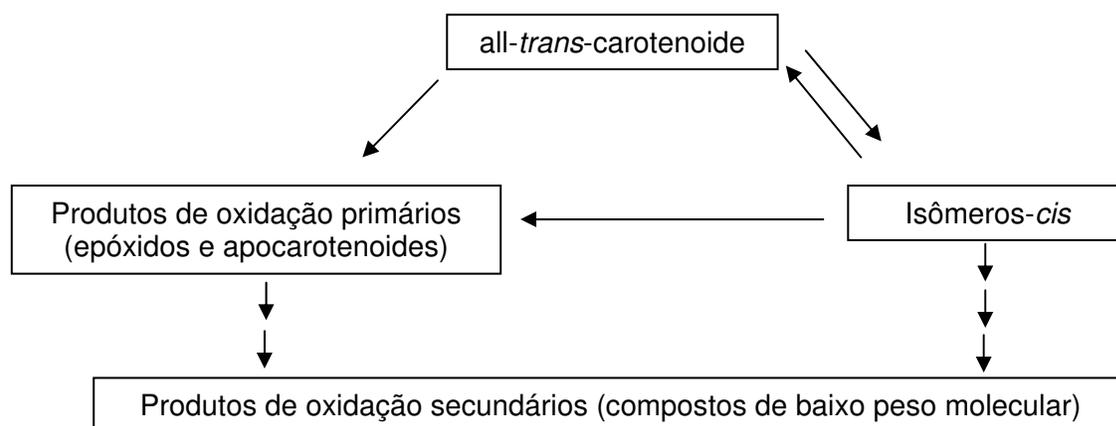


Figura 6. Mudanças estruturais dos carotenoides ocorridas devido ao tratamento térmico. Adaptado de Borsarelli & Mercadante (2010).

Na natureza, a forma *all-trans* é predominante, exceto no caso da bixina, embora pequenas quantidades de isômeros *cis* também tenham sido relatadas. Geralmente, a oxidação dos carotenoides ocorre acompanhada de isomerização, sendo que tanto a forma *cis* quanto a *trans* estão sujeitas à oxidação. Produtos de oxidação de carotenoides podem ser formados *in vitro* como resultado de sua ação pró ou antioxidante ou pela auto-oxidação pelo oxigênio molecular (Caris-Veyrat, 2008). A liberação de ácidos orgânicos no processamento de sucos de fruta, por exemplo, é suficiente para catalisar a transformação de 5,6-epóxido em 5,8-furanoide (Mercadante e Rodriguez-Amaya, 1998). Os produtos de oxidação também podem ser encontrados naturalmente, possivelmente como metabólitos (Caris-Veyrat, 2008), como por exemplo, a violaxantina, derivado 5,6,5',6'-diepóxi da zeaxantina.

Devido a essas mudanças que podem ocorrer na estrutura dos carotenoides, torna-se muito relevante a identificação dos produtos formados. Os carotenoides de

estrutura conhecida podem ser conclusivamente identificados mediante, no mínimo, as seguintes informações: comportamento cromatográfico, espectro de absorção UV-Visível (UV-Vis) e espectro de massas (MS). Algumas derivatizações químicas também podem ser usadas para confirmar a presença e número de grupos funcionais em xantofilas, além da comparação desses parâmetros com padrões autênticos. A espectrometria de massas e a espectroscopia de ressonância magnética nuclear são técnicas indispensáveis para a elucidação da estrutura de um carotenoide desconhecido (Liaaen-Jensen, 1995; Delgado-Vargas & Paredes-López, 2003; Mercadante, 2008b).

O espectro UV-Vis, que inclui características sobre o comprimento de onda máximo (λ_{\max}), estrutura fina espectral (%III/II) e intensidade do pico *cis* (% A_B/A_{II}) (Figura 7), é sempre examinado por fornecer informações a respeito do cromóforo da molécula, além de algumas informações sobre grupos funcionais e anéis conjugados à cadeia poliênica. O espectro de massas fornece a massa molecular e o padrão característico de seus fragmentos indica a presença de alguns grupos funcionais na estrutura do carotenoide (Delgado-Vargas & Paredes-López, 2003; Mercadante, 2008b).

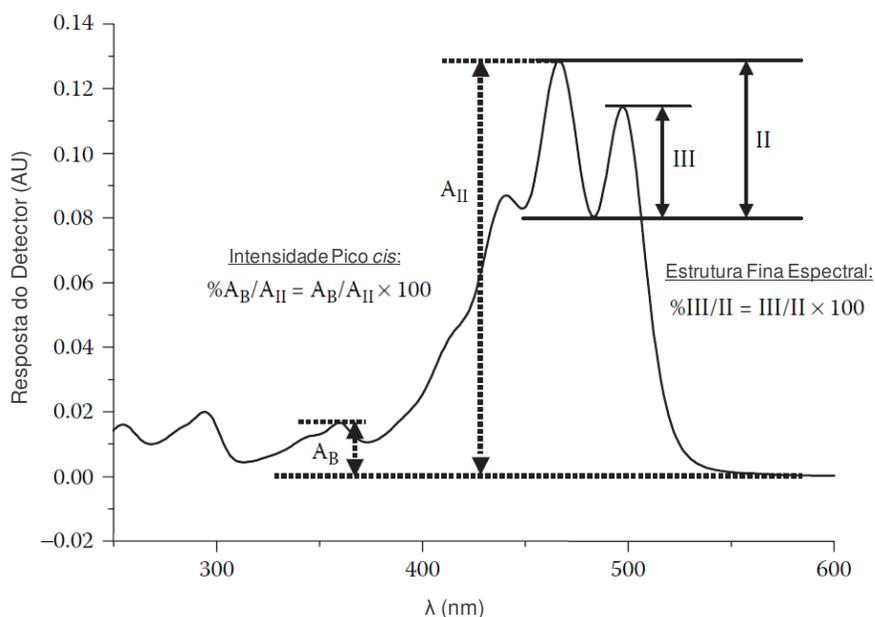


Figura 7. Indicação do cálculo da estrutura fina e da intensidade do pico *cis*. Adaptado de Mercadante (2008b).

Técnicas modernas como a cromatografia líquida de alta eficiência acoplada aos detectores de arranjo de diodos e espectrômetro de massas (HPLC-DAD-MS)

proporcionam, ao mesmo tempo, informações a respeito do cromóforo e do peso molecular para cada composto individualmente. Esta técnica já foi utilizada para separar e identificar isômeros e produtos de oxidação de carotenoides (De Rosso & Mercadante, 2007; Faria et al., 2009; Zepka & Mercadante, 2009).

Os alimentos são sistemas complexos e o comportamento de seus componentes não são facilmente explicados. Desta forma, é comum estudar os componentes isoladamente através de sistemas-modelo (Delgado-Vargas & Paredes-López, 2003). Pelo maior controle das condições de estudo, o uso de sistemas-modelo para avaliar informações sobre a degradação dos carotenoides, como o mecanismo e a cinética, apresenta maior facilidade no monitoramento da formação dos compostos iniciais, intermediários e finais, quando comparados aos sistemas alimentícios. Todavia, deve-se ser cauteloso ao extrapolar os dados obtidos em sistemas-modelo para os alimentos, uma vez que não refletem a complexidade dos multicomponentes presentes nos alimentos e as interações que podem ocorrer entre eles (Mercadante, 2008a).

Os estudos sobre estabilidade de carotenoides em sistemas-modelo são focados principalmente no β -caroteno, sendo a degradação térmica uma das condições mais avaliadas. O efeito do aquecimento do β -caroteno sob diferentes condições é encontrado na literatura, como por exemplo, sistema contendo β -caroteno, clorofila *a* e ésteres de ácidos graxos aquecidos a 60 °C e 120 °C por diferentes tempos (Liu & Chen, 1998), utilização da temperatura de 98 °C em β -caroteno e luteína dissolvido em tolueno em atmosfera de nitrogênio (Aman, Schieber & Carle, 2005) e padrão de β -caroteno cristalizado na presença e ausência de ar submetido à 40, 90 e 140 °C (Qiu, Chen & Li, 2009).

Ainda que mais escassos, estudos que avaliaram carotenoides diferentes do β -caroteno podem ser encontrados. O efeito da temperatura sobre a degradação de β -criptoxantina foi estudado por Zepka & Mercadante (2009). Através de um sistema simulador de suco, foi avaliado o efeito da temperatura de 90 °C sobre *all-trans*- β -criptoxantina, sendo identificados os seguintes produtos de degradação térmica: os isômeros 15-*cis*, 9-*cis*, 9'-*cis*, 13-*cis* e 13'-*cis*- β -criptoxantina e os produtos de oxidação 5,6-epóxi- β -criptoxantina e 12'- β -apo-carotenal. As autoras propuseram um mecanismo de degradação que envolve simultaneamente reações reversíveis (isomerização) e também irreversíveis (oxidação), sendo que a isomerização ocorre em maior proporção, quando considerados apenas os produtos não voláteis, uma vez que os voláteis são preferencialmente formados. Dentre os isômeros, formaram-se predominantemente 13-*cis* e 13'-*cis*- β -criptoxantina, seguidos por 9-*cis* e 9'-*cis*- β -criptoxantina e por último 15-*cis*- β -

criptoxantina. Entretanto, as cinéticas de degradação do *all-trans* e de formação dos produtos não foram apresentadas neste trabalho.

De forma geral, algumas conclusões puderam ser obtidas a partir de sistemas-modelo de carotenoides submetidos ao aquecimento (Mercadante, 2008a):

(1) a principal reação que ocorre durante o aquecimento à pressão atmosférica e temperaturas abaixo de 100 °C é a isomerização;

(2) a formação de produtos de oxidação, como epóxidos e apocarotenoides, ocorre em condições extremas que combinam temperatura, pressão e tempo, e

(3) o isômero 13-*cis* é formado em maior quantidade que o 9-*cis*, uma vez que a energia de ativação para a isomerização de *trans* para *cis* na ligação dupla do carbono central é menor que na ligação dupla de outros pontos da molécula.

Desta forma, para obter preferencialmente a formação de produtos de oxidação, o carotenoide deve ser submetido à outra condição de degradação ao invés do aquecimento. Em um estudo realizado por Rodriguez e Rodriguez-Amaya (2007), o β -caroteno foi exposto à epoxidação pela ação do ácido *m*-cloroperbenzoico (MCPBA), com o objetivo de facilitar a identificação destes carotenoides em alimentos processados, como em damasco seco e em suco de manga e de acerola. Através da técnica HPLC-DAD-MS, a separação foi efetuada em coluna C₁₈ monomérica, utilizando gradiente de acetonitrila (com 0,05 % trietilamina - TEA), metanol e acetato de etila, com fluxo de 0,5 mL/min, acoplado aos detectores de arranjo de diodos (DAD) e *electron impact mass*. Os compostos identificados e suas características estão na Tabela 2, sendo formados majoritariamente 5,6-epóxi- β -caroteno, 5,8-epóxi- β -caroteno, 5,6,5',6'-diepóxi- β -caroteno, 5,6,5',8'-diepóxi- β -caroteno e 5,8,5',8'-diepóxi- β -caroteno, a partir dos quais foi proposta uma possível sequência de formação (Figura 8). Todos estes epóxidos foram encontrados em pelo menos uma das amostras de alimentos avaliadas. As mesmas autoras (2009) realizaram um trabalho semelhante utilizando o licopeno ao invés do β -caroteno. Entretanto, em nenhum destes estudos foi avaliado o efeito antioxidante ou biológico que tais produtos de oxidação apresentam.

Tabela 2. Características dos espectros UV-Vis e de massas obtidas por HPLC-DAD-MS dos produtos formados pela reação de epoxidação do β -caroteno.

Derivado de β -caroteno	λ_{\max} (nm) ^a	$\neq \lambda_{\max}$ ^b	% III/II	% A _B /A _{II}	[M] ⁺ (m/z)	MS (m/z)
5,6,5',6'-diepóxido	418, 443, 472	-12	88	0	568	488, 422, 205, 165
5,6,5',8'-diepóxido	401, 424, 450	-31	91	0	568	488, 422, 205, 165
5,8,5',8'-diepóxido	381, 403, 427	-52	102	0	568	488, 422, 205, 165
5,6-epóxido	(422), 449, 477	-6	57	0	552	472, 406, 205, 165
13- <i>cis</i> -5,6-epóxido	334, 439, 475	-16	n.c. ^c	32	552	472, 406, 205, 165
5,8-epóxido	(407), 430, 456	-25	58	0	552	472, 406, 205, 165
13- <i>cis</i> -5,8-epóxido	317, (395) 425, 449	-30	n.c.	33	552	472, 406, 205, 165
<i>all-trans</i>	(428), 455, 482	0	22	0	536	444, 430, 399
13- <i>cis</i>	341, (421) 448, (473)	-7	n.c.	46	536	444, 430, 399

Fonte: Rodriguez e Rodriguez-Amaya (2007).

^a Gradiente acetonitrila:MeOH:acetato de etila

^b Cálculo da diferença do λ_{\max} do composto de degradação em relação ao *all-trans*- β -caroteno.

^c n.c.: não calculado

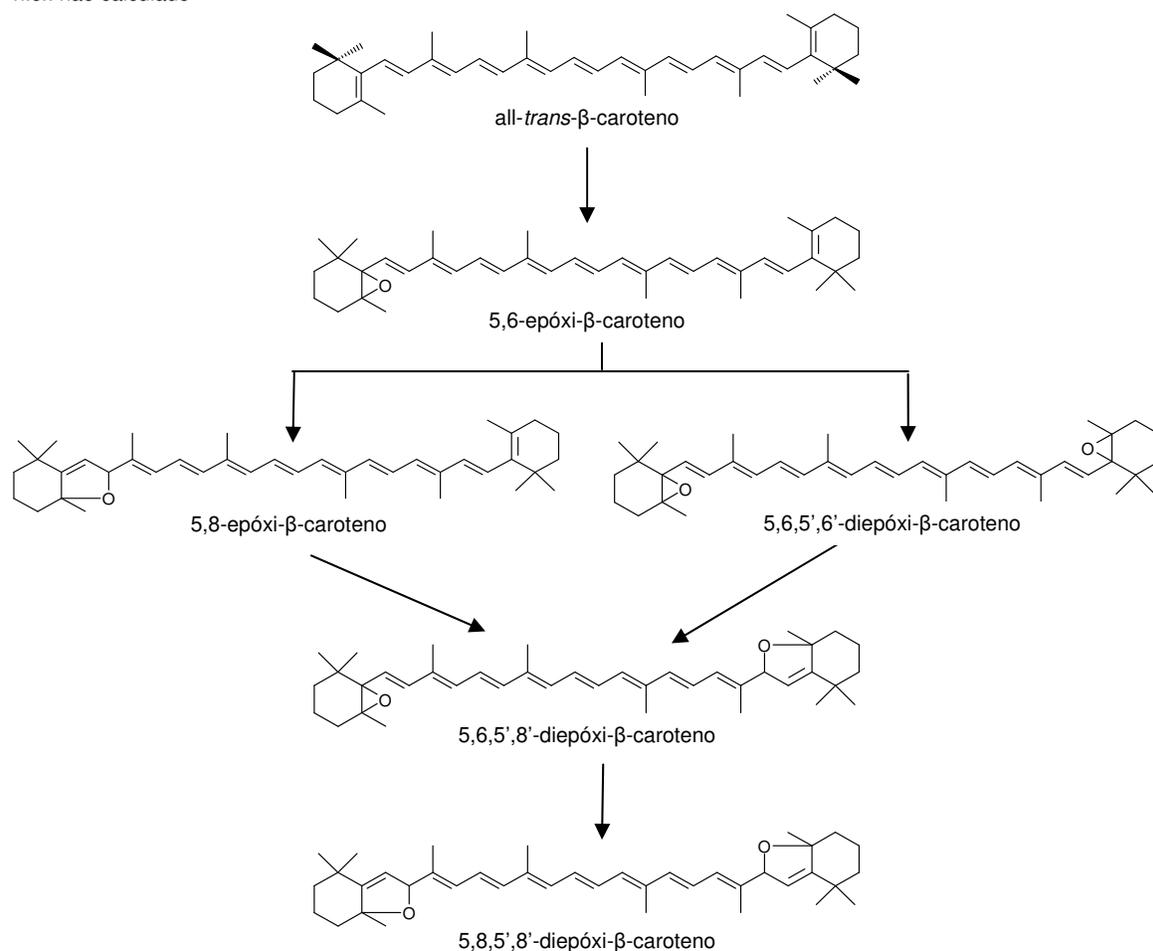


Figura 8. Sequência de formação de epóxi-carotenoides de β -caroteno com MCPBA, proposta por Rodriguez & Rodriguez-Amaya (2007).

3. OBJETIVOS

Considerando que a série de ligações duplas conjugadas presente na estrutura dos carotenoides é responsável tanto pela baixa estabilidade como pela capacidade antioxidante destes compostos, este trabalho teve dois objetivos principais: (1) avaliar o impacto do aquecimento na formação de compostos de degradação não voláteis de β -criptoxantina em sistema simulador de suco, e (2) verificar a influência da formação de epóxi-carotenoides derivados do β -caroteno na capacidade antioxidante.

Para atendê-los, procedeu-se a busca dos seguintes objetivos específicos:

- Identificar, por cromatografia líquida de alta eficiência-detector de arranjo de diodos-espectrometria de massas (HPLC-DAD-MS/MS), os compostos de degradação formados durante o aquecimento de β -criptoxantina a 90 °C em sistema simulador de suco;
- Acompanhar o perfil de degradação da β -criptoxantina e de formação dos compostos de degradação por cromatografia líquida de alta eficiência;
- Produzir epóxidos de β -caroteno a partir da reação com ácido *m*-cloroperbenzoico (MCPBA), na presença e ausência de NaHCO_3 ;
- Identificar, por HPLC-DAD-MS/MS, os compostos formados a partir da reação de β -caroteno com MCPBA;
- Avaliar, através dos métodos de desativação do radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$ e do radical peroxila (ORAC), a capacidade antioxidante conjunta do β -caroteno e dos produtos derivados da reação de epoxidação com MCPBA.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Materiais

Para o desenvolvimento do trabalho proposto foram utilizados dois padrões de carotenoides: β -criptoxantina (99,5 % *all-trans*), doado pela DSM Nutritional Products (Suíça), e β -caroteno (95 % *all-trans*), adquirido da Sigma-Aldrich (EUA). Além destes padrões, também foram utilizados o 12'-apo- β -carotenal e o 10'-apo- β -carotenal, doados pela DSM Nutritional Products (Suíça), ambos com pureza maior que 98 %.

O ácido *meta*-cloroperbenzoico (MCPBA), também encontrado pelos nomes *meta*-cloroperoxibenzoico ou 3-cloroperbenzoico, 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato) (ABTS), 2,2'-azobis-(2-amidinopropano)di-hidrocloreto (AAPH), ácido 6-hidróxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico (trolox), tiosulfato de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$), persulfato de potássio (K_2SO_5) e sal de fluoresceína também foram obtidos da Sigma-Aldrich (EUA). A β -ciclodextrina randomicamente metilada (RMCD) foi proveniente da Cyclodextrin Technologies Development Inc. (EUA).

Os solventes metanol (MeOH) e éter metil *terc*-butílico (MTBE) para uso em HPLC foram adquiridos da Merck (Alemanha). Bicarbonato de sódio (NaHCO_3) e sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4) foram adquiridos da Labsynth (Brasil). Os demais reagentes, todos de pureza analítica, foram também obtidos da Labsynth (Brasil). A água destilada foi purificada pelo sistema Milli-Q Plus (Millipore, EUA).

A filtração dos extratos e dos solventes para análise por HPLC foi realizada em membranas de polietileno (Millipore, EUA), com porosidade 0,22 e 0,45 μm , respectivamente.

4.2. Sistema simulador de suco

Para completa dissolução dos cristais de carotenoides, o padrão de β -criptoxantina foi dissolvido em acetato de etila (EtOAc) e submetido a ultrassom por 15 minutos, sendo posteriormente concentrado sob fluxo de nitrogênio até um volume de cerca de 1 mL, momento no qual foi adicionado cerca de 1 mL de etanol (EtOH). Em seguida, o extrato foi diluído em etanol até completar o volume que proporcionasse uma solução de concentração 20 $\mu\text{g/mL}$, medida através da Lei de Beer (equação 7), em espectrofotômetro de arranjo de fotodiodos (Agilent, modelo 8453, EUA), considerando a

absorbância (abs) a 450 nm e o valor do coeficiente de extinção ($E_{1\text{cm}}^{\%}$) de 2386 para β -criptoxantina em éter de petróleo (Britton, 1995).

$$\text{Concentração } (\mu\text{g/mL}) = \frac{\text{abs} \times 10^4}{E_{1\text{cm}}^{\%}} \times \text{FD} \quad (\text{Equação 7})$$

O sistema simulador de suco foi constituído pela solução etanólica de β -criptoxantina adicionada a água Milli-Q acidificada (pH ajustado com ácido cítrico para 3,8) na proporção de 1:4, de forma que cada tubo contivesse inicialmente cerca de 100 μg de β -criptoxantina. Os tubos de vidro com tampa de rosca foram selados e levados a banho-maria com temperatura de 90 °C. O aquecimento foi conduzido a intervalos regulares, caracterizando os tempos 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 45, 60, 75, 90, 105, 120, 150, 180, 240 e 300 minutos. Cada tempo de aquecimento foi realizado, no mínimo, em triplicata.

Após cada tempo de aquecimento, os tubos foram colocados em banho de gelo por 5 minutos e os carotenoides extraídos com acetato de etila em agitador do tipo “vortex” (Phoenix, modelo AP 56, Brasil) durante 1 minuto. A fase orgânica foi transferida para um funil de separação e submetida a lavagens com água destilada até que o pH do extrato fosse o mesmo da água de lavagem. O solvente foi então evaporado sob fluxo de nitrogênio e as amostras armazenadas a -37 °C para posterior análise por HPLC. A Figura 9 apresenta um esquema simplificado do procedimento realizado.

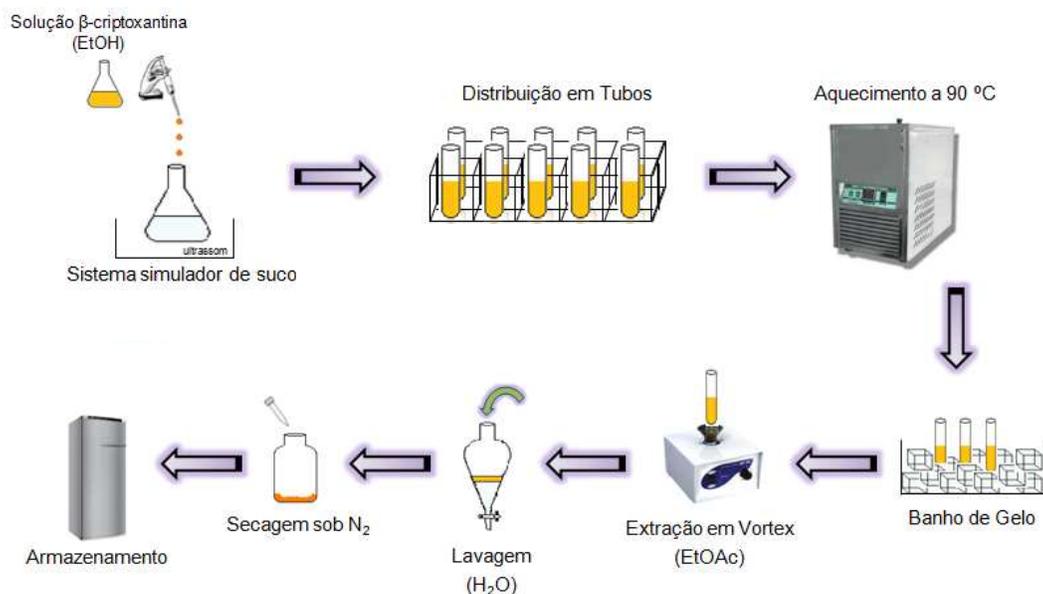


Figura 9. Procedimento para avaliar a degradação térmica de β -criptoxantina em sistema simulador de suco.

4.3. Reação de epoxidação do β -caroteno com MCPBA

A obtenção de epóxi-carotenoides derivados do β -caroteno foi realizada através da reação com MCPBA, tomando por base as metodologias descritas por Barua & Olson (2001) e por Rodriguez & Rodriguez-Amaya (2007). O procedimento adotado está esquematizado na Figura 10.

Uma solução de 10 mg de β -caroteno em 10 mL de diclorometano resfriado foi adicionada a uma solução aquosa, de mesmo volume, de NaHCO_3 saturada (Figura 10-1). A esta mistura, foi adicionada por gotejamento, sob vigorosa agitação, uma solução de 10 mL de MCPBA (3 mmol equivalente) em diclorometano resfriado (2). Após o completo gotejamento do ácido, a solução ficou sob agitação vigorosa por dois tempos diferentes (0 e 30 minutos) (3), com a finalidade de se obter diferentes proporções dos epóxidos formados. Após este período, a mistura passou por sucessivas lavagens com solução aquosa 20 % de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, solução aquosa saturada de NaHCO_3 e água destilada (4) até que o pH atingisse o da água de lavagem. A água residual da fase orgânica foi retirada com Na_2SO_4 anidro (5) e o solvente evaporado sob fluxo de nitrogênio (6).

Priorizando a formação de 5,8-epóxido, o mesmo procedimento descrito acima foi realizado, exceto pela adição da solução saturada de NaHCO_3 na etapa 1, perfazendo um total de quatro condições (Quadro 2), cada qual realizada em triplicata.

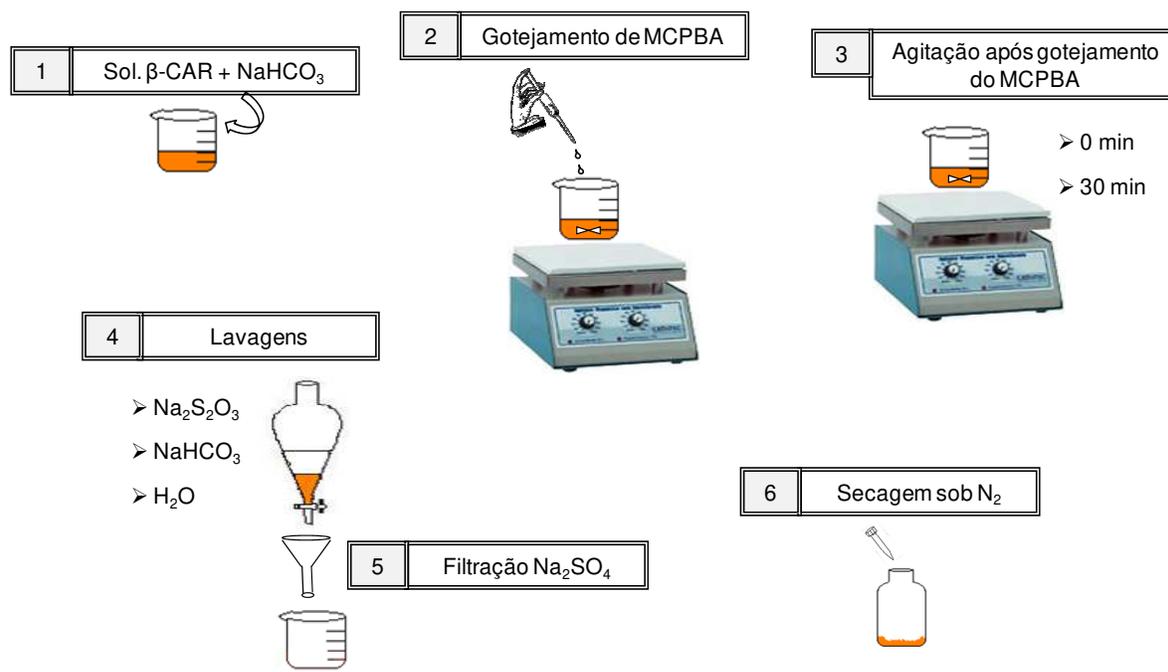


Figura 10. Esquema simplificado da reação de epoxidação do β -caroteno com MCPBA.

Quadro 2. Condições utilizadas na epoxidação do β -caroteno.

	Sigla	Adição de NaHCO₃ na solução de β-caroteno	Tempo de agitação após adição de MCPBA
Condição 1	0-c	Sim	0 minutos
Condição 2	30-c	Sim	30 minutos
Condição 3	0-s	Não	0 minutos
Condição 4	30-s	Não	30 minutos

4.4. Identificação dos compostos de degradação por HPLC-DAD-MS/MS

A identificação dos compostos de degradação não voláteis formados durante o aquecimento da β -criptoxantina e dos produtos da reação de epoxidação do β -caroteno com MCPBA foi baseada na combinação dos seguintes parâmetros: ordem de eluição cromatográfica em coluna de fase reversa C₃₀, características do espectro UV-Visível (comprimento de onda máximo (λ_{\max}), estrutura fina espectral (% III/II) e intensidade do pico *cis* (% A_B/A_{II}) – Figura 7), espectro de massas (molécula protonada e fragmentos) e comparação com dados já reportados pela literatura.

As análises foram realizadas utilizando um HPLC Shimadzu (Japão), equipado com sistema quaternário de bombeamento (modelo LC-20AD), degaseificador *on-line* e sistema de injeção *Rheodyne* de 20 μ L (Rheodyne LCC, EUA). O equipamento estava acoplado a um detector de arranjo de diodos (DAD) (Shimadzu, modelo SPD-M20A) e a um espectrômetro de massas com analisador *ion-trap*. (MS/MS) Bruker Daltonics (modelo Esquire 4000, Alemanha) com interface de ionização química a pressão atmosférica (APCI) operando no modo positivo. Os parâmetros de operação do MS foram os mesmos descritos por De Rosso & Mercadante (2007). As amostras foram solubilizadas em MeOH:MTBE (1:1) e filtradas em membrana de polietileno de 0,22 μ m (Millipore, EUA), imediatamente antes da injeção.

Considerando colunas de fase reversa, a C₃₀ é muito eficiente em separar isômeros geométricos de carotenoides assimétricos, cuja isomerização pode estar localizada na mesma posição em ambos os lados da molécula (Mercadante, 2008b). Por esta razão, a separação dos compostos foi realizada em coluna YMC C₃₀ (3 ou 5 μ m, 250 x 4,6 mm) (Waters, EUA) usando como fase móvel um gradiente linear de MeOH:MTBE de 95:5 para 70:30 em 30 min e para 65:5 em 5 min para os compostos derivados da β -criptoxantina, com temperatura da coluna de 25 °C, e de 95:5 para 70:30 em 30 min e para 50:50 em 20 min para os epóxidos do β -caroteno, com temperatura de 32 °C, em

ambos os casos utilizando fluxo de 0,9 mL/min. O espectro UV-Visível foi obtido entre 250 e 600 nm e os cromatogramas processados a 450 nm.

4.5. Quantificação dos carotenoides por HPLC-DAD

A quantificação de carotenoides foi realizada em um HPLC Waters (Milford, EUA), equipado com sistema quaternário de bombas (modelo 600), desgaseificador *on line*, sistema de injeção *Rheodyne* de 20 µL (Rheodyne LCC, EUA), forno externo com temperatura controlada e detector de arranjo de diodos (DAD) (Waters, modelo 996, EUA). Os dados foram adquiridos e processados em software Millennium Waters.

A coluna foi a mesma utilizada para a identificação, usando como fase móvel os mesmos gradientes lineares descritos no item 4.4, diferenciando-se apenas na adição de 0,1 % de trietilamina (TEA) ao metanol e no fluxo de 1 mL/min. A TEA foi utilizada para aumentar a recuperação dos carotenoides da coluna e melhorar a separação dos picos (Hart & Scott, 1995; Emenhiser et al., 1996). O espectro UV-Visível foi obtido entre 250 e 600 nm e os cromatogramas processados a 450 nm.

A quantificação dos compostos resultantes da reação de epoxidação foi realizada através de curva de calibração externa de *all-trans*-β-caroteno, uma vez que não se dispunha de padrões autênticos para cada um dos epóxidos encontrados. Uma vez que também não há padrões dos compostos de degradação derivados da β-criptoxantina, foram utilizadas somente as áreas cromatográficas fornecidas pelo software do equipamento.

4.6. Determinação da capacidade antioxidante

4.6.1. Método antirradical livre frente ao radical ABTS^{•+}

Para a formação do radical ABTS^{•+}, uma solução aquosa de 7 mM de ABTS foi adicionada à uma solução aquosa de 4,9 mM de persulfato de potássio, cuja mistura foi mantida no escuro à temperatura ambiente por 16 h. Uma alíquota de 2 mL do radical formado foi diluída em cerca de 50 mL de etanol, de forma a obter uma absorbância de 0,70 (± 0,02), medida em espectrofotômetro a 750 nm (Re et al., 1999). Soluções do padrão de referência de trolox, composto análogo à vitamina E, e dos compostos

estudados (β -caroteno e produtos da reação de epoxidação) foram preparados utilizando como solventes EtOH e EtOAC:EtOH (1:1), respectivamente.

A reação foi conduzida em leitor de microplacas Synergy Mx (Biotek, EUA), em microplacas com uma composição final foi de 270 μ L da solução etanólica de ABTS^{•+} e 30 μ L de solução de trolox ou do composto antioxidante, efetuando-se a leitura da absorbância a 750 nm durante 10 minutos, a 30 °C, sendo realizadas leituras a cada 7 segundos para acompanhar a cinética da reação.

Os resultados foram expressos como TEAC, da sigla em inglês “*trolox equivalent antioxidant capacity*” (capacidade antioxidante equivalente a trolox), o qual é obtido através da razão entre os coeficientes angulares da curva da amostra e da curva do padrão referência de trolox. Essas curvas são compostas pela porcentagem de inibição frente ao radical (Equação 8) em função da concentração final do padrão referência de trolox (2,5 a 20 μ M) ou das amostras (1 a 40 μ M). Cinco concentrações foram avaliadas para o trolox e o β -caroteno, cada uma realizada em quintuplicata. Para os produtos provenientes da reação de epoxidação, foram avaliadas sete concentrações para cada uma das quatro condições estudadas. Cada condição foi realizada em triplicata e, para cada uma dessas repetições, foram feitas três placas. Dessa forma, para cada condição foram realizados nove ensaios.

$$\% \text{ de inibição frente ao radical} = \left(\frac{Abs_{\cdot inicial} - Abs_{\cdot final}}{Abs_{\cdot inicial}} \right) \times 100 \quad (\text{Equação 8})$$

Abs_{·inicial} = Absorbância do radical antes da adição de amostra;

Abs_{·final} = Absorbância do radical após 7 min da adição de amostra;

4.6.2. Método de desativação do radical peroxila (ROO[•])

O radical ROO[•] foi gerado por decomposição térmica do 2,2'-azobis(2-amidinopropano)di-hidroclorato (AAPH) a 37 °C. A capacidade de desativação do ROO[•] foi medida através do monitoramento da oxidação da sonda fluorescente fluoresceína, representada pela diminuição da intensidade da sua fluorescência, conforme demonstrado na Figura 4, segundo metodologia descrita por Ou, Hampsch-Woodill & Prior (2001), Huang, Ou & Prior (2002) e Fernandes et al. (2004).

A reação foi conduzida em um volume final de 200 μL , tendo os seguintes reagentes nas concentrações finais: AAPH (19,1 mM) e fluoresceína (61,2 nM). O AAPH e a fluoresceína foram dissolvidos em tampão fosfato 75 mM (pH 7,4), e β -caroteno e os produtos da reação de epoxidação em acetona:água com β -ciclodextrina randomicamente metilada (RMCD) a 7 %. As leituras de fluorescência foram executadas nos comprimentos de onda de excitação e emissão de 485 ± 20 nm e 528 ± 20 nm, respectivamente, sob forma de cinética, com intervalos de 1 min, até o valor da fluorescência reduzir a 5 % da fluorescência inicial. Os resultados para os extratos foram expressos em valor ORAC (Equação 9), o qual é calculado a partir de uma curva de calibração da concentração de trolox em função da *net* área (área sob a curva), calculada conforme Equação 10.

$$\text{Valor ORAC} = \left(\frac{AUC_{\text{composto}} - AUC_{\text{branco}}}{AUC_{\text{trolox}} - AUC_{\text{branco}}} \right) \times \left(\frac{\text{concentração trolox}}{\text{concentração composto}} \right) \quad (\text{Equação 9})$$

AUC_{trolox} = área sob a curva em um sistema contendo o trolox em tampão fosfato 75 mM;

AUC_{composto} = área sob a curva em um sistema contendo o composto avaliado;

AUC_{branco} = área sob a curva em um sistema contendo tampão fosfato 75 mM ou acetona: água (1:1) com 7 % RMCD.

$$AUC = 1 + f_1/f_0 + f_2/f_0 + f_3/f_0 + f_4/f_0 + \dots + f_{90}/f_0 + f_{91}/f_0 \quad (\text{Equação 10})$$

f_0 = fluorescência inicial no tempo 0 min.

f_i = fluorescência no tempo i .

4.7. Análise estatística

A comparação das médias foi realizada pela aplicação da ANOVA seguida do teste de Tukey utilizando o software OriginLab® 8.0.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Degradação térmica da β -criptoxantina

5.1.1. Identificação dos compostos de degradação não voláteis

Os carotenoides formados em todos os tempos de aquecimento foram identificados considerando as características de seus espectros UV-Vis e de massas, segundo descrito no item 4.4. Além disso, alguns isômeros e produtos de oxidação derivados da β -criptoxantina já foram reportados na literatura (De Rosso & Mercadante, 2007; Faria et al., 2009; Zepka & Mercadante, 2009), os quais foram utilizados para comparação. A Figura 11 apresenta os cromatogramas obtidos em três diferentes estágios de aquecimento e as características dos 13 compostos identificados na degradação térmica da β -criptoxantina no sistema simulador de suco estudado estão mostradas na Tabela 3.

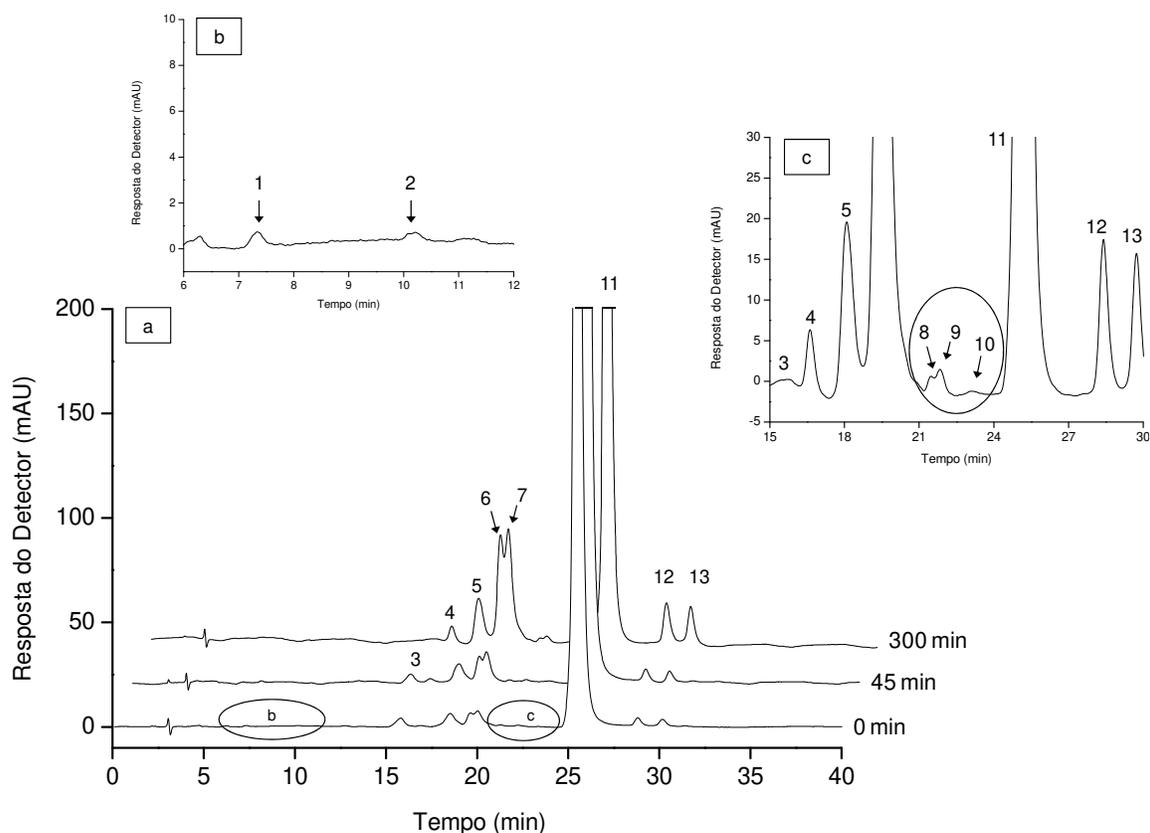


Figura 11. Perfil cromatográfico, obtido por HPLC-DAD, após 0, 45 e 300 minutos de aquecimento do sistema simulador de suco. As condições cromatográficas estão descritas nos itens 4.4 e 4.5. A identidade dos picos encontra-se na Tabela 3.

Tabela 3. Características cromatográficas e dos espectros UV-Vis e de massas, obtidas por HPLC-DAD-MS/MS, dos compostos formados no aquecimento da β -criptoxantina em sistema simulador de suco.

Pico ^a	Composto	t _R (min) ^b	Espectro UV-Vis ^c	≠ λ _{max} ^d	% III/II	% A _B /A _I	[M + H] ⁺ (m/z)	MS/MS (m/z)
1	12'-apo- β -carotenal	7,2	425	-	0	0	351	333 [M+H-18], 241 [M+H-18-92], 227 [M+H-18-106]
2	10'-apo- β -carotenal	9,9	448	-	0	0	377	359 [M+H-18], 321 [M+H-56], 267 [M+H-18-92]
3	5',6'-epóxi- β -criptoxantina	15,4	(420), 446, 474	- 5	61	0	569	551 [M+H-18], 533 [M+H-18-18], 495 [M+H-18-56], 205
4	di- <i>cis</i> - β -criptoxantina	16,5	(320), (413), 435, (462)	- 16	5	9	553	535 [M+H-18], 495
5	15- <i>cis</i> - β -criptoxantina ^e	18,1	337, (423), 447, (472)	- 4	0	48	553	535 [M+H-18], 495
6	13- <i>cis</i> - β -criptoxantina ^f	19,2	337, (420), 442, (470)	- 9	10	45	553	535 [M+H-18], 495
7	13'- <i>cis</i> - β -criptoxantina ^f	19,7	335, (420), 443, (468)	- 8	12	46	553	535 [M+H-18], 495
8	di- <i>cis</i> - β -criptoxantina	21,3	333, (415), 437, 466	- 14	39	29	553	535 [M+H-18], 495
9	di- <i>cis</i> - β -criptoxantina	21,6	335, (416), 437, (462)	- 14	0	17	553	535 ^g [M+H-18]
10	di- <i>cis</i> - β -criptoxantina	23,1	320, (409), 431, 459	- 20	38	5	553	535 [M+H-18], 495
11	all- <i>trans</i> - β -criptoxantina	24,9	(425), 451, 477	0	32	0	553	535 [M+H-18], 495, 461 [M+H-92]
12	9- <i>cis</i> - β -criptoxantina ^h	28,4	339, (421), 445, 471	- 6	32	10	553	535 [M+H-18], 495
13	9'- <i>cis</i> - β -criptoxantina ^h	29,5	339, (423), 445, 471	- 6	35	10	553	535 [M+H-18], 495

^a Picos numerados de acordo com a Figura 11.

^b Tempo de retenção na coluna C₃₀

^c Gradiente linear MeOH:MTBE

^d Cálculo da diferença do λ_{max} do composto de degradação em relação ao all-*trans*.

^e 15-*cis*- β -criptoxantina ou 15'-*cis*- β -criptoxantina

^f 13-*cis*- β -criptoxantina ou 13'-*cis*- β -criptoxantina

^g fragmentação na fonte

^h 9-*cis*- β -criptoxantina ou 9'-*cis*- β -criptoxantina

Em associação aos parâmetros de identificação utilizados, a coeluição com padrões autênticos também foi considerada na identificação de dois apocarotenoides, o 12'-apo- β -carotenal (pico 1) e o 10'-apo- β -carotenal (pico 2), cujos espectros UV-Vis e de massas foram idênticos aos padrões, apresentando molécula protonada ($[M+H]^+$) a m/z 351 e a m/z 377, respectivamente. Somente o primeiro deles (pico 1) também foi encontrado anteriormente através do aquecimento no mesmo sistema-simulador, realizado por Zepka & Mercadante (2009).

No sistema simulador de suco submetido ao aquecimento, houve a formação de somente um monoepóxido (pico 3) que foi identificado através da $[M+H]^+$ a m/z 569 e fragmentos de massas caracterizados pela eliminação consecutiva de uma (m/z 551 $[M+H-18]^+$) e duas (m/z 533 $[M+H-18-18]^+$) moléculas de água, referentes às perdas dos grupos hidroxila e 5,6-epóxido ou 5,8-furanoide, além da perda do grupo xileno associada à eliminação de uma molécula de água (m/z 495 $[M+H-18-56]^+$). A redução do $\lambda_{m\acute{a}x}$ em 5 nm comparado ao *all-trans*, indica a adição de um grupo 5,6-epóxido e, por se tratar de uma molécula assimétrica, a localização deste grupo poderia estar na posição 5,6- ou 5',6'-. A diferenciação entre estas duas posições se deu, então, pelo fragmento de massas a m/z 205. Quando o fragmento a m/z 221 é encontrado, corresponde ao grupo epóxido localizado no anel β substituído, isto é, o anel que possui o grupo hidroxila, enquanto que o fragmento a m/z 205 caracteriza a localização do epóxido no anel β , ou seja, na posição 5',6'- (Back & Enzell, 1995; Faria et al., 2009). Com base nesses fatos, o monoepóxido encontrado foi identificado como 5',6'-epóxi- β -criptoxantina. Esta distinção é importante pela característica de pró-vitamina A que a β -criptoxantina apresenta. Se o grupo estiver localizado na posição 5',6'-, esta atividade é perdida, ao passo que se estiver na posição do outro anel, o que possui o grupo hidroxila, a atividade é de 50 % (Faria et al., 2009). Nenhum carotenoide diepóxido foi encontrado.

A *all-trans*- β -criptoxantina, ponto de partida para o aquecimento, foi identificada como pico 11, apresentando espectro UV-Vis com $\lambda_{m\acute{a}x}$ 425, 451, 477 e III/II 32 %, iguais aos do padrão. A molécula protonada $[M+H]^+$ em m/z 553 corresponde à sua fórmula molecular $C_{40}H_{56}O$, cujos fragmentos MS/MS a m/z 535 $[M+H-18]^+$ e a m/z 461 $[M+H-92]^+$ estão relacionados à perda do grupo hidroxila e à eliminação do tolueno a partir da cadeia poliênica, respectivamente. Estes dados são consistentes com a estrutura química deste carotenoide (Figura 1) e coerentes com os encontrados na literatura.

A reação de isomerização ocorre preferencialmente em determinadas regiões da molécula, já que alguns pontos são impedidos estericamente. As posições mais estáveis estão nos carbonos 9-, 13- e 15- (Zechmeister, 1944). Neste contexto, por se tratar de uma molécula assimétrica, a β -criptoxantina pode apresentar os seguintes isômeros

mono-*cis*: 9-*cis*, 9'-*cis*, 13-*cis*, 13'-*cis* e 15-*cis* ou 15'-*cis* (Figura 16). Todos os possíveis isômeros mono-*cis* que poderiam ser formados a partir da all-*trans*- β -criptoxantina foram encontrados após aquecimento do sistema simulador de suco.

Os isômeros *cis* foram identificados considerando as características do espectro UV-Vis, uma vez que ocorre um efeito hipsocrômico em relação ao isômero all-*trans*, além da menor %III/II e do aumento do pico “*cis*” conforme a isomerização se aproxima do centro da molécula (Zechmeister, 1944; De Rosso e Mercadante, 2007; Mercadante, 2008b). A ordem de eluição na coluna C₃₀ também foi considerada, sendo que o primeiro isômero que eluiu foi o 15-*cis* (pico 5), seguido pelos isômeros das posições 13- e 13'- (picos 6 e 7), que eluíram antes do all-*trans*, e pelos isômeros 9-*cis* e 9'-*cis* (picos 12 e 13), que eluem após o all-*trans*. Como esperado, a mesma [M+H]⁺ a *m/z* 553 correspondente ao isômero all-*trans* foi encontrada para esses isômeros *cis*, bem como similares padrões de fragmentação MS/MS. Se a isomerização ocorre no lado da molécula que possui o anel substituído com o grupo hidroxila ou no lado oposto, não é possível afirmar com certeza somente com as técnicas utilizadas (UV-visível e MS), por isso estes isômeros estão destacados como tentativa de identificação. Zepka & Mercadante (2009) também encontraram estes isômeros utilizando o mesmo sistema-simulador, sendo as características descritas para estes compostos similares às deste trabalho.

Entretanto, Zepka & Mercadante (2009) não identificaram nenhum isômero di-*cis*, diferentemente dos quatro encontrados neste trabalho (picos 4, 8, 9 e 10). Não há dados na literatura que descrevem as características dos isômeros di-*cis* derivados da β -criptoxantina, mas é possível utilizar como base de comparação os isômeros do β -caroteno, já descritos por Qiu, Chen & Li (2008, 2009), uma vez que apresentam o mesmo cromóforo. Quatro isômeros di-*cis* foram reportados nesses trabalhos, localizados nas posições 9,15-di-*cis*, 9,13-di-*cis*, 13,15-di-*cis* e 9,13'-di-*cis*, apresentando deslocamento hipsocrômico em relação ao all-*trans*- β -caroteno variando de 14 a 16 nm. Os autores também citam dados do espectro UV-Vis reportados por outros trabalhos para esses mesmos isômeros, cujos deslocamentos hipsocrômicos variaram de 12 a 17 nm. Brunner (1997) também estudou a formação de isômeros di-*cis* a partir do 9-*cis*- β -caroteno, encontrando redução de, respectivamente, 12, 14 e 14 nm para 9,15-di-*cis*, 9,13-di-*cis* e 9,13'-di-*cis* comparados ao $\lambda_{\text{máx}}$ do all-*trans*- β -caroteno.

Com base nessas características, as variações de 14 a 20 nm dos espectros UV-Vis encontradas para os picos 5, 9, 10 e 11 são compatíveis com isômeros di-*cis*. Além disso, a molécula protonada a *m/z* 553 corresponde à mesma fórmula molecular da all-*trans*- β -criptoxantina (C₄₀H₅₆O) e todos apresentaram o mesmo padrão de fragmentação

dos isômeros mono-*cis*. Todavia, a posição correta das duas isomerizações não pôde ser distinguida através das técnicas utilizadas, sendo necessária uma técnica mais específica para este fim, a ressonância magnética nuclear (NMR).

5.1.2. Efeito do aquecimento no perfil de degradação e formação de carotenoides

O processamento de sucos de fruta é considerado suficiente para catalisar a isomerização de carotenoides da forma *trans* para *cis* (Aman, Schieber & Carle, 2005), especialmente o uso de temperaturas abaixo de 100 °C, que favorece este tipo de reação (Mercadante, 2008a). Neste contexto, os nove isômeros *cis* identificados, os quais incluem cinco isômeros mono-*cis* e quatro di-*cis*, além de estarem em maior número, foram preferencialmente formados em relação aos três produtos de oxidação, representados pelo 5',6'-epóxido e pelos apocarotenoides.

Considerando como 100 % a somatória das áreas dos 13 compostos identificados, a porcentagem de all-*trans*- β -criptoxantina diminuiu, entre 0 e 300 minutos, de 97,6 a 72,9 %, enquanto que todos os isômeros *cis* somados aumentaram de 2,2 a 26,5 %. Os produtos de oxidação, portanto, representaram menos de 1 % em todos os tempos de aquecimento (Figura 12). Com relação aos isômeros *cis*, os di-*cis* representaram somente 0,1 % no tempo inicial e 2,5 % ao final do aquecimento, pertencendo aos isômeros mono-*cis* a maior representatividade dos produtos de degradação formados, variando de 2,1 a 24,0 %. Este fato indica que os isômeros di-*cis* são formados a partir dos mono-*cis* e estes a partir do isômero all-*trans* (all-*trans* \leftrightarrow mono-*cis* \leftrightarrow di-*cis*), como já proposto por Brunner (1997). A reação de isomerização apresentou uma razão *trans/cis*, após os 300 minutos de aquecimento, de 73:27 (Quadro 3), diferindo em 10 % ao valor de 63:37, após 120 minutos de aquecimento, encontrado por Zepka & Mercadante (2009) para a β -criptoxantina avaliada no mesmo sistema simulador. Essas mesmas autoras também estudaram o β -caroteno e a β -criptoxantina através de um sistema simulador de suco de caju, apresentando as razões *trans/cis* de 69:31 e 68:32, respectivamente, após 240 minutos de aquecimento (Zepka & Mercadante, 2009).

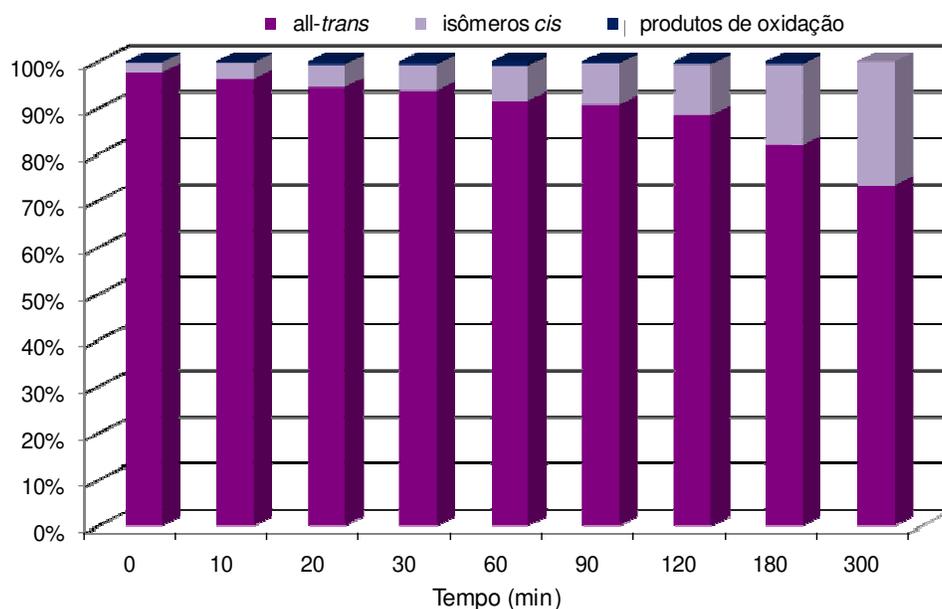


Figura 12. Distribuição, em porcentagem (%), dos grupos de compostos formados ao longo do aquecimento da β-criptoxantina em sistema simulador de suco.

Quadro 3. Valores da razão *trans/cis* nos diferentes tempos de aquecimento β-criptoxantina em sistema simulador de suco.

Tempo (min)	Razão <i>trans/cis</i>
0	98:2
10	96:4
20	95:5
30	94:6
60	92:8
90	91:9
105	90:10
120	89:11
180	82:18
240	83:17
300	73:27

Baseando-se na quantidade total obtida para os isômeros mono-*cis*, 13-*cis* e 13'-*cis* perfizeram juntos a maior proporção (média de 54 %), sendo, portanto, os compostos de degradação mais formados durante o aquecimento no sistema simulador de suco avaliado, corroborando com o já reportado previamente (Zechmeister, 1944; Mercadante,

2008a; Zepka e Mercadante, 2009). Em seguida, tem-se os isômeros 9-*cis* e 9'-*cis* com média de 27 % e por último o 15-*cis*, representando os 19 % restantes. A Figura 13 mostra a variação dessas proporções ao longo dos 300 minutos de aquecimento.

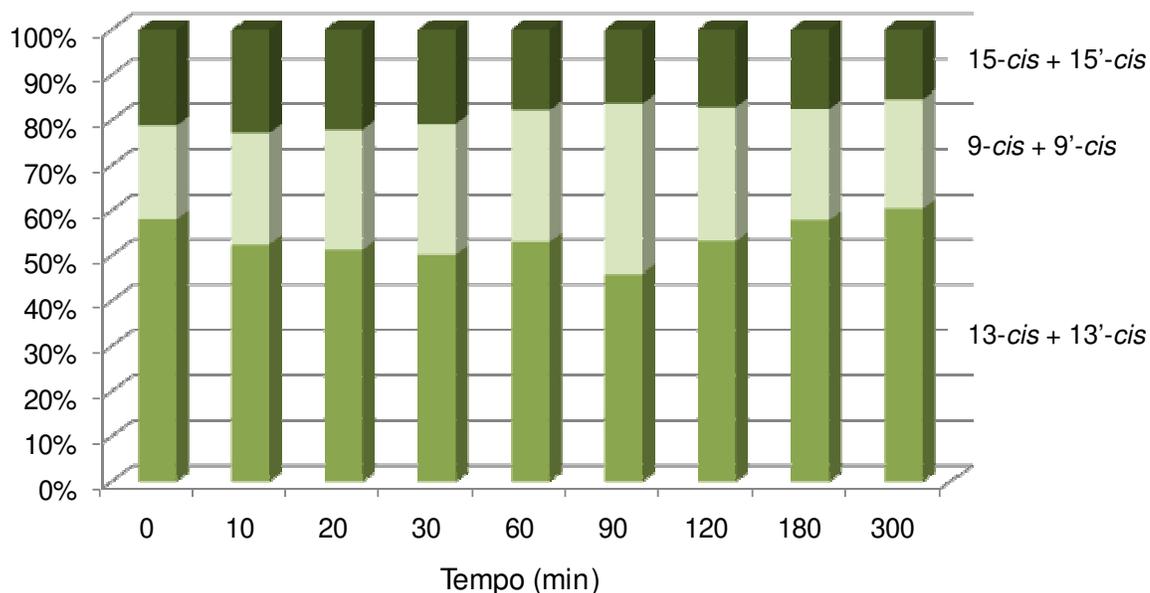


Figura 13. Distribuição, em porcentagem (%), dos isômeros mono-*cis* de β-criptoxantina formados ao longo do aquecimento no sistema simulador de suco.

O perfil de degradação da all-*trans*-β-criptoxantina e de formação dos isômeros *cis* podem ser observados na Figura 14. Nota-se que em todos os tempos de aquecimento estudados, a all-*trans*-β-criptoxantina foi o carotenoide majoritário, atingindo 55 % de degradação ao final de 300 minutos. Do tempo inicial de aquecimento até cerca de 45 minutos, observou-se uma queda mais acentuada e contínua na quantidade de all-*trans*. Já a partir de 45 minutos, a curva apresentou um decaimento mais lento, ocorrendo, porém, grande oscilação dos teores para cada tempo, como pode ser observado pelas maiores barras de erro com o maior tempo de aquecimento. Este fato retrata a dificuldade em se trabalhar com experimentos cinéticos, agravada, neste trabalho, pelas várias etapas compreendidas após o aquecimento até a obtenção do extrato final para avaliação.

Concomitantemente ao decaimento do teor do isômero all-*trans*, observou-se um aumento na quantidade de isômeros *cis*, sendo o seu perfil, tanto para cada isômero

como também para a somatória deles, similar ao comportamento da degradação do *all-trans*, considerando os intervalos ressaltados (Figuras 14 e 15).

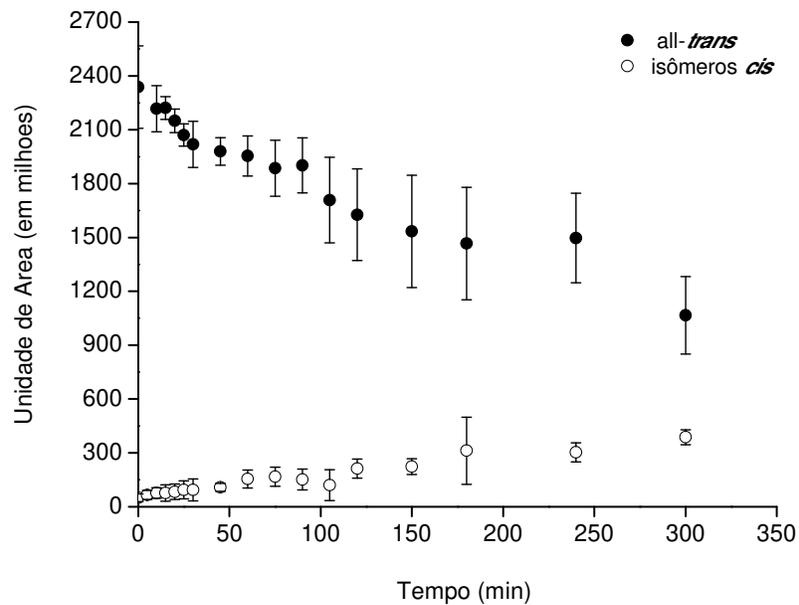


Figura 14. Degradação da *all-trans*-β-criptoxantina e formação de isômeros *cis* (soma dos mono- e di-*cis*) durante aquecimento em sistema simulador de suco.

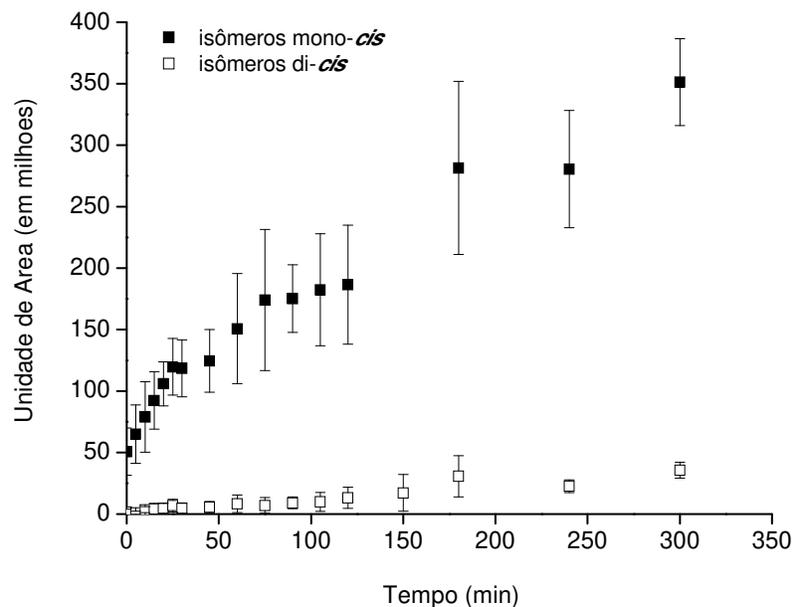


Figura 15. Formação dos isômeros mono-*cis* e di-*cis* durante aquecimento da *all-trans*-β-criptoxantina em sistema simulador de suco.

Considerando o sistema simulador de suco avaliado neste trabalho, com a continuidade no tempo de aquecimento provavelmente ocorreria uma alteração no comportamento da curva dos isômeros *cis*, passando de ascendente à descendente, sendo este decaimento caracterizado pela formação de isômeros di-*cis* a partir dos mono-*cis* (Brunner, 1997) e de produtos voláteis de oxidação.

A oxidação para compostos secundários de baixo peso molecular, também conhecidos como compostos voláteis, é verificada pelo fato de que a quantidade total de all-*trans*- β -criptoxantina perdida ao final dos 300 minutos não foi compensada pela formação dos isômeros *cis* e dos produtos de oxidação primários. Somente cerca de 26 % da perda total de all-*trans*- β -criptoxantina foi convertida em seus isômeros *cis*, de forma que os 74 % restantes representam a formação de compostos voláteis, não abordados neste trabalho. Zepka (2009) encontrou, por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-MS), 35 compostos voláteis a partir do sistema simulador de suco de cajú aquecido à 90 °C por 120 minutos, sendo o *p*-cresol e o dodecano os principais aromas detectados.

Em suma, considerando apenas a formação dos produtos de degradação detectados por HPLC-DAD-MS/MS, as principais reações observadas no aquecimento a 90 °C da β -criptoxantina em sistema simulador de suco foram tanto de natureza reversível (isomerização) quanto irreversível (epoxidação e a clivagem oxidativa), sendo a primeira delas a predominante.

Considerando esse comportamento e os compostos formados, foi proposto um mecanismo de degradação, conforme ilustrado pela Figura 16.

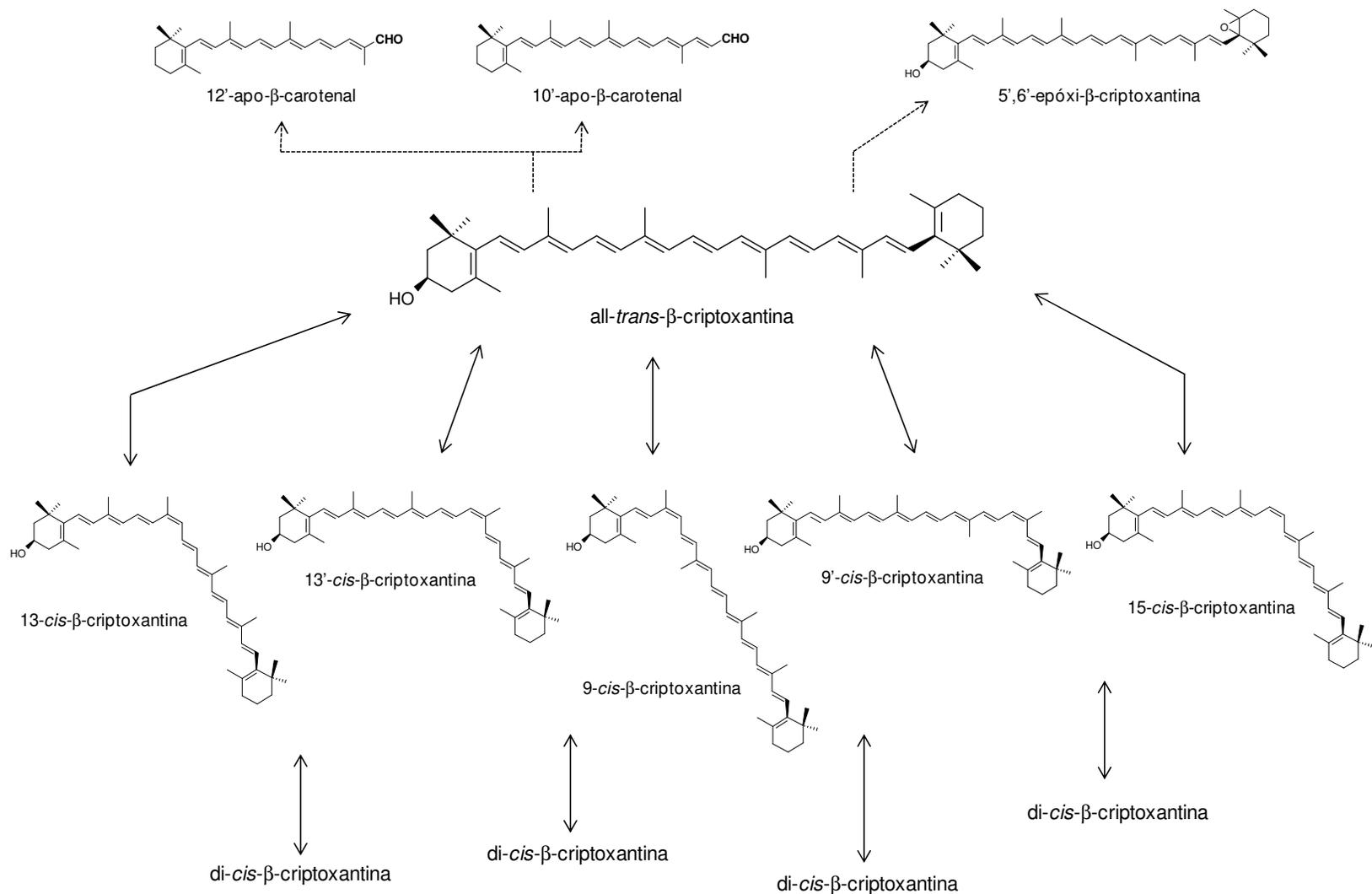


Figura 16. Mecanismo proposto para a degradação térmica da β -criptoxantina em sistema simulador de suco.

5.2. Epóxidos do β -caroteno

5.2.1. Produção e identificação dos compostos formados pela reação de epoxidação

No mecanismo de degradação de carotenoides, os epóxidos, juntamente com os apocarotenoides, são os primeiros produtos de oxidação formados (Figura 8). A epoxidação é caracterizada pela incorporação de oxigênio à molécula, preferencialmente na ligação dupla do carbono terminal da cadeia poliênica, nas posições 5,6 e 5',6', uma vez que esta região possui a maior densidade eletrônica da cadeia poliênica (Caris-Veyrat, 2008).

Com o objetivo de formar preferencialmente os derivados epóxidos, a reação com β -caroteno foi conduzida utilizando o MCPBA, um conhecido reagente de efeito epoxidante em ligações duplas entre carbonos. Segundo Lacerda-Júnior (2004), o mecanismo desta reação de epoxidação é realizado por ataque eletrofílico, conforme ilustrado na Figura 17.

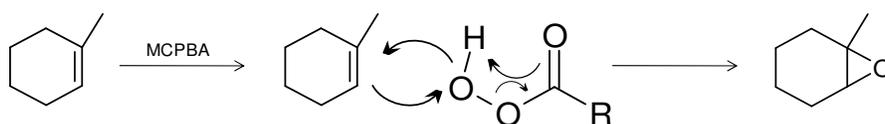


Figura 17. Mecanismo de epoxidação induzido pelo MCPBA. Adaptado de Lacerda-Júnior (2004).

Especialmente na presença de ácidos, os carotenoides 5,6-epóxidos podem sofrer rearranjo epóxido-furanoide e dar origem aos seus correspondentes 5,8-epóxidos. O mecanismo desse rearranjo foi proposto por Eugster (1995), citado por Deli & Ösz (2004), conforme demonstrado na Figura 18. De um modo geral, o hidrogênio presente no meio interage com o oxigênio do grupo epóxido por ataque eletrofílico e a ligação dupla localizada entre os carbonos 7 e 8 da cadeia poliênica sofre ressonância, deslocando-se para os carbonos 6 e 7. A conversão para o grupo 5,8-epóxido provoca a eliminação de uma ligação dupla da cadeia poliênica, além daquela do anel β que já foi retirada pela formação do 5,6-epóxido.

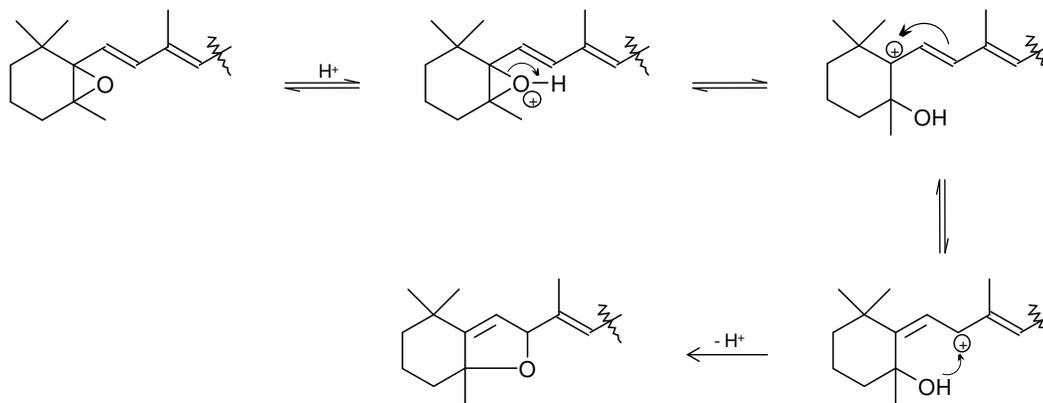


Figura 18. Mecanismo proposto para o rearranjo epóxido-furanoide de carotenoides. Adaptado de Eugster (1995).

Conforme esperado, todos os quatro ensaios realizados no presente trabalho resultaram na formação tanto de monoepóxidos como também de diepóxidos, apresentando a seguinte ordem de eluição na coluna de fase reversa C_{30} : diepóxidos < monoepóxidos < *all-trans*- β -caroteno (Figura 19). No total, cinco derivados epóxidos foram identificados (Tabela 4).

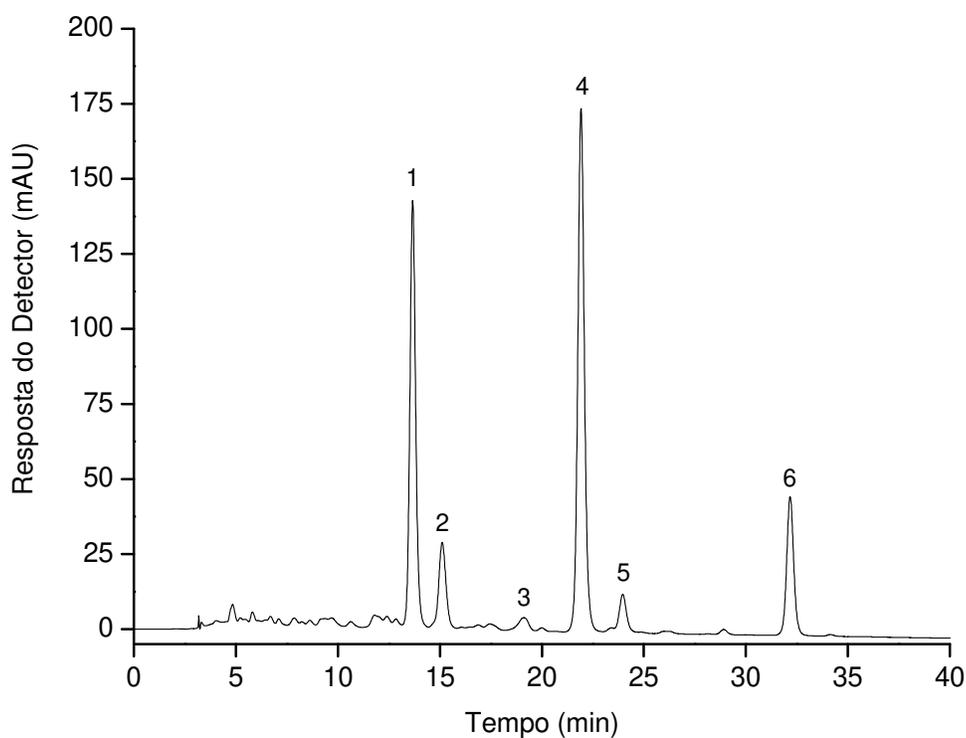


Figura 19. Perfil cromatográfico, obtido por HPLC-DAD, dos produtos formados na reação de epoxidação do β -caroteno com MCPBA. Condições cromatográficas estão descritas no item 4.4. A identidade dos picos encontra-se na Tabela 4.

Tabela 4. Características cromatográficas e dos espectros UV-Vis e de massas, obtidas por HPLC-DAD-MS/MS, dos compostos formados pela reação de epoxidação do β -caroteno.

Pico ^a	Composto	t_R (min) ^b	λ_{max} (nm) ^c	$\neq \lambda_{max}$ ^d	% III/II	% A _B /A _{II}	[M+H] ⁺ (<i>m/z</i>)	MS/MS (<i>m/z</i>)
1	5,6,5',6'-diepóxi- β -caroteno	13,7	415, 439, 468	- 12	89	5	569	551 [M+H-18], 533 [M+H-18-18], 489 [M+H-80], 477 [M+H-92], 459 [M+H-18-92], 377, 205, 165
2	5,6,5',8'-diepóxi- β -caroteno	15,1	399, 421, 448	- 30	93	6	569	551 [M+H-18], 533 [M+H-18-18], 489 [M+H-80], 477 [M+H-92], 459 [M+H-18-92], 377, 205, 165
3	9- <i>cis</i> -5,6,5',6'-diepóxi- β -caroteno ^e	19,1	315, 402, 425, 451	- 26	82	9	569	551 [M+H-18], 533 [M+H-18-18], 511, 489 [M+H-80], 377, 205, 165
4	5,6-epóxi- β -caroteno	21,9	(420), 445, 473	- 6	58	5	553	535 [M+H-18], 495, 461 [M+H-92], 443 [M+H-18-92], 361, 205
5	5,8-epóxi- β -caroteno	23,9	(403), 427, 452	- 24	64	6	553	535 [M+H-18], 495, 461 [M+H-92], 443 [M+H-18-92], 361, 205
6	all- <i>trans</i> - β -caroteno	32,2	(422), 451, 477	0	28	0	537	444 [M-92], 399 [M-137]

^a Picos numerados conforme Figura 19.

^b Tempo de retenção na coluna C₃₀

^c Gradiente linear MeOH:MTBE

^d Diferença do λ_{max} do composto de oxidação em relação ao all-*trans*- β -caroteno.

^e tentativa de identificação

Da mesma forma que os compostos obtidos pela degradação térmica da β -criptoxantina, a identificação dos compostos derivados da epoxidação do β -caroteno foi realizada com base nos parâmetros descritos no item 4.4 e na literatura. Segundo Britton (1995) um parâmetro de comparação que pode ser utilizado é a variação no espectro UV-Vis ocasionada pela alteração na estrutura molecular (proveniente da epoxidação, neste caso), caracterizando um deslocamento hipsocrômico, o qual é observado pela diferença entre o $\lambda_{\text{máx}}$ do *all-trans*- β -caroteno e o $\lambda_{\text{máx}}$ dos produtos de oxidação formados, em um mesmo experimento. Sendo assim, essa diferença é utilizada para comparação por representar o padrão de deslocamento no espectro UV-Vis que ocorre com a mudança no cromóforo.

A molécula protonada ($[M+H]^+$) obtida no espectro de massas foi utilizada para determinar o número de grupos epóxidos que foram incorporados à molécula do *all-trans*- β -caroteno. Para cada adição de uma molécula de oxigênio, ocorre o aumento de 16 u à $[M+H]^+$ a m/z 537 característica do *all-trans*- β -caroteno (pico 6), de forma que os mono e diepóxidos possuem, respectivamente, $[M+H]^+$ a m/z 553 e a m/z 569. Dessa forma, os picos 1 e 2 foram identificados como diepóxidos, já que, além da mesma $[M+H]^+$ a m/z 569, ambos apresentaram o mesmo padrão de fragmentação MS/MS, mostrando a perda sucessiva de água correspondente à eliminação dos grupos epóxidos de ambos os lados da molécula (m/z 551 $[M+H-18]^+$ e m/z 533 $[M+H-18-18]^+$), como também a eliminação de tolueno a partir da cadeia poliênica, tanto sozinho ($[M+H-92]^+$) como combinado à perda de água ($[M+H-18-92]^+$). Além desses fragmentos, também foram encontrados os picos a m/z 489 ($[M+H-80]^+$), m/z 205 e m/z 165, característicos de epóxidos. Os monoepóxidos, com $[M+H]^+$ a m/z 553, corresponderam aos picos 4 e 5 e, da mesma forma que os diepóxidos, apresentaram fragmentos MS/MS similares entre si.

Por outro lado, o espectro de massas não consegue diferenciar entre os grupos epóxidos nas posições 5,6- e 5,8-, uma vez que apresentam a mesma massa molecular e o mesmo padrão de fragmentação obtido por MS/MS. No entanto, a adição de um grupo epóxido altera o sistema de ligações duplas conjugadas e, por consequência, o cromóforo da molécula, o que causa um deslocamento hipsocrômico de, em média, 6 nm para cada 5,6-epóxido e de 20 nm para cada 5,8-epóxido (Mercadante, 2008b). Sendo assim, a distinção entre estes dois carotenoides é realizada por meio do espectro UV-Vis, além de considerar a ordem de eluição na coluna cromatográfica.

Com base nessas informações, o pico 4 foi identificado como 5,6-epóxi- β -caroteno e o pico 5 como 5,8-epóxi- β -caroteno, os quais apresentaram, respectivamente, um deslocamento hipsocrômico de 6 nm e de 24 nm em relação ao *all-trans*, sendo tais variações idênticas às encontradas por Rodriguez & Rodriguez-Amaya (2007), conforme

descrito na Tabela 2. Os picos 1 e 2 foram identificados, respectivamente, como 5,6,5',6'-diepóxi- β -caroteno e 5,6,5',8'-diepóxi- β -caroteno, fazendo uso do mesmo raciocínio da identificação dos monoepóxidos. Considerando as características do espectro UV-Vis, o deslocamento hipsocrômico de 12 nm observado no pico 1 foi coerente à adição de dois grupos 5,6-epóxido, visto cada grupo ocasionar uma redução média de 6 nm no $\lambda_{\text{máx}}$ do *all-trans*, conforme ocorreu no pico 4. Nesse mesmo sentido, o pico 2 foi caracterizado pela incorporação de um grupo 5,6-epóxido e um 5,8-furanoide, cujos deslocamentos somados de 6 e 24 nm dos picos 4 e 5, respectivamente, correspondem à redução de 30 nm observada para este composto.

Com relação ao pico 3, a $[M+H]^+$ a m/z 569 indica que o composto tem em sua estrutura duas moléculas de oxigênio. O deslocamento hipsocrômico de 26 nm observado para este pico, maior que o do 5,6,5',6'-diepóxido (12 nm) e menor que o do 5,6,5',8'-diepóxido (30 nm), pode indicar um isômero *cis* derivado do 5,6,5',6'-diepóxido. A presença de um pequeno pico *cis* ($\%A_B/A_{II} = 9$) a 315 nm e a eluição em coluna C_{30} após o 5,6,5',6'-diepóxido indicam que este pico é provavelmente o isômero 9-*cis*-5,6,5',6'-diepóxi- β -caroteno.

5.2.2. Perfil de formação dos compostos de epoxidação

A proporção para cada um dos cinco epóxidos identificados está representada na Tabela 5, correspondente à média de três experimentos e considerando a soma da área dos picos identificados como 100 %. Os cromatogramas para cada uma dessas condições estão na Figura 20.

Tabela 5. Porcentagem dos diferentes epóxidos derivados do β -caroteno.

Pico	Composto	0-c ¹	30-c ¹	0-s ²	30-s ²
1	5,6,5',6'-diepóxido	27,5 ± 0,45	61,0 ± 2,49	41,9 ± 0,58	68,8 ± 4,06
2	5,6,5',8'-diepóxido	8,7 ± 0,50	11,0 ± 0,19	14,1 ± 0,99	17,0 ± 1,26
3	9- <i>cis</i> -5,6,5',6'-diepóxido*	1,8 ± 0,03	3,6 ± 0,12	0,0	0,0
4	5,6-epóxido	43,5 ± 0,46	21,0 ± 2,06	33,8 ± 1,27	11,8 ± 2,26
5	5,8-epóxido	4,3 ± 0,26	1,4 ± 0,15	4,6 ± 0,07	1,5 ± 0,35
6	<i>all-trans</i> - β -caroteno	14,2 ± 0,68	2,0 ± 0,28	5,6 ± 0,59	0,9 ± 0,30

Média e desvio padrão de 3 experimentos

* tentativa de identificação

¹ 0-c e 30-c: reação conduzida na presença de NaHCO₃ nos tempos de agitação 0 e 30 minutos após adição do MCPBA.

² 0-s e 30-s: reação conduzida na ausência de NaHCO₃ nos tempos de agitação 0 e 30 minutos após adição do MCPBA.

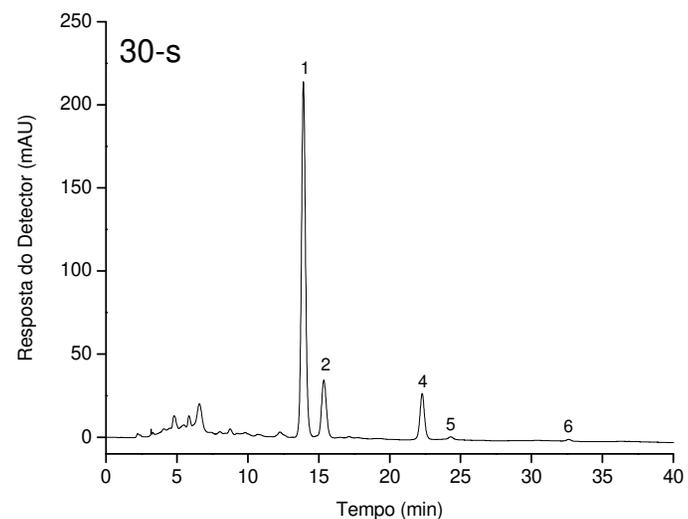
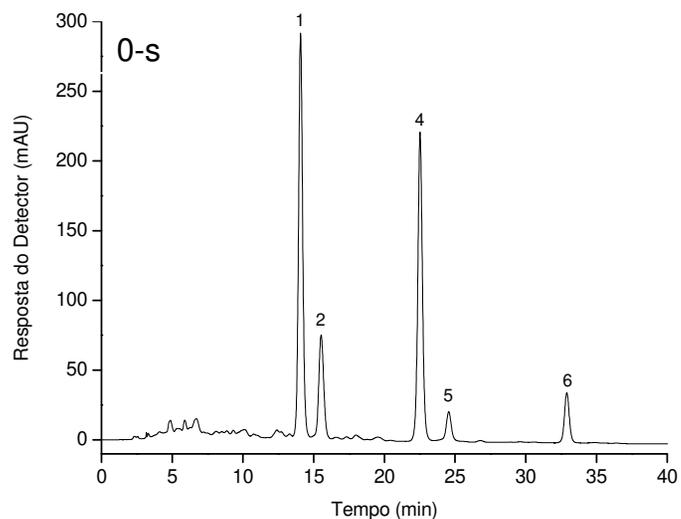
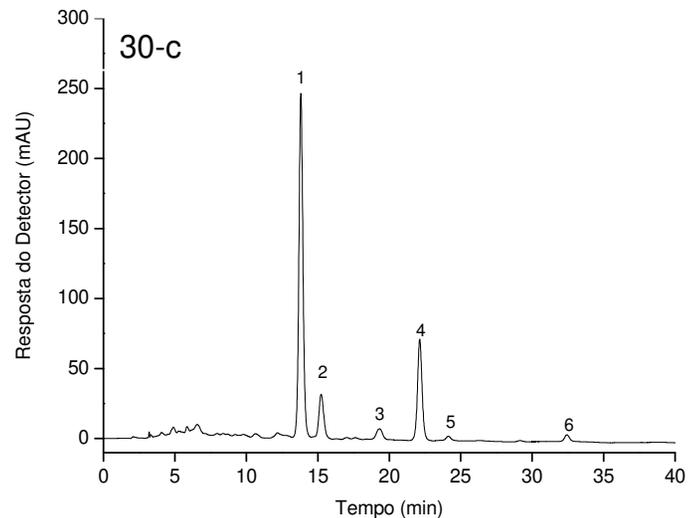
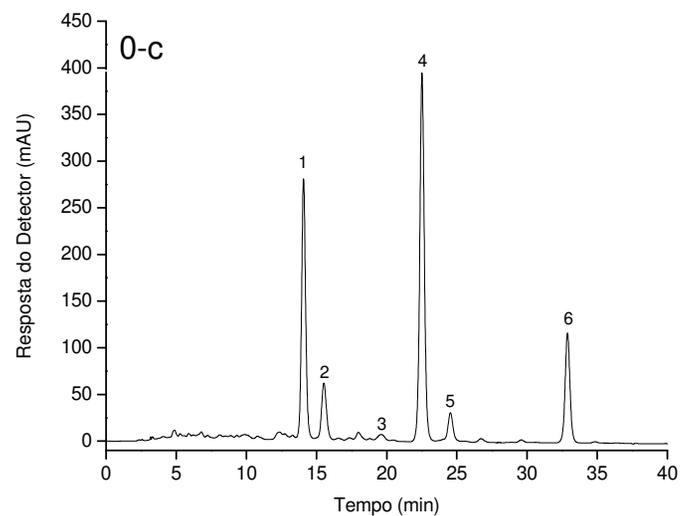


Figura 20. Perfil cromatográfico, obtido por HPLC-DAD, dos produtos formados na reação de epoxidação do β -caroteno com MCPBA em diferentes condições. Condições cromatográficas estão descritas no item 4.4. A identidade dos picos encontra-se na Tabela 4.

0-c e 30-c (reação conduzida na presença de NaHCO_3 nos tempos de agitação 0 e 30 minutos após adição do MCPBA); 0-s e 30-s (reação conduzida na ausência de NaHCO_3 nos tempos de agitação 0 e 30 minutos após adição do MCPBA).

O 5,6,5',6'-diepóxi- β -caroteno foi o composto obtido em maior proporção, seguido pelo 5,6-epóxi- β -caroteno, com exceção da condição 0-c, na qual essa ordem se deu inversamente. Estes resultados indicam que a reação com MCPBA, nas condições avaliadas, favorece a formação do diepóxido em relação ao rearranjo 5,8-furanoide, mesmo sem o uso de NaHCO₃. Esta afirmação é fortalecida quando se observa a maior proporção do 5,6,5',8'-diepóxido comparado ao 5,8-epóxido, indicando que o rearranjo furanoide tem preferência em ocorrer após a segunda epoxidação da molécula. O all-*trans*- β -caroteno, após a reação de epoxidação, representou menos de 15 % em todos os quatro experimentos.

Considerando os ensaios que utilizaram o NaHCO₃, ao se comparar os dois tempos analisados (0 e 30 minutos), nota-se que houve um aumento na quantidade dos diepóxidos associado à diminuição dos monoepóxidos, observados tanto na passagem do 5,6-epóxido para o 5,6,5',6'-diepóxido quanto do 5,8-epóxido para o 5,6,5',8'-diepóxido, apesar que, ao que tudo indica, este último seja proveniente principalmente do 5,6,5',6'-diepóxido (ver mecanismo da Figura 8). Esse comportamento já era previsto dado o tempo mais prolongado, o que possibilita a continuidade das reações de epoxidação, bem como a maior redução do all-*trans*- β -caroteno, substrato inicial para o MCPBA. Ao analisar os ensaios feitos sem NaHCO₃, o mesmo comportamento foi observado.

Com o objetivo de formar diferentes proporções dos epóxidos, foram utilizadas quatro diferentes condições, conforme já descrito no item 4.3. O NaHCO₃ foi utilizado para *mop out* o ácido *meta*-clorobenzoico liberado pelo MCPBA, o qual provoca uma acidez no meio que favorece o rearranjo 5,8-furanoide (Rodriguez e Rodriguez-Amaya, 2007). O uso de NaHCO₃, então, é necessário para garantir a menor formação dos derivados 5,8, favorecendo assim os 5,6-epóxidos.

Neste contexto, fixando o tempo e comparando em relação ao emprego de NaHCO₃ (Figura 21), nos experimentos conduzidos sem NaHCO₃ houve maior formação de derivados 5,8, tanto para o mono quanto para o diepóxido, ainda que os tempos utilizados não tenham sido longos suficientes para torná-los majoritários. Além disso, não foi detectada a formação do 9-*cis*-5,6,5',6'-diepóxido em nenhum dos ensaios conduzidos sem NaHCO₃, reforçando o fato de que a maior acidez do meio favorece o rearranjo furanoide, enquanto que na presença do sal esta reação seria parcialmente deslocada para a formação de isômeros provenientes dos 5,6-epóxidos, no caso representado pelo diepóxido por estar em maior proporção, cujo valor dobra após 30 minutos de agitação com MCPBA.

Para que haja repetibilidade nas proporções dos produtos de oxidação, é importante salientar a necessidade de padronização na realização da reação com

MCPBA, incluindo o tamanho das vidrarias, que influencia no modo como a solução está distribuída sobre o recipiente e conseqüentemente altera a superfície de contato onde o ácido será gotejado, bem como o tempo de gotejamento e a velocidade de agitação, a fim de homogeneizar a distribuição do ácido na solução. Outro fator extremamente importante é a regularidade no tempo das análises a serem realizadas posteriormente à reação de epoxidação, isto é, procurar utilizar sempre o mesmo intervalo de tempo para execução das análises, de preferência no mesmo dia ou no dia seguinte, devido à baixa estabilidade dos produtos de oxidação formados, mesmo sob armazenamento a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, gerando alterações tanto no rendimento quanto na proporção dos diferentes epóxidos.

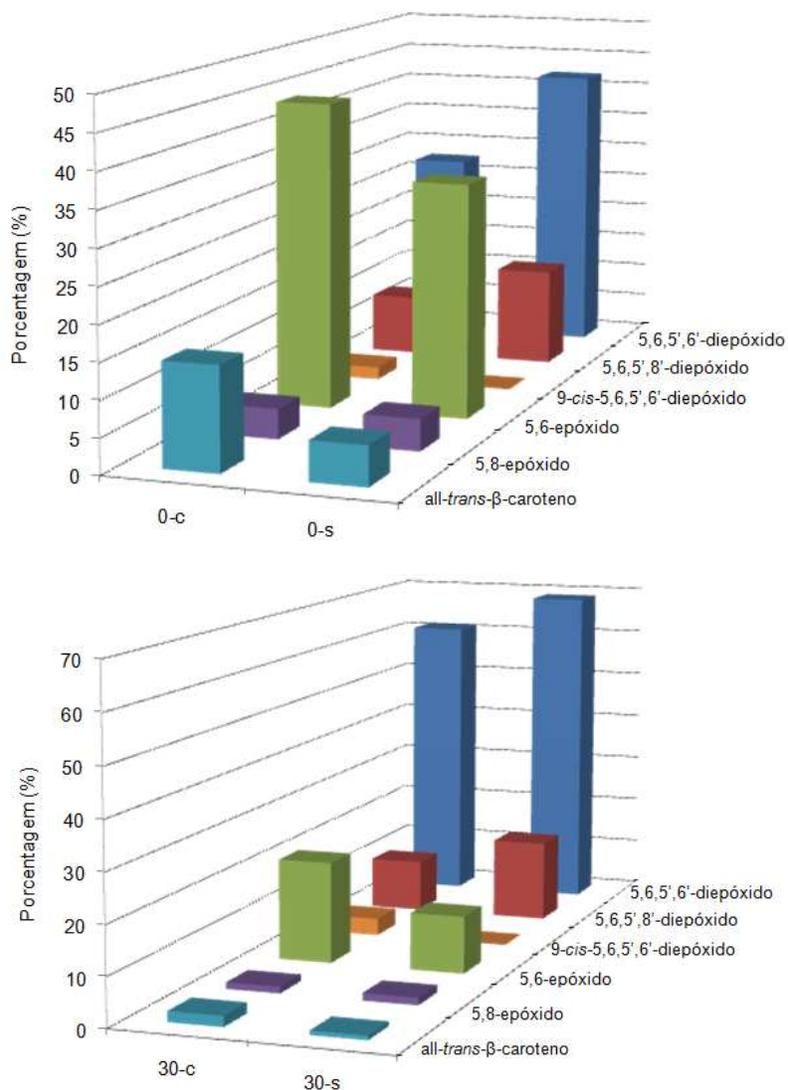


Figura 21. Proporção dos epóxidos formados na presença (c) e ausência (s) de NaHCO₃, nos ensaios de 0 min (acima) e 30 min (abaixo).

5.2.3. Influência da composição de epóxidos na capacidade antioxidante

A Figura 22 apresenta a porcentagem de inibição frente ao radical ABTS^{•+} do trolox, padrão utilizado como referência, apresentando um coeficiente angular de 4,22 e R² de 0,9966, e também do all-*trans*-β-caroteno, cujo coeficiente angular e R² foram, respectivamente, 11,21 e 0,9965.

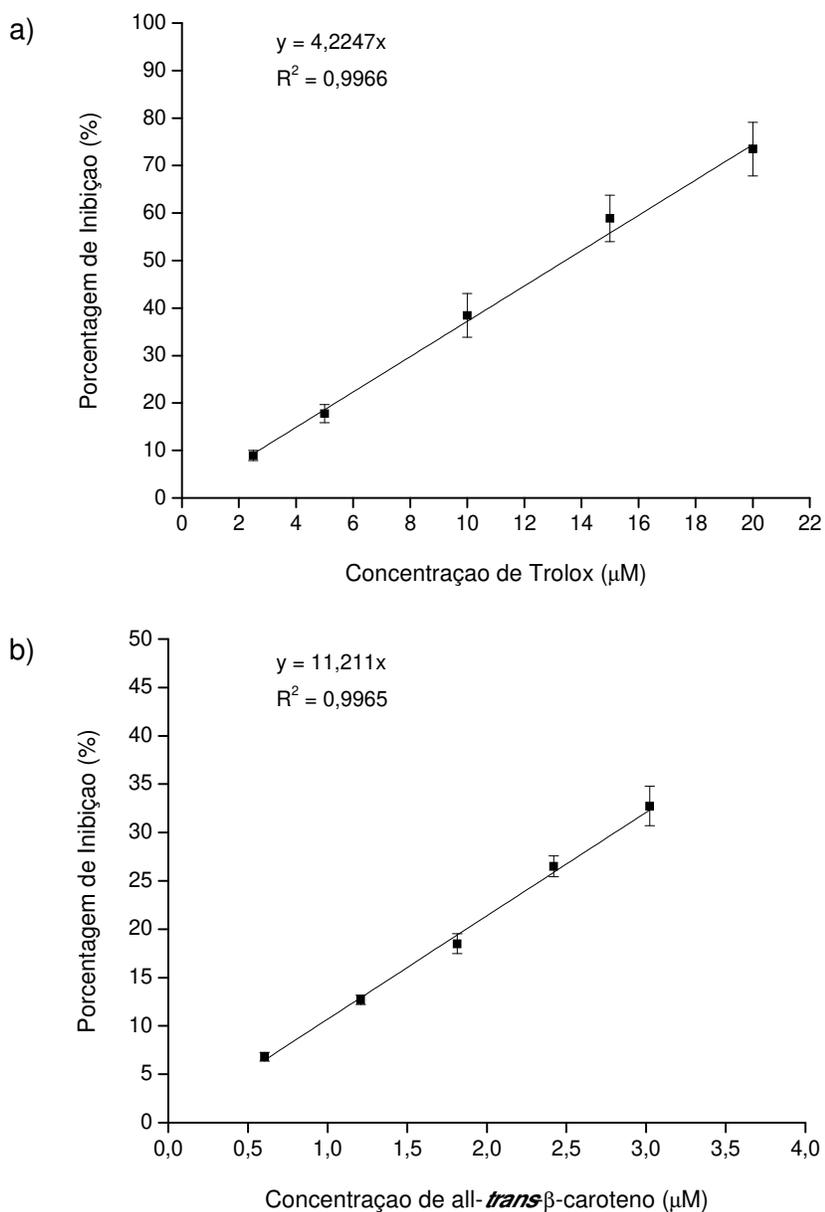


Figura 22. Porcentagem de inibição do radical ABTS^{•+} em função da concentração (μM) de trolox (a) e all-*trans*-β-caroteno (b).

Para os produtos provenientes da reação de epoxidação, foram avaliadas sete concentrações para cada uma das quatro condições estudadas, sendo a média dos valores de TEAC apresentada no Quadro 4, juntamente com as proporções relativas aos grupos de epóxidos formados, agrupados como diepóxidos (picos 1, 2 e 3) e monoepóxidos (4 e 5).

Quadro 4. Valores de TEAC, ORAC e proporção dos grupos de epóxidos presentes nas diferentes condições estudadas.

Amostra	TEAC ¹	ORAC ²	Proporção (%)		
			diepóxidos	monoepóxidos	all-trans
β-caroteno	2,65 ± 0,14 ^a	s.d.c. ^{3 a}	< 1	< 1	95
0-c	0,46 ± 0,03 ^b	0,15 ± 0,05 ^b	38	48	14
0-s	0,49 ± 0,06 ^b	0,26 ± 0,08 ^b	56	38	6
30-c	0,68 ± 0,12 ^c	0,59 ± 0,21 ^c	76	22	2
30-s	0,70 ± 0,05 ^c	0,83 ± 0,19 ^c	86	13	1

¹ média e desvio-padrão de cinco experimentos para o β-caroteno e nove experimentos para os produtos de epoxidação.

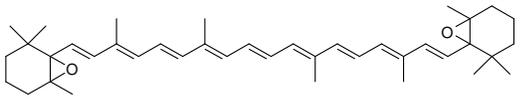
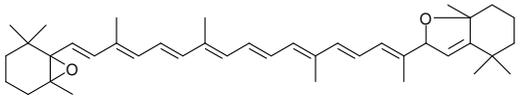
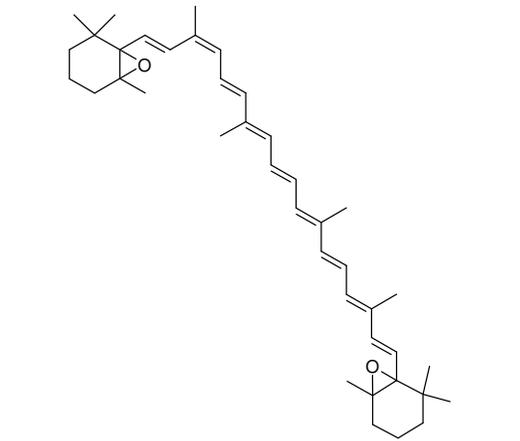
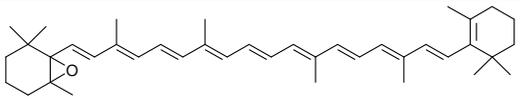
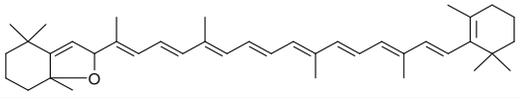
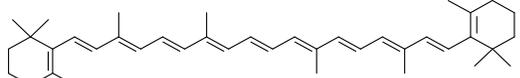
² média e desvio-padrão de doze experimentos para os produtos de epoxidação

³ s.d.c. = sem diferença do controle (capacidade de desativação igual ao controle)

^a letras iguais indicam que não há diferença ao nível de 5 % de significância, para o mesmo teste.

O β-caroteno apresentou um TEAC médio de 2,65, valor este que está na mesma faixa do 2,57 reportado por Re et al. (1999), em cujos autores foi baseada a metodologia realizada neste trabalho. Em comparação ao β-caroteno, todas as condições estudadas na reação de epoxidação apresentaram valores de TEAC significativamente menores, perfazendo uma redução de cerca de 5 vezes. Essa diferença se deve ao fato de que o β-caroteno não possui o anel β substituído, o que aumenta sua capacidade em reduzir o radical ABTS^{•+}, isto é, a presença de alguns grupos funcionais polares interfere na densidade de elétrons desemparelhados da cadeia poliênica, levando à diminuição da reatividade do carotenoide frente ao radical (Miller et al., 1996). Além disso, os produtos da reação de epoxidação apresentam menor número de ligações duplas conjugadas (l.d.c.) (Quadro 5), o que, segundo relatado pela literatura, aparentemente reduz a capacidade do carotenoide em desativar esse radical. Ao avaliar carotenoides com diferentes números de l.d.c. e presença de grupos hidroxila (β-caroteno, zeaxantina e luteína, por exemplo), Miller et al. (1996), Barreto (2008) e Zulueta, Esteve & Frígola (2009) também encontraram valores menores para as xantofilas, conforme apresentado na Tabela 1.

Quadro 5. Características estruturais dos epóxidos formados pela reação do β -caroteno com MCPBA.

Composto	Estrutura	Fórmula Molecular	Número de l.d.c.
5,6,5',6'-diepóxido		$C_{40}H_{56}O_2$	9 l.d.c.
5,6,5',8'-diepóxido		$C_{40}H_{56}O_2$	8 l.d.c.
9- <i>cis</i> -5,6,5',6'-diepóxido		$C_{40}H_{56}O_2$	9 l.d.c.
5,6-epóxido		$C_{40}H_{56}O$	10 l.d.c.
5,8-epóxido		$C_{40}H_{56}O$	9 l.d.c.
all- <i>trans</i> - β -caroteno		$C_{40}H_{56}$	11 l.d.c.

Avaliando o efeito conjunto dos epóxidos agrupados conforme apresentado no Quadro 4, observou-se que, quanto maior a proporção de diepóxidos, em cujas estruturas há duas moléculas de oxigênio (Quadro 4), e conseqüentemente menor a proporção de monoepóxidos e all-*trans*, houve um aumento no valor de TEAC. Este comportamento também foi observado por Barreto (2008), que verificou um valor maior para a zeaxantina, possuidora de duas hidroxilas, comparada à β -criptoxantina, que possui somente uma hidroxila (Quadro 1), diferente do encontrado por Miller et al. (1996) que verificaram um comportamento inverso. Para Barreto (2008), a explicação para essa divergência está na diferença dos solventes usados para solubilização do carotenoide, visto que no trabalho desenvolvido por esta autora foi utilizado acetato de etila, o mesmo do presente trabalho, ao passo que os outros autores utilizaram uma solução de hexano:acetona (9:1). Outro ponto relevante está relacionado ao fato de que o radical $ABTS^{\bullet+}$ foi gerado a partir da

reação com permanganato de potássio, tanto neste quanto no trabalho desenvolvido por Barreto (2008), os quais se basearam na metodologia descrita por Re et al. (1999), ao passo que no caso de Miller et al. (1996) foi utilizado o dióxido de manganês na geração do ABTS^{•+}.

Ao analisar os ensaios com e sem NaHCO₃, não se observou diferença significativa na capacidade de desativar o radical ABTS^{•+} para ambos os tempos estudados. Considerando o tempo de 0 minutos, ainda que os monoepóxidos tenham sido majoritários no ensaio com NaHCO₃ (48 %) e os diepóxidos no sem NaHCO₃ (56 %), a diferença na proporção entre estes dois grupos nos dois ensaios (10 e 18 %, respectivamente) não foi suficiente para provocar uma modificação na capacidade de reduzir o ABTS^{•+}.

Neste sentido, pode-se concluir que só ocorre uma alteração significativa na capacidade de reduzir o radical ABTS^{•+} quando a diferença entre as proporções de mono e diepóxidos é maior que 50 %, como foi observado para os tempos de 30 minutos, na presença ou ausência de NaHCO₃, nos quais os diepóxidos constituíram mais de 75 % do total de carotenoides.

Conforme mencionado acima, os tempos de 30 minutos apresentaram maior diferença entre as proporções de mono e diepóxidos e por consequência maior valor de TEAC. Entretanto, se apenas o sistema de I.d.c. da molécula fosse considerado na capacidade de reduzir o ABTS^{•+}, esperava-se que o valor de TEAC fosse menor, já que o 5,6,5',6'-diepóxido, composto majoritariamente formado em ambos os ensaios para este tempo, apresenta uma I.d.c. a menos do que as 10 I.d.c. inerentes ao 5,6-epóxido, composto de destaque nos tempos de 0 minutos. Este comportamento nos indica que, nas proporções avaliadas dos epóxidos, a extensão do cromóforo apresentou menor contribuição na desativação do radical ABTS^{•+} do que a quantidade de grupos substituintes presentes na estrutura. Como os derivados 5,6 foram maioria em todas as condições, o efeito que a alteração na estrutura da molécula ocasionada pelo rearranjo 5,8-furanoide implicaria na capacidade de desativar o ABTS^{•+} não pôde ser avaliado. Cabe destacar que estes epóxidos não foram previamente purificados para a avaliação da capacidade antioxidante devido à baixa estabilidade que apresentam.

De forma geral, pode-se afirmar que a capacidade de desativação do radical ABTS^{•+}, nas condições utilizadas neste trabalho, apresentou a seguinte ordem: β-caroteno > diepóxidos > monoepóxidos (Figura 23). Além disso, os produtos de oxidação do β-caroteno apresentam menor capacidade de desativação do radical ABTS^{•+} do que o carotenoide de origem.

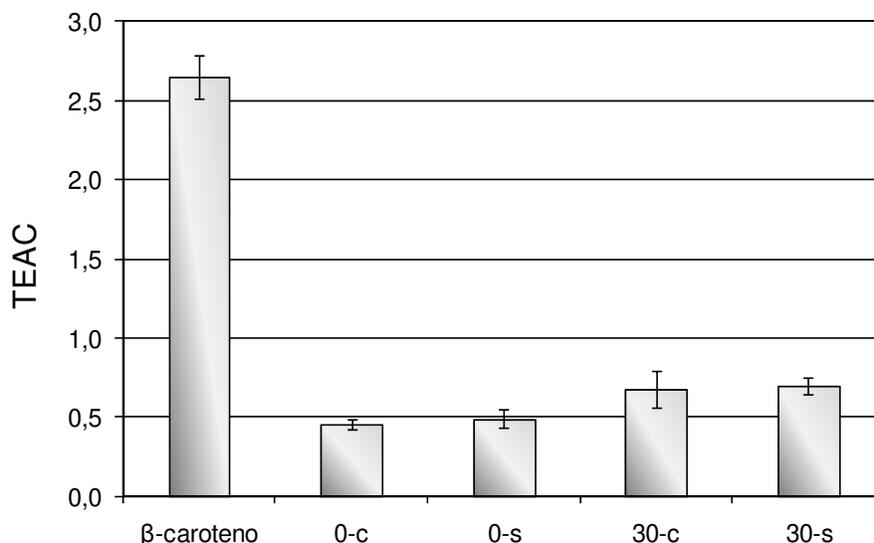


Figura 23. Capacidade antioxidante equivalente a trolox (TEAC) para as quatro condições da reação de β -caroteno com MCPBA. As siglas 0-c e 0-s representam, respectivamente, a reação conduzida na presença e ausência de NaHCO_3 sem tempo de agitação após adição do MCPBA. As siglas 30-c e 30-s são equivalentes às condições de 30 minutos de agitação após adição do MCPBA na presença e ausência de NaHCO_3 , respectivamente.

Além do teste que avaliou a capacidade antioxidante sobre um radical estável ($\text{ABTS}^{\bullet+}$), também foi avaliada a capacidade de desativação do radical peroxila, o mais abundante dos radicais (Rodriguez-Amaya, 2010), uma vez que são métodos que diferem no mecanismo antioxidante.

Os carotenoides são compostos de natureza apolar, cujo grau varia conforme a estrutura da molécula, de forma que os carotenos são mais apolares que as xantofilas. Entretanto, o método ORAC é realizado em solução tampão, em cujo meio, por ser aquoso, os carotenoides não são solúveis. Dessa forma, para possibilitar a solubilização dos compostos de estudo nesse meio, a β -ciclodextrina metilada randomicamente (RMCD) foi utilizada juntamente com a acetona.

Várias concentrações de β -caroteno foram testadas e em todas elas foi observado o mesmo comportamento que se caracterizou pelo sinal muito próximo ao encontrado para o controle (acetona:água RMDC 7 %), conforme demonstrado na Figura 24. Sendo assim, assumiu-se que a capacidade de desativação do radical ROO^\bullet pelo β -caroteno é quase nula, apresentando um valor ORAC próximo a zero.

Alguns trabalhos já foram realizados utilizando o β -caroteno, mas a qualidade dos resultados é um fator que deve ser considerado, visto a enorme dificuldade para total solubilização deste carotenoide no meio utilizado para o método ORAC e, até o momento não foi encontrado nenhum trabalho que apresentasse uma solução completamente eficiente para este problema. Zulueta, Esteve & Frígola (2009), por exemplo, não apresentaram o meio em que foram solubilizados os carotenoides, e reportaram um valor de ORAC de 0,582 para β -caroteno.

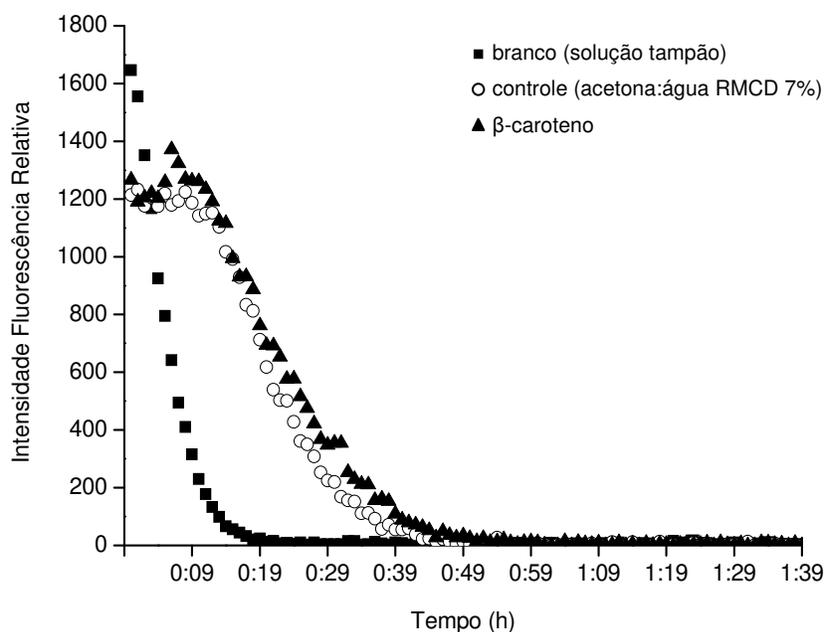


Figura 24. Cinética de decaimento da fluorescência do β -caroteno, medida durante o método ORAC.

Com relação aos produtos obtidos na reação de epoxidação, apesar da dificuldade em solubilizá-los em concentrações maiores, foi possível realizar o teste ORAC, para cada condição de estudo, em pelo menos duas concentrações, nas quais os carotenoides presentes foram completamente solubilizados. Dessa forma, como cada condição foi realizada em triplicata e para cada repetição foram feitas duas placas, um total de doze ensaios foram conduzidos. Os resultados foram expressos como valor ORAC (em $\mu\text{mol/L}$ equivalente a trolox), calculado conforme Equação 9, e a curva de calibração do padrão de referência encontra-se na Figura 25.

O valor ORAC, da mesma forma que o valor TEAC, correspondente a 1,0 significa que o composto de estudo tem atividade equivalente ao padrão de referência, neste caso o trolox. Os valores ORAC variaram de 0,15 a 0,83 (Quadro 4 e Figura 26) e, como o β -caroteno apresentou um comportamento similar ao controle, os produtos de oxidação de

todas as condições avaliadas, independentemente do tempo e do uso de NaHCO_3 , demonstraram maior capacidade em desativar o radical ROO^\bullet que o β -caroteno, menores, todavia, que a capacidade antioxidante apresentada pelo padrão de referência trolox.

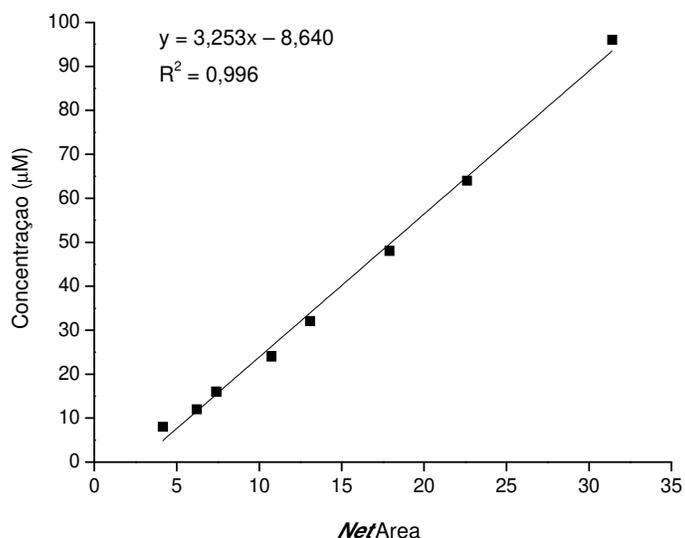


Figura 25. Curva de calibração de trolox para o teste ORAC.

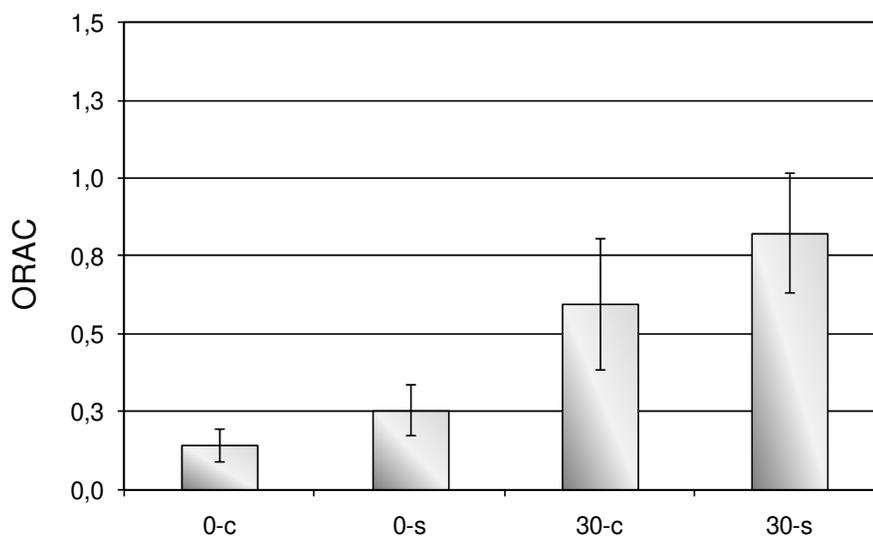


Figura 26. Capacidade de desativação do radical peroxila (ORAC) para as quatro condições da reação de β -caroteno com MCPBA. As siglas 0-c e 0-s representam, respectivamente, a reação conduzida na presença e ausência de NaHCO_3 sem tempo de agitação após adição do MCPBA. As siglas 30-c e 30-s são equivalentes às condições de 30 minutos de agitação após adição do MCPBA na presença e ausência de NaHCO_3 , respectivamente.

Assim como ocorreu com o radical $ABTS^{\bullet+}$, a diferença entre os ensaios só foi significativa entre os tempos de 0 e 30 minutos, cujos valores foram 3 e 4 vezes maiores que os apresentados nos tempos de 0 minutos na ausência e na presença de $NaHCO_3$, respectivamente. Estes dados indicam que a diferença entre as proporções dos epóxidos formados é também extremamente relevante na capacidade de desativar o radical ROO^{\bullet} . Quando os diepóxidos estão presentes em proporção maior que 50 % que os monoepóxidos, essa capacidade é aumentada.

Em resumo, analisando a capacidade de desativação dos radicais $ABTS^{\bullet+}$ e ROO^{\bullet} , observou-se uma inversão no comportamento do caroteno e dos produtos de oxidação. Isto é, o β -caroteno apresentou maior atividade sobre o radical $ABTS^{\bullet+}$, enquanto que os produtos de epoxidação apresentaram maior capacidade em desativar o radical ROO^{\bullet} . Esse comportamento também foi encontrado por Zulueta, Esteve & Frígola (2009), pois as xantofilas luteína e zeaxantina apresentaram valores de ORAC maiores que o do β -caroteno. Isso indica que a estrutura do β -caroteno (Quadro 5) torna-o mais eficiente em desativar os radicais por meio da transferência de elétrons, como ocorre com o $ABTS^{\bullet+}$, sendo desfavorecido quando a desativação ocorre principalmente pela formação de aduto, o que, no caso do ORAC, daria origem ao radical peroxila de β -caroteno (Figura 3). Dessa forma, o radical cátion (Equação 4) formado após a reação do β -caroteno com o $ABTS^{\bullet+}$ (β -carotenil) é mais estável que o radical peroxila de β -caroteno. Para os epóxidos, essa lógica é inversa.

6. CONCLUSÕES

A aplicação da cromatografia líquida de alta eficiência acoplada aos detectores de arranjo de diodos e de espectrometria de massas (HPLC-DAD-MS/MS) mostrou-se uma ferramenta importante para a identificação dos treze compostos formados pelo aquecimento da β -criptoxantina em sistema simulador de suco e dos cinco produtos de oxidação provenientes da reação do β -caroteno com MCPBA.

Compostos não detectados por HPLC-DAD-MS/MS, provavelmente voláteis, foram os produtos formados em maior quantidade a partir da degradação térmica de β -criptoxantina no sistema simulador de suco, os quais corresponderam a quase 75 % da degradação do composto de origem. Por outro lado, quando considerados apenas os produtos não voláteis, foi observada a formação concomitante de compostos de oxidação e de isomerização, reação esta que ocorreu com maior frequência, sendo os isômeros 13- e 13'-*cis*- β -criptoxantina os majoritários. As quantidades relativas de cada grupo de isômeros *cis* indica que a sequência de formação é *all-trans* \Leftrightarrow *mono-cis* \Leftrightarrow *di-cis*.

A reação do β -caroteno com MCPBA mostrou-se bastante eficiente para a formação de epóxidos, de forma que ao fim da reação, nas condições utilizadas, a proporção de *all-trans*- β -caroteno foi menor que 15 %. Tanto mono quanto diepóxidos de β -caroteno foram originados a partir da reação de epoxidação com MCPBA, de forma que a proporção entre eles foi menor que 20 % e maior que 50 % nos ensaios de 0 e 30 minutos, respectivamente, independente do uso ou não do NaHCO_3 .

Com relação ao efeito do uso do NaHCO_3 , porém, os tempos de agitação avaliados de 0 e 30 minutos não foram suficientes para tornar majoritários os derivados 5,8-epóxidos, o que era esperado para os ensaios que não utilizaram este reagente. Dessa forma, o monoepóxido majoritariamente formado foi o 5,6-epóxido, enquanto que para os diepóxidos, o 5,6,5',6'-diepóxido foi encontrado em maior quantidade.

A presença de grupos substituintes na estrutura do carotenoide ocasionou maior impacto na capacidade de desativação dos radicais ABTS^{*+} e ROO^{\bullet} do que a extensão do cromóforo. Desta forma, quando os diepóxidos estiveram em proporção maior que 50 % comparados aos monoepóxidos, houve maior capacidade em desativar ambos os radicais estudados. Por outro lado, o *all-trans*- β -caroteno foi mais eficiente que os epóxidos somente na capacidade de desativação do radical ABTS^{*+} . Em resumo, a capacidade antioxidante, independentemente do método utilizado, esteve diretamente relacionada às características estruturais do carotenoide, especialmente ao número e à localização dos grupos epóxidos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alija, A.J.; Bresgen, N.; Sommerburg, O.; Langhans, C.D.; Siems, W.; Eckl, P.M. Beta-carotene breakdown products enhance genotoxic effects of oxidative stress in primary rat hepatocytes. **Carcinogenesis**, 27, 1128-1133, 2006.
- Aman, R.; Schieber, A.; Carle, R. Effects of heating and illumination on *trans-cis* isomerization and degradation of β -carotene and lutein in isolated spinach chloroplasts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 53, 9512-9518, 2005.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 269, Regulamento técnico sobre a Ingestão Diária (IDR) de proteína, vitaminas e minerais. 22 de setembro de 2005. Disponível em URL: <http://www.crd.defesacivil.rj.gov.br/documentos/IDR.pdf>. Acessado em maio de 2011.
- Augustin, W.; Siems, W.; Sommerburg, O.; Langhans, C.D.; Schild, L.; Wiswedel, I. Beta-carotene cleavage products induce oxidative stress by impairing mitochondrial functions: brain mitochondria are more sensitive than liver mitochondria. **Free Radical Biology & Medicine**, 33, S326, 2002.
- Back, S., Enzell, C.R. Mass Spectrometry. In *Carotenoids, vol. 1B: Spectroscopy* (G. Britton, S. Liaaen-Jensen, H. Pfander, E.) Birkhauser, Basel, 261-320, 1995.
- Barua, A. B.; Olson, J. A. Xanthophyll epoxides, unlike β -carotene monoepoxides, are not detectibly absorbed by humans. **Journal of Nutrition, Human Nutrition and Metabolism Research Communication**, 131, 3212-3215, 2001.
- Barreiros, A.L.B.S.; David, J.M.; David, J.P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, 29, 113-126, 2006.
- Barreto, G. P. de M. Carotenoides e compostos bioativos: relação com propriedade antirradical livre e corante em frutas tropicais. Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em Ciência de Alimentos. Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 165 p., 2008.
- Bohm, V.; Puspitasari-Nienaber, N.L.; Ferruzzi, M.G.; Schwartz, S.J. Trolox equivalent antioxidant capacity of different geometrical isomers of α -carotene, β -carotene, lycopene and zeaxanthin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 50, 221-226, 2002.
- Borsarelli, C.D.; Mercadante, A.Z. Thermal and photochemical degradation of carotenoids. In: *Carotenoids: Physical, Chemical and Biological Functions Properties*. J.T. Landrum. CRC, New York, p.229-253, 2010.
- Britton, G. UV/visible spectroscopy. In: *Carotenoids: Spectroscopy, v.1B*. Britton, G.; Liaaen-Jensen, S.; Pfander, H. (Eds.) Birkhäuser, Basel, Switzerland, 1995.

-
- Brunner, M.R. Thermische (E/Z)-Isomerisierung Von Carotinoiden. Inauguraldissertation der Philosophisch-naturwissenschaftlichen Fakultät der University of Bern. 135 p., 1997.
- Burton, G.W.; Ingold, K.U. β -carotene: an unusual type of lipid anti-oxidant. **Science**, v.224, 569–573, 1984.
- Cantrell, A.; Truscott, T.G. Carotenoids and radicals: interactions with other nutrients. In: Carotenoids in healthy and disease. Mayne, S.T.; Sies, H.; Krinsky, N.I. CRC, New York, 31-52, 2004.
- Caris-Veyrat, C. Antioxidant and prooxidant actions and stabilities of carotenoids *in vitro* and *in vivo* and carotenoid oxidation products. In: Food colorants – chemical and functional properties. C. Socaciu. CRC, New York, 177-192, 2008.
- Castro, W.F.; Mariutti, L.R.B.; Bragagnolo, N. The effects of colorifico on lipid oxidation, colour and vitamin E in raw and grilled chicken patties during frozen storage. **Food Chemistry**, 124, 126-131, 2011.
- De Rosso, V. V.; Mercadante, A. Z. Identification and quantification of carotenoids, by HPLC-PDA-MS/MS, from Amazonian fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 55, 5062-5072, 2007.
- Delgado-Vargas, F.; Paredes-López, O. Carotenoids. In: Natural colorants for food and nutraceutical uses. CRC, New York, 2003.
- Deli, J.; Ösz, E. Carotenoid 5,6-, 5,8- and 3,6-epoxides. **Arkivoc**, Issue in Honor of Prof. Sándor Antus (vii), 150-164, 2004.
- Di Mascio, P.; Kaiser, S.; Sies, H. Lycopene as the most efficient biological carotenoid singlet oxygen quencher. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 274, 532-538, 1989.
- During, A. Bioavailability of natural pigments. In: Food colorants – chemical and functional properties. C. Socaciu (Ed.). CRC, New York, 147-175, 2008.
- Emenhiser, C.; Simunovic, N.; Sander, L. C.; Schwartz, S. J. Separation of geometrical carotenoid isomers in biological extracts using a polymeric C30 column in reversed-phase liquid chromatography. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 44, 3887-3893, 1996.
- Eugster, C. H. In *Carotenoids*; Britton, G.; Liaaen-Jensen, S.; Pfander, H. Eds.; Birkhäuser Verlag: Basel, p.71, 1995.
- Faria, A.F.; Hasegawa, P.N.; Chagas, E.A.; Pio, R.; Purgatto, E.; Mercadante, A.Z. Cultivar influence on carotenoid composition of loquats from Brazil. **Journal of Food Composition and Analysis**, 22, 196–203, 2009.
- Fernandes, E.; Costa, D.; Toste, S.A.; Lima, J.L.F.C.; Reis, S. *In vitro* scavenging activity for reactive oxygen and nitrogen species by nonsteroidal anti-inflammatory indole,

-
- pyrrole, and oxazole derivative drugs. **Free Radical Biology & Medicine**, 37, 1895-1905, 2004.
- Halliwell, B.; Gutteridge, J.M.C. Free radicals in biology and medicine. 4^a ed., Oxford University Press, New York, 2007.
- Hart, D. J.; Scott, K. J. Development and evaluation of an HPLC method for the analysis of carotenoids in foods, and the measurement of the carotenoid content of vegetables and fruits commonly consumed in the UK. **Food Chemistry**, 54, 101-111, 1995.
- Huang, D.; Ou, B.; Prior, R.L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 53, 1841-1856, 2005.
- Hurst, J. S.; Saini, M. K.; Jin, G.-F.; Awasthi, Y. C.; Kuijk, F. J.G.M. van. Toxicity of oxidized β -carotene to cultured human cells. **Experimental Eye Research**, 81, 239-243, 2005.
- Instituto de Medicina. Dietary reference intakes for vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium, and zinc. Disponível em URL: http://www.nap.edu/catalog.php?record_id=10026, 2001. Acessado em maio de 2011.
- Kalariya, N.M.; Ramana, K.V.; Srivastava, S.K.; Kuijk F.J.G.M. van. Carotenoid derived aldehydes-induced oxidative stress causes apoptotic cell death in human retinal pigment epithelial cells. **Experimental Eye Research**, 86, 70-80, 2008.
- Kalariya, N.M.; Ramana, K.V.; Srivastava, S.K.; Kuijk, F.J.G.M. van. Genotoxic effects of carotenoid breakdown products in human retinal pigment epithelial cells. **Current Eye Research**, 34, 737-747, 2009.
- Kiokias, S.; Dimakou, C.; Oreopoulou, V. Activity of natural carotenoid preparations against the autoxidative deterioration of sunflower oil-in-water emulsions. **Food Chemistry**, 114, 1278-1284, 2009.
- Krinsky, N.I. Actions of carotenoids in biological-systems. **Annual Review of Nutrition**, 13, 561-587, 1993.
- Krinsky, N.I.; Johnson, E.J. Carotenoid actions and their relation to health and disease. **Molecular Aspects of Medicine**, 26, 459-516, 2005.
- Lacerda-Júnior, V. Pentacloroeto de nióbio como ácido de Lewis em síntese orgânica. Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em Ciências, área de concentração: Química. Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 286 p., 2004.
- Liaaen-Jensen, S. Combined approach: identification and structure elucidation of carotenoids. In: Carotenoids: Spectroscopy, 1B. Britton, G.; Liaaen-Jensen, S.; Pfander, H. Birkhäuser, Basel, 343p., 1995.

-
- Liu, M. H.; Chen, B. H. Relationship between chlorophyll *a* and β -carotene in a lipid-containing model system during heating. **Food Chemistry**, 61, 41-47, 1998.
- Mercadante, A.Z. Carotenoids in foods: Sources and stability during processing and storage. In: Food colorants – chemical and functional properties. C. Socaciu. CRC, New York, 213-240, 2008a.
- Mercadante, A.Z. Analysis of carotenoids. In: Food colorants – chemical and functional properties. C. Socaciu. CRC, New York, 447-478, 2008b.
- Mercadante, A.Z.; Capitani, C.D.; Decker, E.A.; Castro, I.A. Effect of natural pigments on the oxidative stability of sausages stored under refrigeration. **Meat Science**, 84, 718-726, 2010.
- Mercadante, A.Z.; Rodriguez-Amaya, D.B. The effects of ripening, cultivar differences and processing on the carotenoid composition of mango. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 46, 128-130, 1998.
- Miller, N.J.; Sampson, J.; Candeias, L.P.; Bramley, P.M.; Rice-Evans, C.A. Antioxidant activities of carotenes and xanthophylls. **Federation of European Biochemical Societies Letters**, 384, 240-242, 1996.
- Omenn, G.S.; Goodman, G.E.; Thornquist, M.D.; et al. Effects of a combination of beta-carotene and vitamin A on lung cancer and cardiovascular disease. **The New England Journal of Medicine**, 334, 1150-1155, 1996.
- Ötles, S.; Çagindi, O. Carotenoids as natural colorants. In: Food colorants – chemical and functional properties. C. Socaciu. CRC, New York, 51-70, 2008.
- Ou, B.; Hampsch-Woodill, M.; Prior, R.L. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 49, 4619-4626, 2001.
- Palozza, P.; Serini, S.; Torsello, A. et al. Beta-carotene regulates NF-kappaB DNA-binding activity by a redox mechanisms in human leukemia and colon adenocarcinoma cells. **The Journal of Nutritional**, 133, 381–388, 2003.
- Qiu, D.; Chen, Z-R; Li, H-R. Density functional theory study on thermal isomerization of β -carotene. **Journal of Molecular Structure: THEOCHEM**, 865, 44-48, 2008.
- Qiu, D.; Chen, Z-R.; Li, H-R. Effect of heating on solid β -carotene. **Food Chemistry**, 112, 344-349, 2009.
- Rao, A.V.; Rao, L.G. Carotenoids and human health. **Pharmacological Research**, 55, 207-213, 2007.
- Re, R.; Pellegrini, N.; Proteggente, A.; Pannala, A.; Yang, M.; Rice-Evans, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology & Medicine**, 26, 1231-1237, 1999.

-
- Rodriguez, E.B.; Rodriguez-Amaya, D.B. Formation of apocarotenals and epoxycarotenoids from β -carotene by chemical reactions and by autoxidation in model systems and processed foods. **Food Chemistry**, 101, 563–572, 2007.
- Rodriguez, E.B.; Rodriguez-Amaya, D.B. Lycopene epoxides and apo-licopenals formed by chemical reactions and autoxidation in model systems and processed foods. **Journal of Food Science**, 74, 674-682, 2009.
- Rodriguez-Amaya, D. B. Quantitative analysis, *in vitro* assessment of bioavailability and antioxidant activity of food carotenoids – A review. **Journal of Food Composition and Analysis**, 23, 726-740, 2010.
- Roginsky, V.; Lissi E. A. Review of methods to determine chain breaking antioxidant activity in food. **Food Chemistry**, 92, 235-254, 2005.
- Stahl, W.; Sies, H. Physical quenching of singlet oxygen and *cis-trans* isomerization of carotenoids. **Annals of the New York Academy of Sciences**, 691, 10-19, 1993.
- Stahl, W.; Sies, H. Antioxidant effects of carotenoids: implication in photoprotection in humans. In: Handbook of antioxidants. Cadenas, E.; Packer, L. CRC, New York, 447-478, 2002.
- Tibaduiza, E.C.; Fleet, J.C.; Russell, R.M.; Krinsky, N.I. Excentric cleavage products of β -carotene inhibit estrogen receptor positive and negative breast tumor cell growth *in vitro* and inhibit activator protein-1-mediated transcriptional activation. **Journal of Nutrition**, 132, 1368-1375, 2002.
- Young, A.J.; Lowe, G.M. Antioxidant and prooxidant properties of carotenoids. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 385, 20-27, 2001.
- Young, A.J.; Phillip, D.M.; Lowe, G.M. Carotenoid antioxidant activity. In: Carotenoids in healthy and disease. Mayne, S.T.; Sies, H.; Krinsky, N.I. CRC, New York, 105-126, 2004.
- Zechmeister, L. *Cis-trans* isomerization and stereochemistry of carotenoids and diphenylpolyenes. **Chemical Reviews**, 34, 267-344, 1944.
- Zepka, L.Q. Identificação dos compostos de degradação de carotenoides e avaliação do impacto sobre a cor em sistemas-modelo simuladores de suco de caju. Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em Ciência de Alimentos. Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 165 p., 2009.
- Zepka, L.Q.; Mercadante, A.Z. Degradation compounds of carotenoids formed during heating of a simulated cashew apple juice. **Food Chemistry**, 117, 28-34, 2009.

-
- Zepka, L.Q.; Borsarelli, C.D; Silva, M.A.A.P; Mercadante, A.Z. Thermal degradation kinetics of carotenoids in a cashew apple juice model and its impact on the system color. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 57, 7841-7845, 2009.
- Zulueta, A.; Esteve, M.J.; Frígola, A. ORAC and TEAC assays comparison to measure the antioxidant capacity of food products. **Food Chemistry**, 114, 310–316, 2009.

ANEXO

ESPECTROS DE MASSAS E UV-VISÍVEL DOS CAROTENOIDES IDENTIFICADOS NA REAÇÃO DE EPOXIDAÇÃO DO β -CAROTENO COM MCPBA

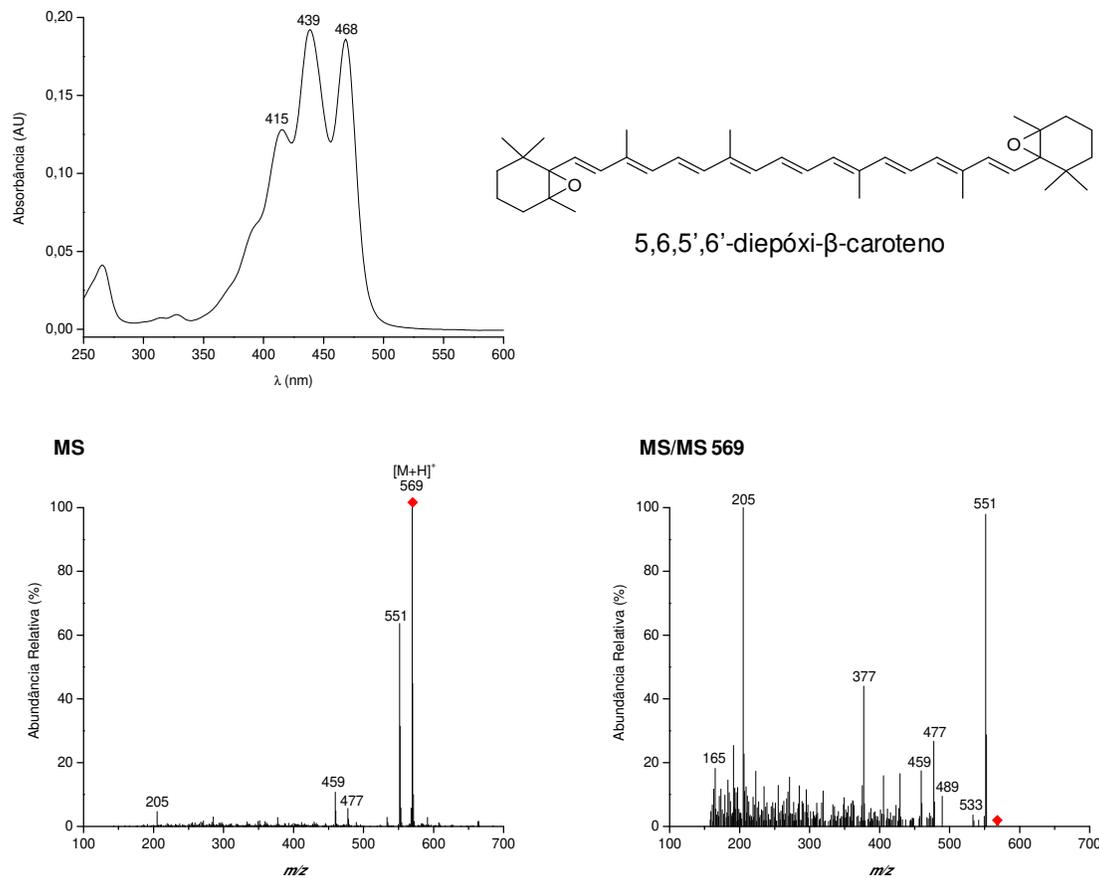


Figura 1. Espectros UV-visível e de massas do carotenoide 5,6,5',6'-diepóxi- β -caroteno. Condições Cromatográficas: Coluna C₃₀, FM gradiente linear de MeOH:MTBE. MS: fonte de ionização APCI, modo positivo.

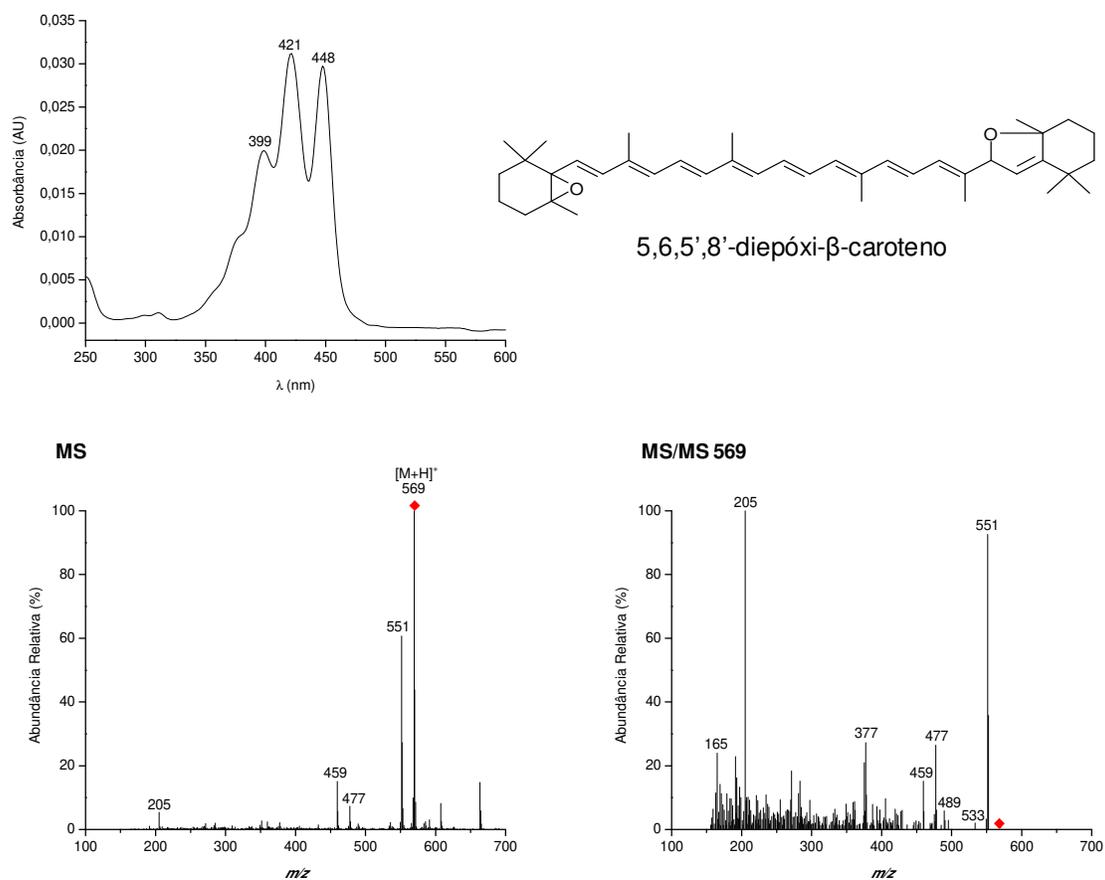


Figura 2. Espectros UV-visível e de massas do carotenoide 5,6,5',8'-diepóxi- β -caroteno. Condições Cromatográficas: Coluna C₃₀, FM gradiente linear de MeOH:MTBE. MS: fonte de ionização APCI, modo positivo.

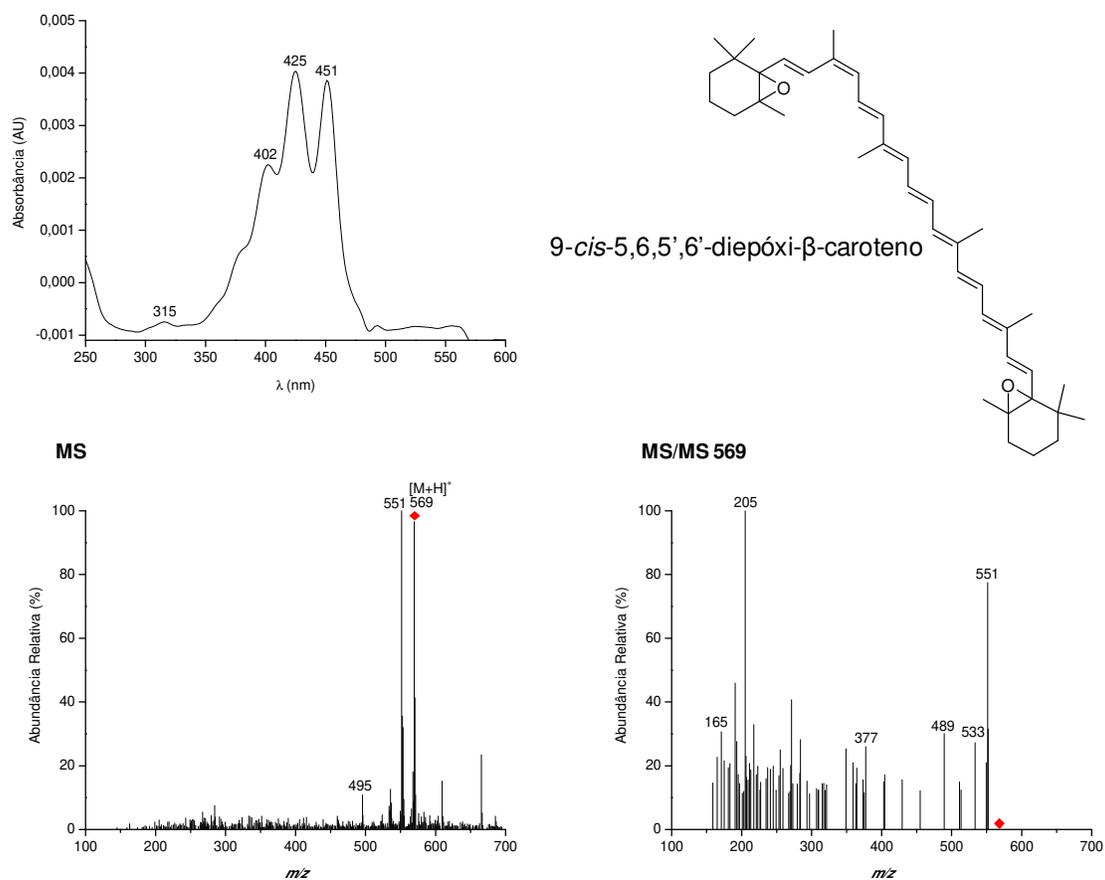


Figura 3. Espectros UV-visível e de massas do carotenoide 9-*cis*-5,6,5',6'-diepóxi- β -caroteno. Condições Cromatográficas: Coluna C₃₀, FM gradiente linear de MeOH:MTBE. MS: fonte de ionização APCI, modo positivo.

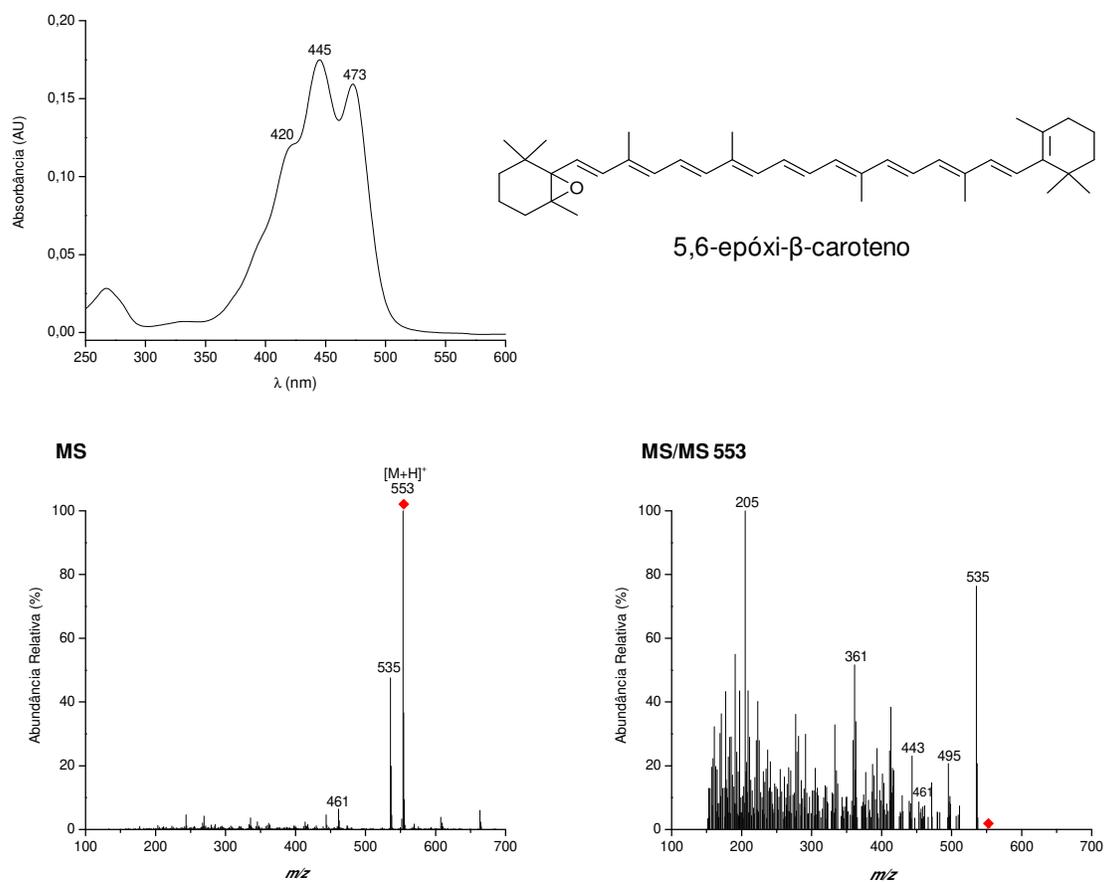


Figura 4. Espectros UV-visível e de massas do carotenoide 5,6-epóxi- β -caroteno. Condições Cromatográficas: Coluna C_{30} , FM gradiente linear de MeOH:MTBE. MS: fonte de ionização APCI, modo positivo.

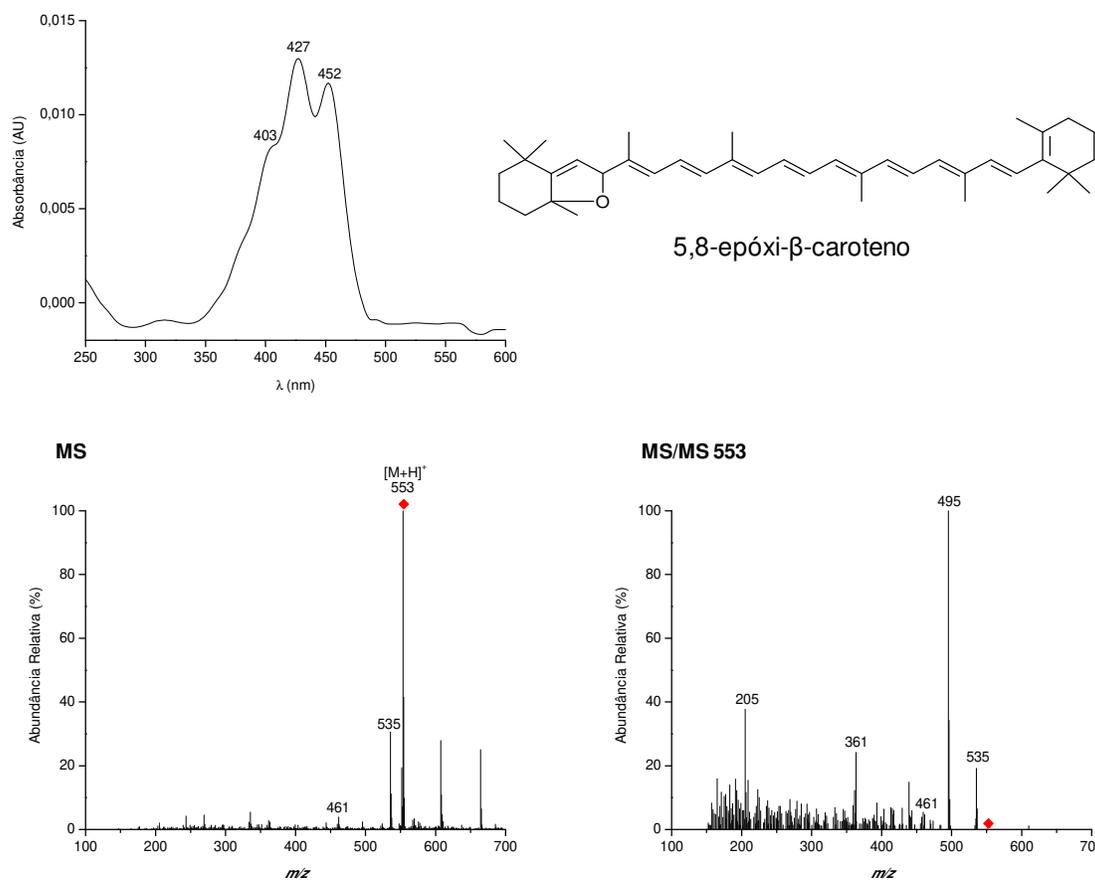


Figura 5. Espectros UV-visível e de massas do carotenoide 5,8-epóxi- β -caroteno. Condições Cromatográficas: Coluna C₃₀, FM gradiente linear de MeOH:MTBE. MS: fonte de ionização APCI, modo positivo.

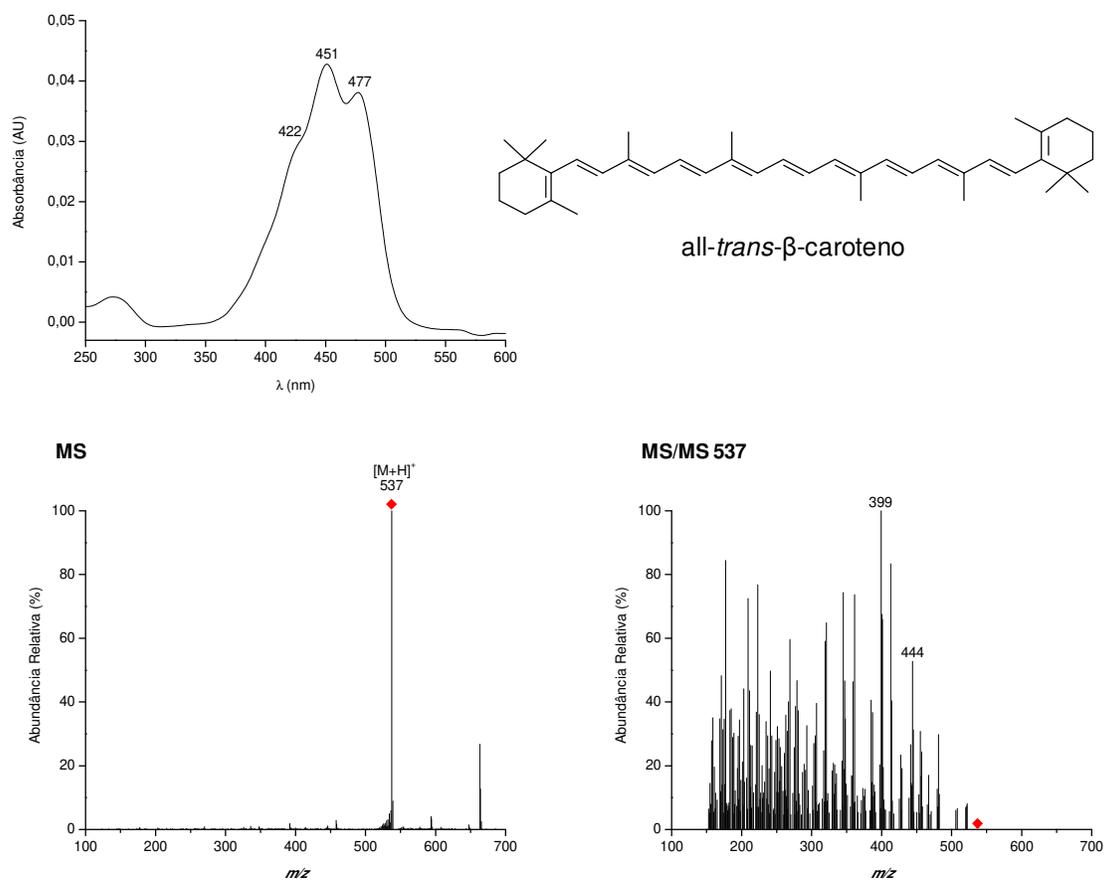


Figura 6. Espectros UV-visível e de massas do carotenoide *all-trans*-β-caroteno. Condições Cromatográficas: Coluna C₃₀, FM gradiente linear de MeOH:MTBE. MS: fonte de ionização APCI, modo positivo.